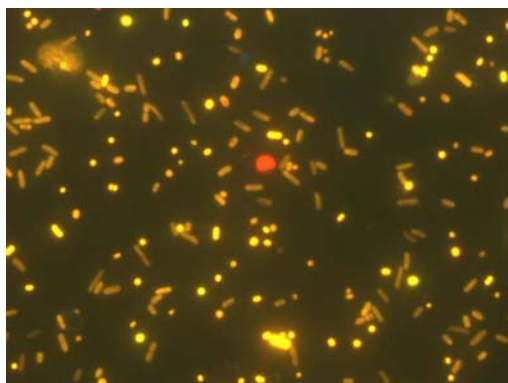




**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO IN ECOLOGIA XX CICLO**

**Biodiversità e caratteristiche eco-fisiologiche
dei picocianobatteri d'acqua dolce**



**Tesi di dottorato di
EMANUELE CARAVATI**

PARMA 2008



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO IN ECOLOGIA XX CICLO**

**Biodiversità e caratteristiche eco-fisiologiche
dei picocianobatteri d'acqua dolce**

**Tesi di dottorato di
EMANUELE CARAVATI**

Coordinatore del Corso di Dottorato:

**Prof. Giulio De Leo
Università di Parma**

Relatori di tesi:

**Prof. Pierluigi Viaroli
Università di Parma**

**Dr. Cristiana Callieri
CNR-ISE, Verbania**

Indice

Riassunto

Introduzione

Studio della biodiversità in ecologia microbica	1
Utilizzo di marker molecolari per lo studio della biodiversità dei microrganismi e sviluppo della <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	4
Biodiversità e diversità	8
Il concetto di specie	12
Ecologia e diversità dei picocianobatteri d'acqua dolce	14
Scopi della ricerca	22
Struttura della tesi	23
Bibliografia	25

I Capitolo : Approccio molecolare allo studio della diversità dei picocianobatteri

Introduzione	33
Metodologia di studio	35
Disegno dell'esperimento	37
Analisi molecolari	37
Trattamento dei dati	43
Risultati	45
Discussione	53
Conclusioni e prospettive future	58
Bibliografia	60

II Capitolo: Diversità della comunità di picocianobatteri nel Lago Maggiore (2006)

Introduzione	64
Ambiente di studio	65
I picocianobatteri nel Lago Maggiore	67
Metodologie di studio	68
Analisi molecolari	75
Trattamento dei dati	75
Risultati	80
Discussione	93
Conclusioni e prospettive future	98
Bibliografia	100

III Capitolo: Diversità e caratteristiche fotosintetiche di comunità picocianobatteriche di laghi andini ultraoligotrofi

Introduzione	105
Area di studio	106
Metodologia di studio	108
Risultati	114
Discussione	120
Conclusioni e prospettive future	122
Bibliografia	124

Considerazioni finali

Bibliografia	132
--------------	-----

Riassunto

I picocianobatteri sono procarioti fototrofi compresi nell'intervallo dimensionale 0.2-2 μ m, ubiquitari sia in ambiente marino che d'acqua dolce. La loro importanza alla base della catena trofica, soprattutto negli ecosistemi acquatici oligotrofi, è ampiamente dimostrata. La ricerca è stata indirizzata allo studio della diversità dei picocianobatteri in relazione ai parametri ambientali in un grande lago subalpino. Sono state pure studiate le relazioni tra caratteristiche fotosintetiche e specifiche unità tassonomiche in laghi ultraoligotrofi nord patagonici, considerati ambienti paradigmatici di laghi oligotrofi.

Lo studio di biodiversità dei picocianobatteri è stato affrontato utilizzando le *tecniche di fingerprinting* (FT) che sono un approccio di studio molecolare basato su metodi non dipendenti da colture. Le FT utilizzate in questo studio (DGGE, T-RFLP e ARISA) sono state confrontate progettando, accanto allo studio della comunità naturale di picocianobatteri del Lago Maggiore, un esperimento su una comunità artificiale semplificata (ricchezza in specie = 5) costruita per valutare la bontà delle tre tecniche nello stimare la diversità dei picocianobatteri. Il confronto tra le tecniche è stato messo in relazione ad una comparazione della loro efficacia sugli stessi tratti di DNA (16S rDNA e ITS-1) grazie soprattutto all'utilizzo della DGGE sul tratto intergenico per i cianobatteri. Se da un lato la DGGE (in entrambi i tratti genici) ha mostrato una maggiore risoluzione delle altre tecniche nella comunità artificiale, non vi è stata una tecnica più sensibile e appropriata delle altre nello studio della comunità naturale. La difficoltà delle analisi sulla comunità naturale è generata non solo da una maggiore complessità, ma anche da una diversa composizione della comunità stessa durante l'evoluzione stagionale dei popolamenti. Se da un lato non si è osservata una differenza significativa tra le tecniche operanti sullo stesso tratto genico (DGGE e T-RFLP sul 16S rDNA; DGGE e ARISA sull'ITS-1) dall'altro si è osservata una differenza significativa sulla efficacia

dello studio dei due diversi tratti genici. Infatti le analisi sull'ITS-1 hanno dato una maggiore risoluzione, intesa come numero di unità tassonomiche misurate, sia nella comunità artificiale che nella comunità naturale rispetto a quelle eseguite sul 16S rDNA.

T-RFLP e ARISA, sono state successivamente utilizzate per l'analisi ecologica della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore (2006). La differente composizione dei campioni prelevati a 3m e 20m, misurata mediante indici di similarità (Jaccard e soprattutto Bray-Curtis), ha permesso di valutare come ARISA (gene ITS-1) abbia una maggiore risoluzione rispetto alla T-RFLP (gene 16S rDNA) nel descrivere e comprendere la dinamica spazio temporale della comunità picocianobatterica. La successione di ceppi di picocianobatteri osservabile durante l'evoluzione stagionale della comunità stessa è sia spaziale (composizione differente a 3m e 20m nel periodo estivo) che temporale (composizione differente tra primavera ed estate). Dall'analisi multivariata (RDA) la temperatura è risultata la principale variabile ambientale ($P < 0.001$) nel determinare i cambiamenti osservati nella comunità picocianobatterica.

Infine, ARISA è stata utilizzata per lo studio della diversità picocianobatterica di un distretto di laghi andini ultraoligotrofi profondi con caratteristiche morfometriche e chimico-fisiche tipiche di ambienti estremi. Accanto a studi di diversità, effettuati a 2 profondità corrispondenti al 25% e l'1% della PAR superficiale, sono state misurate le caratteristiche fotosintetiche, intese come relazioni luce-fotosintesi, delle comunità picocianobatteriche. Non si è osservata una differenza genotipica tra i popolamenti presenti alle due profondità, ma si è ottenuta una correlazione tra composizione della comunità picocianobatterica di un gruppo di laghi e le sue caratteristiche fotosintetiche. Le unità tassonomiche si aggregano in due cluster: uno composto dal grande lago Nahuel Huapi e dal lago Moreno, formato dal progressivo isolamento di un braccio del Nahuel Huapi; l'altro cluster comprende gli altri quattro laghi. L'utilizzo dell'ARISA ha permesso di trovare una correlazione positiva tra una singola OTU, presente soltanto nei quattro laghi di un cluster e la produzione

specifica per unità di clorofilla *a*. Questo dato oltre ad indicare le effettive potenzialità dell'analisi ITS-1 di ottenere informazioni ecologiche di supporto alla singola informazione di diversità è un indizio del ritrovamento di alcuni particolari adattamenti eco-fisiologici che le singole OTU possono sviluppare in determinate condizioni ambientali .

Glossario:

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ARISA: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Introduzione

Studio della biodiversità in ecologia microbica

La biodiversità è un descrittore importante del funzionamento degli ecosistemi (Loreau *et al.*, 2001; Giller *et al.*, 2004; Hooper *et al.*, 2005; Balvanera *et al.*, 2006) ed è legata ai processi ecologici che vi si svolgono quali la competizione (Tilman, 1994), la predazione (Wimp and Whitham, 2001) e la produzione (Tilman, 1993; Dodson *et al.*, 2000; Mittelbach *et al.*, 2001) all'interno della comunità. Inoltre la biodiversità è un indicatore fondamentale della stabilità della comunità (Ives *et al.*, 2000; Carr *et al.*, 2002; Clark and McLachlan, 2003).

Negli anni '60, seguendo i primi passi degli ecologi vegetali e animali, i microbiologi cominciarono a studiare l'impatto della biodiversità sulla funzione e sulla struttura delle comunità microbiche (Hariston *et al.*, 1968; Swift, 1974).

Lo studio della biodiversità è stato affrontato per chiarire le relazioni tra l'eterogeneità funzionale dei microrganismi ed alcune delle principali variabili ecologiche. A causa dell'immenso numero di microrganismi sulla Terra e dell'ampio spettro di habitat che essi occupano, la potenziale eterogeneità e variabilità dei microrganismi è probabilmente più grande di qualsiasi altro gruppo di organismi (Morris *et al.*, 2002).

Uno dei principali problemi degli studi sulla biodiversità dei microrganismi è legato alle dimensioni ridotte di questi ultimi che non ne permettono una sicura tipizzazione morfo-dimensionale. La ridotta diversità in forme e dimensioni ha condotto gli ecologi microbici verso un approccio meno diretto: la coltivazione dei microrganismi come metodo per la loro identificazione. Molti microbiologi, inclusi Martinus Beijerinck e Sergei Winogradsky, pionieri nell'uso dei metodi colturali per studiare la biologia generale dei microrganismi nei loro ambienti, dubitavano che questo approccio avrebbe fornito una descrizione precisa dei microrganismi e della loro presenza nei loro habitat naturali (referenze in Ward *et al.*, 1992). Questo approccio, tuttavia, è ancora oggi considerato essenziale per la caratterizzazione dei microrganismi perché le colture pure sono necessarie

per effettuare alcune analisi genetiche e permettere lo studio di alcuni aspetti della fisiologia microbica (Ward *et al.*, 1998). Per esempio, studi su colture pure hanno permesso lo sviluppo di base di quei nuovi approcci molecolari (Olsen *et al.*, 1994) che hanno rivoluzionato la microbiologia ambientale fornendo alberi filogenetici e favorendo nuovi approcci ecologici.

A conferma di ciò si può considerare il numero delle pubblicazioni inerenti la biodiversità microbica, che ha mostrato un notevole incremento nei primi anni '90 (Fig. 1).

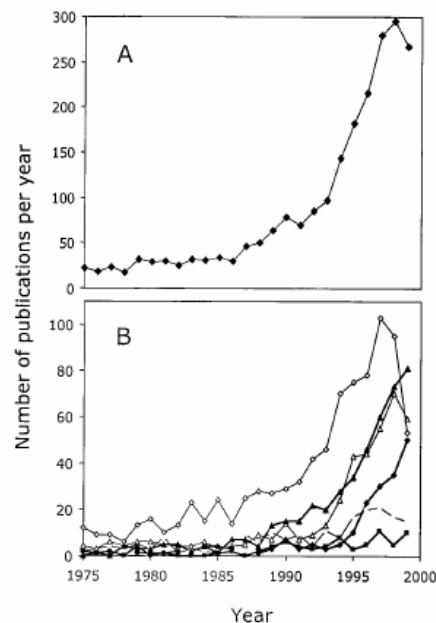


FIG. 3. Rate of publication in the primary literature from 1975 to 1999 of studies concerning the biodiversity of eight microbial habitats. (A) Total number of publications per year; (B) number of publications per year concerning fungus-plant pathosystems (◇), the rhizosphere (including mycorrhizae) (▲), microbial habitats in soil (△), aquatic systems (◆), bacterium-plant system (---), and the microbiology of food and food-processing factories (■).

Fig. 1 - Pubblicazioni dal 1975 al 1999 di studi inerenti la biodiversità di alcuni habitat microbici. Da: Morris *et al.*, 2002.

In queste pubblicazioni si sono sviluppate ed utilizzate tecniche per caratterizzare la biodiversità a livello molecolare sia per microrganismi coltivabili che non coltivabili. Tutto ciò ha contribuito a capire come il 'mondo microbico' è ben più ricco in biodiversità di quanto si credesse alla fine degli anni '80 (Morris *et al.*, 2002). In più di tre decenni di studi filogenetici-molecolari

gli scienziati hanno elaborato un'importante mappa della diversificazione evolutiva degli organismi viventi che mostra come la frazione microbica sia la principale sorgente di diversità della vita sul nostro pianeta, come è dimostrato dall'albero filogenetico universale che mostra i tre principali domini: *Archea*, *Bacteria* ed *Eukarya* (Pace, 1997; Fig. 2).

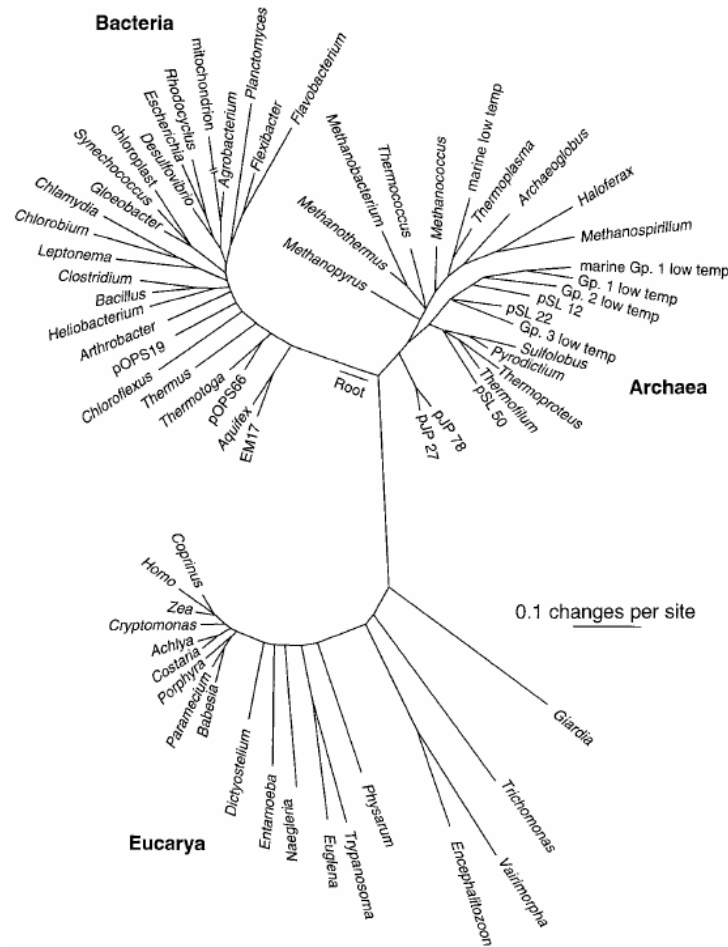


Fig. 2 - Albero filogenetico Universale basato su sequenze SSUrDNA. Da: Pace, 1997.

Queste scoperte rivoluzionarono la classica visione della biodiversità e dei rapporti ecologici caratteristici della vita sul nostro pianeta, tanto da portare addirittura l'illustre ecologo E. O. Wilson a dichiarare nella sua autobiografia (1994): "If I had it to do all over again and relive my vision in the twenty-first century, I would be a microbial ecologist... Into that world I would go with the

aid of modern microscopy and molecular analysis". Questa percezione dell'importanza del mondo microbico è strettamente connessa alla consapevolezza dell'enorme potenziale dell'approccio molecolare e di quanto esso sia un mezzo essenziale per comprendere la diversità microbica. Tale approccio, che Wilson ed altri scienziati (MacArthur and Wilson, 1967; Rosenzweig, 1995) hanno sviluppato per comprendere la diversità delle specie più grandi (Ward *et al.*, 1998), è sicuramente indispensabile per sviluppare il concetto di diversità microbica sia in termini di ecologia di comunità che di biologia evoluzionistica.

Negli anni '90 sono stati pubblicati alcuni lavori che hanno messo in risalto un'altra importante e fondamentale forza evolutiva nella diversificazione dei microrganismi: la trasmissione dei geni da un microrganismo ad un altro, ed in particolar modo la trasmissione orizzontale dei geni o *horizontal gene transfer* (HGT, Lan and Reeves, 1996; Lawrence, 1999). La possibilità di incorporazione di geni tra genomi di microrganismi mediante HGT (molto più diffusa per *Archea* e *Bacteria*) aumenta la diversità genetica e funzionale dei microrganismi e gioca un ruolo complementare alla diversificazione dei popolamenti microbici in lineamenti indipendenti, ecologicamente distinti (Lawrence, 2002).

Utilizzo di marker molecolari per lo studio della biodiversità dei microrganismi e sviluppo della Polymerase Chain Reaction (PCR)

Gli studi inerenti l'ecologia microbica, la diversità e l'evoluzione sono strettamente dipendenti. Questo è risultato chiaro da quando Woese (1987) e Woese e collaboratori (1990) hanno scoperto che le principali linee evolutive della vita sono microbiche e che possono essere suddivise in tre domini sulla base di analisi comparative del RNA ribosomiale (rRNA).

Le molecole dell'rRNA (piccole subunità: 16S per i procarioti, 18S per gli eucarioti; grandi subunità: 23S per i procarioti, 28S per gli eucarioti) possono essere utilizzate per analizzare le relazioni filetiche tra gli organismi attraverso analisi comparative delle loro sequenze genetiche. L'rRNA è composto da

regioni in cui la sequenza di nucleotidi è altamente conservativa ad altre in cui è più variabile (Guttell *et al.*, 1994; Van de Peer *et al.*, 1996).

La più comune disposizione delle differenti subunità, all'interno della porzione di genoma segue, con pochissime eccezioni, l'ordine 16S-23S-5S (Gurtler and Stanisich, 1996; Pisabarro *et al.*, 1998). Tra i geni 16S e 23S e tra i geni 23S e i 5S vi sono le regioni intergeniche di lunghezza variabile. La lunghezza degli spazi intergenici potrebbe cambiare considerevolmente per specie differenti e anche tra i diversi operoni in una singola cellula, nel caso compaiano operoni multipli (Condon *et al.*, 1995). La differente lunghezza degli spazi intergenici è principalmente dovuta alla presenza di diverse unità funzionali come i geni tRNA. Questi sono presenti nella maggior parte degli organismi studiati in numero variabile da uno o due per spazio (Gurtler and Stanisich, 1996).

I primi tentativi effettuati per analizzare la diversità dei popolamenti naturali sono stati condotti estraendo direttamente l'rRNA cellulare e sequenziando il gene 5S da campioni ambientali (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986). La limitata lunghezza della molecola del 5S rDNA (circa 120 nucleotidi) da un lato permetteva una sufficiente efficienza di estrazione e dall'altro portava ad una limitata risoluzione filogenetica (Olsen *et al.*, 1986). Conseguentemente questo approccio è stato utilizzato con successo unicamente per l'analisi di comunità microbiche con limitata diversità (Stahl *et al.*, 1984; 1985).

Lo sviluppo di robuste e semplici tecniche di clonaggio e lo sviluppo della *Polymerase Chain Reaction* (PCR,) hanno consentito una più alta risoluzione di più complesse comunità usando analisi di sequenze di *Small Sub Unit* rRNA (SSU rRNA). La molecola SSU rDNA è approssimativamente 13 volte più lunga del 5S rDNA e pertanto contiene maggiori informazioni (Head *et al.*, 1998).

La PCR è una tecnica che consente di produrre grandi quantità di uno specifico frammento di DNA da un complesso campione di DNA con una semplice reazione enzimatica. Questa tecnica di reazione a catena è stata introdotta da Mullis and Faloona (1987) ed ha rivoluzionato la genetica molecolare.

La PCR (Fig. 3, schema) sfrutta alcune peculiarità della duplicazione del DNA ad opera della DNA polimerasi quali la necessità di un DNA a filamento singolo come stampo per la sintesi di un filamento complementare, quella di avere un piccolo DNA innesco per iniziare la sintesi e il fatto che la sintesi stessa del DNA avviene solo in direzione 5' a 3'. Lo stampo di DNA a filamento singolo può essere prodotto semplicemente riscaldando il DNA a doppia elica a temperature prossime ai 90°C (denaturazione del DNA).

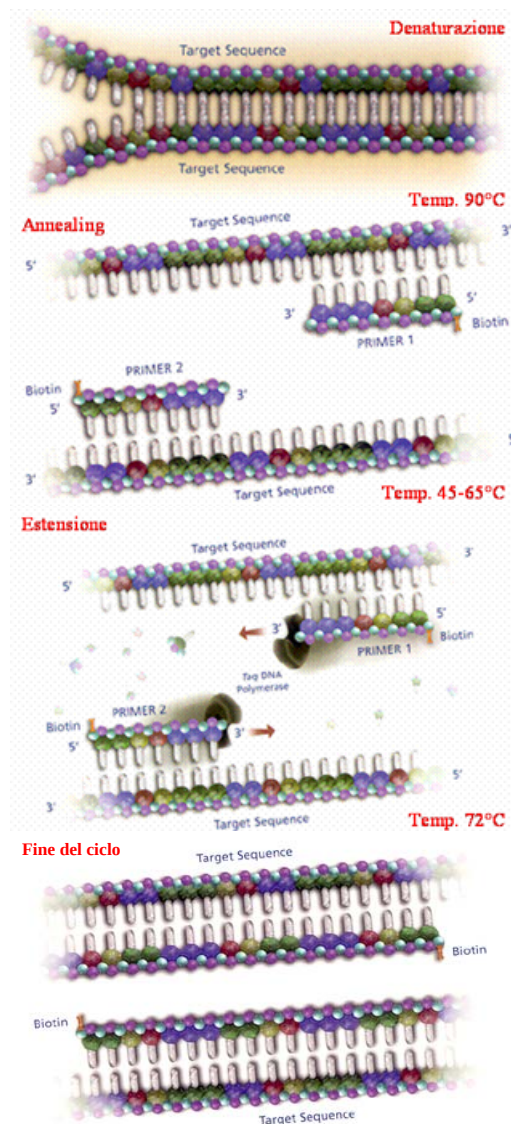


Fig. 3 - Schema Polymerase Chain Reaction (PCR, per la descrizione si veda il testo).

Il punto d'inizio della sintesi del DNA può essere specificato fornendo come innesco un corto oligonucleotide (*primer*) che si appaia allo stampo nelle immediate vicinanze del segmento di DNA che si vuole amplificare.

Aggiungendo un *primer* oligonucleotidico per ciascun filamento, entrambi i filamenti di DNA possono servire da stampo. Una delle caratteristiche più importanti della PCR è la sua specificità che è ottenuta con una progettazione adeguata del *primer* che deve essere di una lunghezza (≥ 20 basi) congrua con la sua sequenza virtualmente unica nel genoma. La reazione della PCR è realizzata utilizzando uno strumento chiamato termociclatore che è in grado di produrre una sequenza di cicli di riscaldamento a temperature controllate. Ogni ciclo (per un totale di circa 30 cicli) è caratterizzato da tre fasi a differente temperatura. Nella prima fase detta di denaturazione, che avviene ad alte temperature ($\sim 90^{\circ}\text{C}$), si ha la separazione dei frammenti; segue una fase di *annealing*, cioè di appaiamento, durante la quale i *primers* si appaiono ai filamenti ($\sim 60^{\circ}\text{C}$). Nell'ultima fase entra in azione la *Taq* polimerasi enzima che consente l'estensione dei filamenti prodotti ($\sim 72^{\circ}\text{C}$).

La sequenza 16S rDNA è contraddistinta da molte regioni conservative affiancate da regioni variabili o ipervariabili. Queste caratteristiche rendono il gene del 16S rDNA estremamente adatto all'uso dei *primer* nella PCR (Stackebrandt and Rainey, 1995).

Nonostante il gene del 16S rDNA sia il più utilizzato in studi di biodiversità vi sono però alcuni problemi inerenti l'uso di questa molecola. In particolare, la lunghezza della molecola 16S è estremamente costante (con una variabilità totale di 200 bp ed una lunghezza media di 1500 bp (Linton *et al.*, 1994; Rainey *et al.*, 1996) e perciò i geni non possono essere separati in base alla loro lunghezza. Le sequenze del 16S rDNA, inoltre, nonostante abbiano regioni ipervariabili ed estremamente informative per valutare strette relazioni tra alcuni microrganismi, spesso non sono così divergenti da dare una buona separazione tra specie che appartengono allo stesso genere (Normand *et al.*, 1996).

Alcuni di questi problemi possono essere risolti utilizzando gli spazi intergenici e, in particolare, lo spazio che c'è tra il 16S ed il 23S. Questa regione intergenica (ITS-1) è estremamente variabile in lunghezza e composizione anche in gruppi tassonomici strettamente relazionati (Gurtler and Stanisich, 1996). Grazie alla sua lunghezza ed alla presenza di un maggior numero di sequenze disponibili per il 16S rispetto al 5S, l'analisi del tratto intergenico 16S-23S è più comune rispetto all'analisi dello spazio compreso tra il 23S e il 5S (Yoon *et al.*, 1997).

Biodiversità e diversità

La biodiversità è spesso confusa con la diversità, tuttavia esistono differenze concettuali tra i due termini (Margalef, 1994; 1997). La biodiversità è la ricchezza tassonomica (o genetica) totale e specifica, contenuta in natura; per chiarezza può essere anche indicata col termine di *global diversity*. La diversità invece è l'effettiva distribuzione degli individui (delle specie) e delle loro biomasse in un particolare tempo e in un dato ecosistema; può essere perciò chiamata *ecodiversity* o *locally active diversity*.

La biodiversità riassume pertanto l'informazione genica totale presente sulla Terra o su parte di essa, mentre la diversità ne è la componente attiva e abbondante in un particolare tempo e spazio. Questa distinzione dà luogo a molti spunti e a discussioni di carattere filosofico oltre che scientifico. Magurran and Henderson (2003) per esempio, analizzando una comunità di pesci di estuario per un periodo di 21 anni, osservarono che alcune specie erano presenti ogni anno con alta abbondanza relativa e le chiamarono *core species*. Le specie rimanenti, presenti con bassa abbondanza e non ogni anno, furono definite *occasional species*. Questi autori hanno attribuito alle *core species* la maggior parte del flusso di carbonio e di energia nell'ecosistema mentre alle *occasional species* una partecipazione secondaria a tali flussi anche con l'eventualità di sparire dall'ecosistema.

Questi concetti di diversità e di biodiversità sono applicabili anche al mondo dei microrganismi (Pedrós-Alió, 2006). I taxa più abbondanti sono i *core taxa* (in

rosso nella figura 4) e sono mantenuti attivi dalla crescita poiché sono ben adattati in un particolare ecosistema. Allo stesso modo essi sono soggetti sia alla predazione che alla lisi virale. Questi taxa pertanto costituiscono la diversità (*gross diversity*) di un ecosistema.

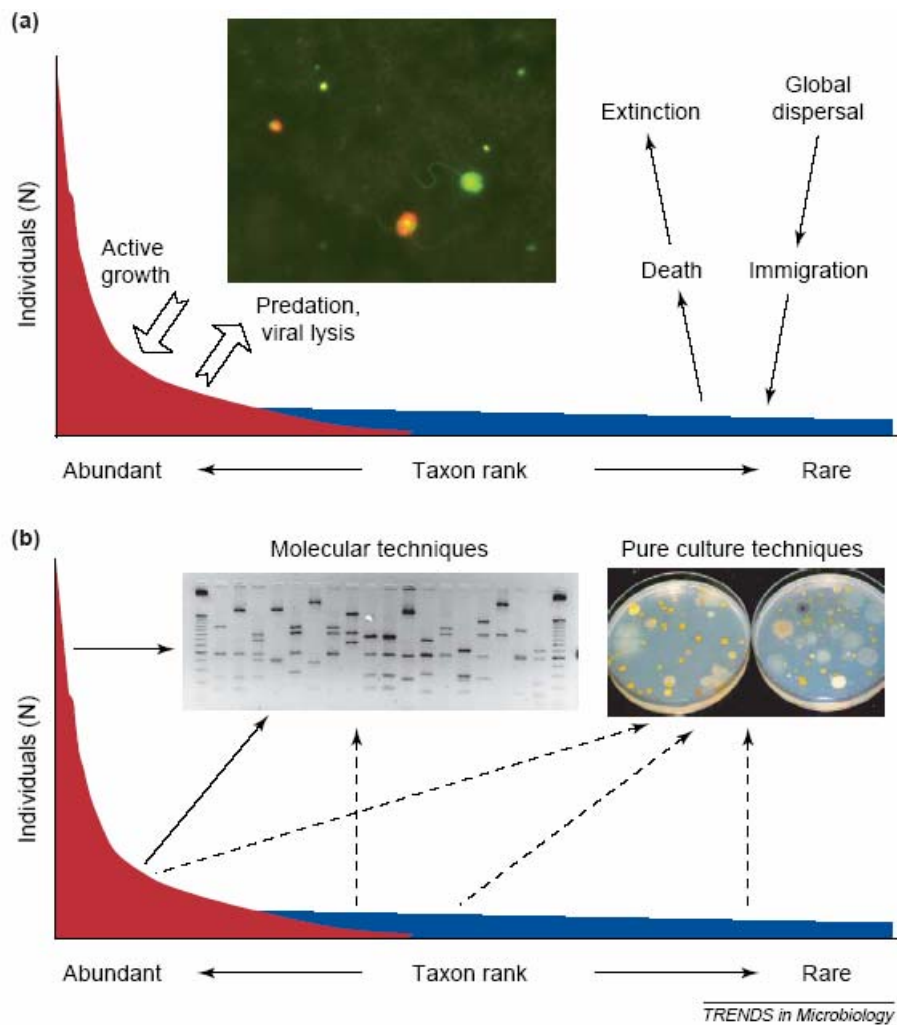


Fig. 4 - Curve Log-normali della biodiversità (in blu) e della diversità (in rosso). La figura in alto (a) descrive i processi che regolano le due componenti 'abundant species' and 'rare species' mentre nella figura in basso (b) sono riportate le tecniche che ci permettono di studiare le due componenti (per una descrizione dettagliata, si rimanda al testo). Da: Pedrós-Alió, 2006.

Nel modello di Pedrós-Alió che pone in relazione l'abbondanza di individui ed i taxa, la coda terminale della curva è composta dai taxa rari (o *seed bank*) e, sommata ai *core taxa*, comporrrebbe la biodiversità (Fig. 4). I taxa della *seed bank* potrebbero quindi essere considerati equivalenti a delle *occasional species*, con un

impatto nullo o comunque statisticamente poco rilevante sul funzionamento dell'ecosistema.

Per i microrganismi far parte dei taxa rari può condurre a delle affascinanti conseguenze ecologiche (Pedrós-Alió, 2007). I taxa rari sono principalmente selezionati mediante l'immigrazione, che è dipendente dalla dispersione da altri ecosistemi. Grazie alle loro piccole dimensioni i microrganismi possono essere dispersi ovunque con estrema facilità (Finlay, 2002; Finlay and Esteban, 2004; Pommier *et al.*, 2005). Perciò è facile immaginare un grande e costante tasso di immigrazione. La diversità della *seed bank* è mantenuta comunque dalla morte di alcuni microrganismi ma con tassi di perdita (uscita dalla coda della curva) estremamente lenti. I principali fattori di perdita di microrganismi sono la competizione per i nutrienti, la lisi virale e la predazione da parte dei protisti (Pernthaler, 2005). Essendo tuttavia i taxa rari composti da così pochi microrganismi (relativamente alla biomassa totale della comunità) sono in realtà meno predati (Thingstad, 2000; Pernthaler, 2005; Jürgens and Matz, 2002). Inoltre sembra accertato che la presenza di predatori, al pari della lisi virale, abbia un impatto positivo in termini di conservazione della diversità batterica mentre vada a influenzare negativamente la biomassa totale del popolamento delle prede (Zhang *et al.*, 2007; Corno and Jürgens, submitted). Come conseguenza di queste complesse interazioni, ci si può aspettare una "lunga coda" dei taxa rari nelle comunità microbiche (in blu nella figura 4; Pedrós-Alió, 2006).

Ma quale porzione di questa curva può essere determinata e con quali tecniche? I taxa rari spesso non vengono efficientemente analizzati utilizzando tecniche come il *cloning* o il sequenziamento con *primers* universali. I *primers* per l'amplificazione ibridizzano, infatti, in maniera predominante i taxa comuni mentre quelli rari rimangono sconosciuti per la stessa ragione per cui i virus hanno un basso tasso di contatto con i taxa rari (Mann, 2003). La situazione può essere migliorata utilizzando *primers* specifici per alcuni gruppi (es. i batteri ammonio-ossidanti). Una grande parte della *seed bank* rimane comunque

sconosciuta con gli attuali strumenti molecolari. Essenzialmente solo i taxa abbondanti sono attualmente accessibili. Alcuni studi hanno dimostrato che taxa con numero di cellule $\geq 1\%$ rispetto al totale possono essere analizzati con le tecniche dipendenti dalla PCR, mentre taxa $< 0.1\%$ sono difficilmente rintracciabili.

Pedrós-Alió (2006) propone che i taxa individuabili con la PCR (quelli cioè più abbondanti) formino la diversità di un ecosistema. Perciò la diversità, con le attuali tecniche molecolari più rapide (le tecniche di *fingerprinting*), può in realtà essere misurata. Ad esempio i taxa abbondanti come il SAR11 (un gruppo di batteri marini che rappresenta il 20-30% del popolamento totale) possono essere individuati e studiati con successo. Anche taxa abitualmente meno abbondanti (1% del totale) ma importanti nei cicli dei nutrienti, come per esempio i batteri ammonio ossidanti, possono essere considerati come *core taxa*. È quindi ragionevole affermare che la maggior parte dei batteri che sono rilevanti e attivi nei flussi di nutrienti, di energia e di carbonio possono costituire la diversità ed essere individuati con le tecniche biomolecolari attualmente disponibili.

In ecologia microbica il concetto di specie, intesa come unità tassonomica su cui si basano i processi ecologici, è stato associato all'unità tassonomica operativa (*operational taxonomic unit*, OTU). Le OTUs corrispondono per esempio alle bande in un gel elettroforetico o ad un picco di un'analisi di *fingerprinting* o anche al singolo clone di una *clone library*.

Tale approccio è fortemente dipendente dal tipo di analisi di *fingerprinting* che viene utilizzata e dalla sua risoluzione. L'utilizzo delle OTUs ricavate da analisi della DGGE come *proxy* per la stima della ricchezza in comunità batteriche (Reche *et al.*, 2005) è stato oggetto di numerosi studi (Lindstrom *et al.*, 2007; Reche *et al.*, 2007). Per altri versi alcune analisi di *fingerprinting* sono più specifiche e possono perciò dare risultati nei quali le OTUs possono rivelarsi molto vicine al concetto di specie. Alcuni studi hanno evidenziato infatti che la diversità fisiologica e genomica, quest'ultima mascherata da identiche sequenze del 16S, è molto più grande di quella fino ad ora assunta (Jaspers and

Overmann, 2004). Grazie allo studio di altri tratti genici come l'ITS-1 (spazio intergenico tra 16S e 23S), si è rilevata l'esistenza di una 'microdiversità' che può avere un'importanza ecologica (Jaspers and Overmann, 2004). Se fino ad ora il livello di risoluzione tassonomica delle OTU nelle analisi di *fingerprinting* sul 16S rDNA era il genere (DGGE e T-RFLP), l'utilizzo delle tecniche di analisi dell'ITS-1 (ARISA) hanno permesso di raggiungere anche il livello di specie ed in alcuni casi di sotto-specie (Hewson and Fuhrman, 2004). La possibilità di legare quindi una diversità genomica allo studio di una diversità funzionale consente di associare il genotipo e l'ecotipo e quindi chiarire il ruolo degli organismi nella comunità.

Il concetto di specie

La definizione di specie biologica comunemente accettata è quella definita da Mayr (1963) che considera le specie gruppi di popolazioni naturali effettivamente o potenzialmente interfecondi e riproduttivamente isolati da altri gruppi analoghi. Questa definizione di specie risulta inapplicabile ai procarioti per i quali è difficile indicare una corretta definizione di specie (Staley *et al.*, 1997; Komárek, 2003). Rossello-Mora and Amann (2001) considerano la definizione di specie *phylo-phenetic* proposta per i batteri come utile e applicabile a tutti i procarioti. Secondo tale definizione, la specie è un gruppo monofiletico di organismi, che ha un alto grado di similarità genetica, e in generale un alto grado di similarità per molte caratteristiche indipendenti diagnosticabili da proprietà fenotipiche discriminanti. Questa definizione si basa su informazioni recuperabili dall'analisi di subunità ribosomiali specifiche del DNA (SSU rDNA). Come regola è accettato che due popolamenti devono mostrare una similarità $\geq 97\%$ per essere considerate come appartenenti alla stessa specie. Tuttavia anche la SSU rDNA non ha abbastanza risoluzione per delineare correttamente molte specie. Una tecnica più potente è la ibridizzazione DNA-DNA. Solitamente due ceppi devono avere più del 70% di ibridizzazione per essere considerati appartenenti ad una stessa specie. Molti

ceppi che mostrano più del 97% di similarità del loro SSU rDNA mostrano valori di ibridizzazione tra il 20 ed il 70%. Al tempo stesso non è detto che due ceppi con ibridizzazione uguale al 70% abbiano una similarità del 97% nel SSU rDNA. Ovviamente analisi di taxa che si basano sul 97% del SSU rDNA di similarità sottostimano ampiamente il numero delle specie se è usato il criterio di ibridizzazione DNA-DNA.

Un concetto alternativo è quello di specie ecologica che definisce una specie come un gruppo di individui che possono essere considerati identici in tutte le proprietà ecologiche rilevanti (Cohan, 2002). Il concetto di specie ecologica è strettamente legato al concetto di nicchia ecologica e quindi può sottovalutare alcune caratteristiche genetiche dell'organismo. La forza del concetto di specie ecologica sta nel fatto che esso si propone di catalogare gli organismi assumendo che il fenotipo sia espressione dell'integrazione delle informazioni genomiche e dell'influenza ambientale. Comunque è difficile riconoscere con certezza le specie ecologiche perché molti organismi possono occupare differenti nicchie ecologiche a causa dell'adattamento o dello sviluppo di cambiamenti durante il corso della vita. Questo concetto preclude anche la considerazione della direzionalità dell'evoluzione e non è in accordo con la visione gerarchica della diversità delle specie (Ereshevsky, 1992).

Uno sviluppo della proposta di Cohan (2002) è stato formalizzato estesamente da Ward e collaboratori (1998) che propongono un *natural species concept* per i procarioti che è simile alla specie ecologica descritta per gli eucarioti.

Nessuna delle tradizionali definizioni di specie si applica adeguatamente a tutti i gruppi di organismi. In effetti la maggior parte di tali definizioni è stata sviluppata senza considerarne l'applicabilità all'organizzazione sistematica dei procarioti. La mancanza di accordo sul concetto microbico di specie ha portato ad un'amplificazione artificiale del numero di specie perché una singola specie può essere identificata con differenti nomi in diverse sotto-discipline (Rossello-Mora and Amann, 2001).

Ecologia e diversità dei picocianobatteri d'acqua dolce

I *Cyanobacteria* costituiscono un regno del dominio *Bacteria* (Olsen *et al.*, 1994) ed esprimono una ricca diversità di habitat e metabolismi (Golden, 1995). La frazione di minori dimensioni di questo taxon è identificata con il termine “picocianobatteri” ed è costituita da organismi con dimensioni comprese tra 0.2 e 2 μm . I picocianobatteri costituiscono la componente fondamentale del picoplancton autotrofo in ambiente marino e nelle acque dolci e sono considerati gli organismi più importanti alla base della catena trofica (Stockner and Antia, 1986; Waterbury *et al.*, 1986; Partensky *et al.*, 1999; Stockner *et al.*, 2000).

Lo studio dell'ecologia, della fisiologia e della tassonomia dei picocianobatteri inizia negli anni '70 e '80 e solo grazie a tecniche di microscopia ad epifluorescenza (Daley and Hobbie, 1975), citometria a flusso (Olson *et al.*, 1985; Chisholm *et al.*, 1988), microscopia elettronica (Johnson and Sieburth, 1982; Takahashi and Hori, 1984), immunofluorescenza (Campbell and Iturriaga, 1988; Shapiro *et al.*, 1989), analisi cromatografica dei pigmenti (Gieskies and Kraay, 1983; Hooks *et al.*, 1988) si è potuto studiare questi organismi più in dettaglio.

Nell'ambito del picoplancton la componente autotrofa è distinguibile da quella eterotrofa grazie alla sua naturale autofluorescenza dovuta alla presenza dei pigmenti fotosintetici. I picocianobatteri (Fig. 5) possiedono caratteristiche di autofluorescenza delle ficobiliproteine che ne permettono un primo riconoscimento (McMurter and Pick, 1994). L'uso della citometria a flusso ha inoltre condotto alla scoperta di un primitivo gruppo di picocianobatteri marini appartenenti al gruppo delle *Prochlorophyta* (Chisholm *et al.*, 1988) che contengono divinil clorofilla-*a* come principale pigmento antenna e divinil clorofilla-*b*, zeaxantina e α carotene come pigmenti accessori (Goericke and Repeta, 1993). Le specie di *Prochlorococcus* coccoidi sono presenti soprattutto negli ecosistemi marini, mentre, negli ambienti d'acqua dolce sono solamente descritte forme filamentose per laghi eutrofici (Burger-Wiersma *et al.*, 1986; Burger-Wiersma, 1991). Dei due altri generi di picocianobatteri a cellule singole,

Cyanobium e *Synechococcus* (Komárek, 1996), il più comune è il *Cyanobium* che ha una forma da sferica a ovale (1-2 μm di lunghezza e 1 μm di larghezza). Il *Synechococcus* ha invece una forma più allungata (3-15 μm di lunghezza e 1-3 μm di larghezza). Il genere *Cyanobium* è più comune negli ecosistemi d'acqua dolce così come il genere *Prochlorococcus* è caratteristico degli ambienti marini. Il genere *Synechococcus* invece ha una distribuzione molto più ampia e può essere sia marino che d'acqua dolce.

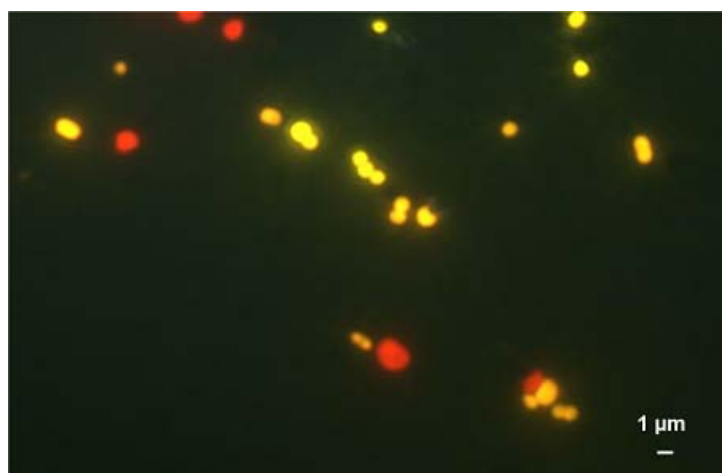


Fig. 5 - Foto al microscopio ad epifluorescenza (filtro blu) del picoplancton autotrofo, in giallo-arancio i picocianobatteri ed in rosso il picofitoplancton eucariota. Da: Callieri, 2008.

I picocianobatteri popolano ambienti d'acqua dolce assai diversi per condizioni trofiche e collocazione geografica. Sono infatti presenti in laghi ultra-oligotrofici come il Lago Baikal (Boraas *et al.*, 1991), in laghi di alta quota (Hawley and Whitton, 1991; Ruggiu *et al.*, 1998), in laghi polari o sub-polari (Vincent, 2000; Allende and Izaguirre, 2003) ed anche in laghi poco profondi eutrofici o in stagni (Vörös *et al.*, 1998). Pur essendo quindi organismi ubiquitari poco è noto sulla composizione specifica delle popolazioni di picocianobatteri lungo il gradiente trofico e sulla loro variabilità stagionale.

Stockner (1991) ha proposto un modello di relazione diretta tra abbondanza (e biomassa) del picoplancton autotrofo e condizioni trofiche dei laghi. Tale modello prevede però che l'importanza relativa del picoplancton autotrofo

aumenti con la diminuzione della concentrazione di fosforo nei laghi. Il modello di Stockner è stato ampiamente accettato e la sua validità è stata confermata in un ampio spettro di sistemi marini e d'acqua dolce (Stockner *et al.*, 2000; Bell and Kalff, 2001). Tuttavia la relazione che guida la presenza e l'importanza di questi organismi in laghi di differente stato trofico si presenta con variazioni considerevoli cosicché il loro successo in un lago oligotrofo non è una certezza, ma una potenzialità (Callieri and Stockner, 2002). Nei laghi oligotrofi i picocianobatteri sono considerati potenziali indicatori dei cambiamenti trofici, tuttavia la loro risposta all'aumento dei nutrienti è estremamente complessa (Schallenberg and Burns, 2001). Si è però evidenziato un aumento del contributo percentuale del picofitoplancton alla biomassa totale fitoplanctonica in laghi ultraoligotrofi (Callieri *et al.*, 2007). In questi laghi il contributo della frazione picoplanctonica alla produzione primaria totale è elevato potendo superare il 50% nei laghi andini nord patagonici (Callieri *et al.*, 2007) e l'80% nel Lago Baikal (Nagata *et al.*, 1994). Nel Lago Maggiore, lago oligo-mesotrofo, misure effettuate nel 1998 hanno mostrato un contributo della frazione picoplanctonica alla produzione totale annua del 20% valore che sale notevolmente se si considera la produzione giornaliera (Callieri and Piscia, 2002).

I picocianobatteri hanno dei vantaggi rispetto al fitoplancton di più grandi dimensioni in questi habitat caratterizzati da poche risorse. Il loro alto rapporto superficie/volume consente a questi organismi una maggiore efficienza nell'assunzione dei nutrienti fatto che conferisce loro un vantaggio competitivo rispetto agli organismi di più grandi dimensioni (Raven, 1986).

Il ciclo stagionale tipico dei picocianobatteri è caratterizzato da un picco primaverile o tardo primaverile seguito da un secondo picco durante la stagione tardo-estiva autunnale (Callieri and Stockner, 2002). Le caratteristiche fisiche della colonna d'acqua (mescolamento invernale e struttura della stratificazione estiva) influiscono notevolmente sull'evoluzione stagionale di questi popolamenti promuovendo sostanziali variazioni interannuali (Weisse

and Kenter, 1991; Padisak *et al.*, 1997). Ovviamente anche altri fattori, per esempio il *grazing*, possono determinare, soprattutto nel periodo tardo-estivo autunnale, variazioni nella loro abbondanza (Callieri *et al.*, 2006).

Sicuramente molte sono le lacune esistenti riguardo l'evoluzione della successione stagionale di specie di picocianobatteri e sui fattori che la determinano.

Le caratteristiche morfologiche dei picocianobatteri, infatti, così come degli altri procarioti e degli eucarioti di piccole dimensioni, sono insufficienti per consentirne una corretta individuazione tassonomica. I primi studi tassonomici sui batteri si basavano sulla diagnosi delle proprietà fisiologiche che gli organismi esprimevano in colture pure (Rippka, 1988). Studi ultrastrutturali, analisi ecologiche ed in particolare analisi molecolari hanno sostanzialmente migliorato i criteri per la loro classificazione.

L'introduzione della biologia molecolare in ecologia microbica ha rivoluzionato le nostre conoscenze degli ecosistemi acquatici. Per la prima volta, è stato possibile determinare la composizione del compartimento picoplanctonico senza avere bisogno né di osservarlo al microscopio né di coltivarlo. Questo è stato possibile grazie al sequenziamento di un gene presente in tutti gli organismi che codifica per piccole sub-unità (SSU): il 16S rDNA. Le analisi delle sequenze hanno consentito di determinare la posizione filogenetica negli alberi costruiti con le sequenze stesse e ha fornito uno strumento molto potente nella stima delle relazioni filogenetiche tra ceppi con sequenze omologhe.

Alcuni studi recenti hanno dimostrato come ceppi di cianobatteri e picocianobatteri con identico morfotipo in realtà presentassero differenze nelle loro sequenze del 16S rDNA (Willame *et al.*, 2006). Queste considerazioni mostrano, come già sottolineato (Komárek, 2003), l'importanza di utilizzare un approccio polifasico (morfologico e molecolare) per un approfondito studio tassonomico di questi microrganismi.

Accanto all'utilizzo del 16S rDNA come marker molecolare, recentemente è stato introdotto anche l'uso dello spazio intergenico (ITS-1) tra i geni 16S rDNA

e il 23S rDNA. L'utilizzo dell'ITS-1 sia negli studi di analisi di diversità morfo-funzionale che in quelli filogenetici di evoluzione molecolare si è dimostrato potenzialmente un ottimo strumento per l'indagine su questi microrganismi (Ernst *et al.*, 2003; Janse *et al.*, 2003; Taton *et al.*, 2006). Tuttavia sono da tenere in considerazione alcuni problemi derivanti dalla possibilità che in questa regione intergenica nei cianobatteri compaiano molteplici operoni di RNA ribosomiale non identici (Boyer *et al.*, 2001). Infatti a volte la regione ITS-1 contiene uno o due operoni tRNA (o tRNA^{Glu}, tRNA^{Ala}) od entrambi (tRNA^{Ala} e tRNA^{Ile}; Iteman *et al.*, 2000).

I due diversi approcci molecolari (16S rDNA più ITS-1) hanno consentito di trovare una maggiore diversità di OTU rispetto a quanto permesso dalla indagine morfologica e di ottenere con il marcatore ITS-1 una stima simile, ma sicuramente più chiara e definita di quella ottenibile con il 16S rDNA (Taton *et al.*, 2006).

Attualmente, però, gli studi di diversità sui picocianobatteri si focalizzano prevalentemente su alberi filogenetici, e quindi sulla divergenza negli alberi prodotta dalle sequenze, piuttosto che sulle caratteristiche morfologiche o sulle implicazioni ecologico-funzionali della loro distribuzione. È sempre importante comunque considerare anche la diversità fenotipica insieme ai risultati derivati dalle analisi genetiche per valutare in che misura la similarità fenotipica rifletta relazioni filogenetiche o sia il frutto di evoluzione convergente (Callieri, 2008).

A tal proposito è ampiamente noto, ad oggi, che microrganismi precedentemente classificati nel genere *Synechococcus*, a volte riferito come "Colture Group", devono essere ulteriormente classificati in generi distinti (Honda *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2001). Dal lavoro pubblicato da Honda e collaboratori (1999) sulla filogenesi dei cianobatteri attraverso il sequenziamento del gene 16S rDNA, si evince che ulteriori studi sono necessari per chiarire le reali relazioni filogenetiche del genere *Synechococcus* che per ora si può considerare polifiletico, cioè senza un antenato noto e quindi un taxon "non naturale". Sono stati costruiti alberi filogenetici, basati sull'analisi dei geni

sequenziati usando 16S rDNA, ITS-1 e *cpcBA*-IGS (locus genico che codifica per le subunità alfa e beta della ficocianina, con una parte intergenica; Robertson *et al.*, 2001; Crosbie *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2003). Malgrado alcune incertezze da questi studi emergono considerazioni sull'evoluzione filogenetica del *Synechococcus*. Vi sono almeno 7 cluster di picocianobatteri non marini nell'albero disegnato da Urbach e collaboratori (1998; vedi Crosbie *et al.*, 2003 Fig. 6). A questo stadio della ricerca si è solo all'inizio della comprensione dell'evoluzione e della tassonomia dei picocianobatteri. Questa percezione è immediatamente chiara quando si esamina la filogenesi dei generi *Synechococcus* e *Cyanobium*. All'interno della radiazione dei cianobatteri, per esempio, i membri del sub-cluster 5-2 (Crosbie *et al.*, 2003) del *Synechococcus* marino non possiedono ficoeritrina e sono alo-tolleranti; questi sono gruppi vicini del genere-forma *Cyanobium* del Subalpine Subcluster II (Everroad and Wood, 2006). In questo senso l'inclusione di altri marker genetici e di ceppi provenienti da differenti ambienti acquatici (sia marini che di acque dolci) potrebbe cambiare la differenziazione tra i cluster, introducendo nuove prospettive sull'evoluzione dei taxa (Callieri, 2008).

Nonostante siano per ora pochi gli studi avviati per stimare la diversità dei picocianobatteri sono però disponibili metodologie che ne permettono l'individuazione a livello di unità tassonomica operativa (OTU). Questo apre nuove prospettive allo studio della successione e composizione della biocenosi picocianobatterica consentendo di migliorare le nostre conoscenze sulle nicchie ecologiche occupate da questi organismi e sugli eventuali adattamenti fisiologici che le OTU possono esprimere in determinate condizioni ambientali. Questi approcci molecolari applicati allo studio dei picocianobatteri hanno rivelato ancor di più la loro distribuzione globale. Nel Lago di Costanza, le analisi di Real-Time (R-T) PCR, e DGGE sono state usate per valutare se ceppi di picocianobatteri (ricchi in ficoeritrina, PE) strettamente relazionati tra loro possano essere definiti sub-popolamenti locali e distinti di picocianobatteri (Becker *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2007).

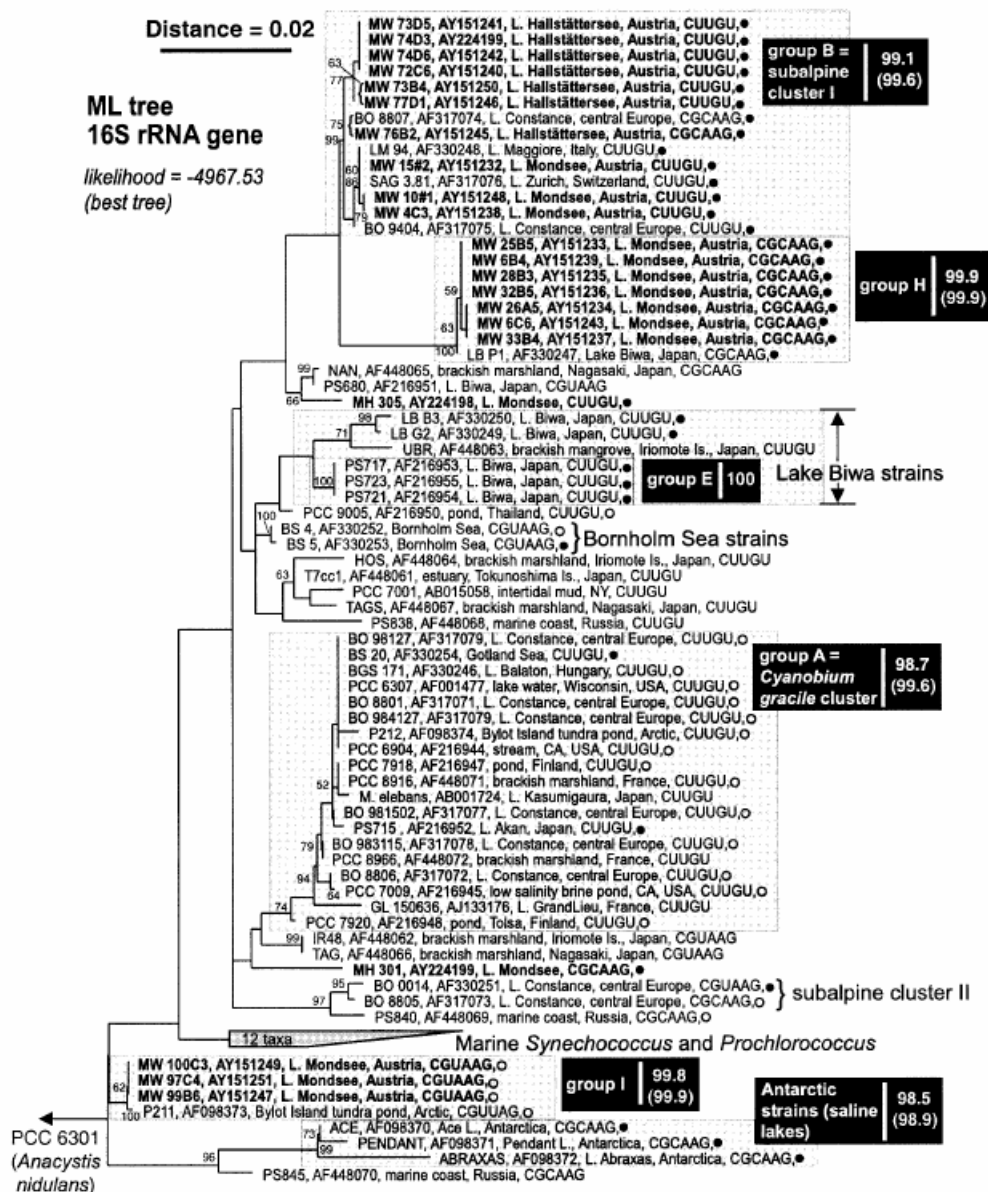


Fig. 6 - Albero filogenetico (*Maximum Likelihood*) picofitoplancton *sensu* Urbach (1998) costruito da sequenze del 16S rDNA. Per ogni sequenza sono indicate, il numero di accesso in GenBank, l'ambiente di isolamento e la pigmentazione (cerchio vuoto, PC-rich; cerchio pieno PE-Rich). Da: Crosbie *et al.*, 2003.

Nel Mar Arabico le analisi molecolari della comunità picocianobatterica hanno rivelato una distribuzione spaziale di differenti ecotipi lungo un transetto orizzontale (Fuller *et al.*, 2006).

I picocianobatteri sono stati spesso considerati *shade organisms* (Soumia, 1982) e quindi capaci di attività fotosintetica anche a basse intensità di radiazione.

Tuttavia la presenza di picchi di abbondanza di picocianobatteri a diverse profondità nella colonna d'acqua (Callieri and Piscià, 2002) indica l'esistenza di ceppi adattati a diverse condizioni di luce. Risultati simili sono stati ottenuti anche in ambienti marini nei quali inoltre sono stati studiati diversi aspetti genetici in relazione all'ecofisiologia di *Synechococcus* e di *Prochlorococcus* (Ahlgren and Roca, 2006; Fuller *et al.*, 2006).

Nei picocianobatteri la presenza di particolari pigmenti fotosintetici accessori (le ficobiliproteine) ne permette la crescita in diverse condizioni, qualitative e quantitative, di radiazione subacquea. A seconda della predominanza della ficoeritrina o della ficocianina, questi organismi hanno capacità di assorbire ed utilizzare rispettivamente la radiazione verde o rossa, come è emerso da sperimentazione in laboratorio (Stomp *et al.*, 2004) e da indagini nell'ambiente naturale (Vörös *et al.*, 1998; Stomp *et al.*, 2007). Questi pigmenti antenna rendono i picocianobatteri organismi molto efficienti nell'utilizzare la scarsa radiazione luminosa, presente al limite inferiore della zona eufotica (Callieri and Piscià, 2002; Callieri *et al.*, 2005).

Scopi della ricerca

I picocianobatteri sono procarioti fototrofi ubiquitari, responsabili del 70-80% della produttività primaria negli ecosistemi marini. Negli ambienti di acqua dolce la loro importanza rispetto alle altre componenti fitoplanctoniche aumenta negli ambienti oligotrofi sia in termini di biomassa che di produzione primaria (Bell and Kalff 2001; Callieri and Stockner, 2002).

Riconosciuta l'importanza di tali organismi negli ambienti acquatici ne consegue la necessità dello studio della loro ecologia ancora per alcuni versi poco approfondito. Lo studio della biodiversità dei picocianobatteri di acqua dolce è stato affrontato in questa tesi con lo scopo di ampliare le conoscenze sulla loro diversità genotipica e sulle connessioni tra genotipo ed ecotipo. Nell'ultimo decennio numerosi lavori (Urbach *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1999; Rocop *et al.*, 2002) hanno sviluppato il tema della diversità genotipica e fenotipica dei picocianobatteri in ambiente marino. Relativamente meno dati invece sono disponibili sulla biodiversità dei picocianobatteri d'acqua dolce.

Lo studio morfologico è considerato inapplicabile oramai per studiare la diversità dei microrganismi così come però, il singolo dato ottenuto da analisi molecolari, non consente di dare informazioni complete sulla biodiversità di una comunità microbica.

Gli attuali metodi di isolamento non consentono un adeguato studio dell'immensa estensione della diversità microbica nell'ambiente naturale (Nübel *et al.*, 1999) soprattutto alla luce della coltivabilità dei microrganismi che risulta essere molto bassa in quasi tutti gli habitat (<1%, Amann *et al.*, 1995). Lo sviluppo di metodi di analisi della diversità colture indipendenti ha permesso di ottenere informazioni sulla diversità molto più di quanto i metodi colturali avevano fatto in passato (Pace, 1997).

In questa tesi verrà presentato un approccio molecolare per lo studio dei picocianobatteri, utilizzando diverse tecniche di *fingerprinting*. Queste tecniche permettono di studiare la diversità (*sensu* Margalef, 1994, 1997) ed in particolare la diversità microbica nel senso proposto da Pedrós-Alió (2006) vale a dire

legando il dato di diversità genetica alla funzione che gli organismi hanno nella comunità. Con questo approccio quindi si pongono le basi per la connessione tra le analisi molecolari e le analisi ecologiche. Spesso, infatti, con le analisi molecolari sono state generate moltissime sequenze geniche, che sono andate a riempire le rispettive banche dati, senza però considerare il reale ruolo ecologico che tali sequenze, e quindi i rispettivi microrganismi, potevano avere nell'ecosistema naturale.

Pertanto l'approccio qui presentato non sarà esclusivamente molecolare, ma sarà legato anche al ritrovamento di particolari adattamenti eco-fisiologici che alcuni microrganismi (ecotipi) possono sviluppare in determinate condizioni ambientali

Struttura della tesi

Nel primo capitolo sono state confrontate le tecniche di indagine molecolare colture-indipendenti (tecniche di *fingerprinting*) utilizzate sia per gli esperimenti sulle comunità artificiali che per studiare le dinamiche nelle comunità naturali lacustri. La novità di tali esperimenti è stata quella di aver utilizzato non soltanto il 16S rDNA ma anche il singolare tratto genico (ITS-1). Alcune ricerche hanno infatti dimostrato che studi effettuati solo sul 16S rDNA non sono considerate sufficienti per stabilire l'identità di specie né è appropriato utilizzarle per studi ad un livello sottogenerico (Boyer *et al.*, 2001, Ernst *et al.*, 2003).

Lo studio delle tecniche di *fingerprinting* utilizzando comunità artificiali utili per un confronto metodologico è stato esteso, nei capitoli successivi, alle comunità naturali. In particolare si è studiata la dinamica stagionale della struttura della comunità naturale di picocianobatteri analizzando la diversità delle OTUs con T-RFLP and ARISA. Nel secondo capitolo si è analizzata la comunità picocianobatterica del Lago Maggiore nel contesto della sua evoluzione stagionale, in un ambiente noto dove questi organismi sono studiati da molti anni.

Nel terzo capitolo infine è stata analizzata la diversità della comunità di picocianobatteri di un distretto di laghi ultraoligotrofi andini alla luce delle caratteristiche fotosintetiche degli organismi stessi e delle peculiari condizioni ambientali di questi laghi.

Il progetto di ricerca oggetto di studio di questa tesi è stato svolto presso i laboratori del CNR - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (Verbania), sotto la supervisione della Dr. Cristiana Callieri, responsabile del laboratorio di Ecologia Microbica.

Bibliografia

- Ahlgren, N.A. and G. Rocap. 2006. Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7193-7204.
- Allende, L. and I. Izaguirre. 2003. The role of physical stability on the establishment of steady states in the phytoplankton community of two Maritime Antarctic lakes. *Hydrobiologia*, 502: 211-224.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Balvanera, P., A.B. Pfisterer, N. Buchmann, J.S. He, T. Nakashizuka, D. Raffaelli and B. Schmid. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters*, 9: 1146-1156.
- Becker, S., M. Fahrbach, P. Boger and A. Ernst. 2002. Quantitative tracing, by Taq nuclease assays, of a *Synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4486-4494.
- Becker, S., P. Richl and A. Ernst. 2007. Seasonal and habitat-related distribution pattern of *Synechococcus* genotypes in Lake Constance. *Fems Microbiology Ecology*, 62: 64-77.
- Bell, T. and J. Kalff. 2001. The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography*, 46: 1243-1248.
- Boraas, M.E., D.W. Bolgrien and D.A. Holen. 1991. Determination of Eubacterial and Cyanobacterial Size and Number in Lake Baikal Using Epifluorescence. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 76: 537-544.
- Boyer, S.L., V.R. Flechtner and J.R. Johansen. 2001. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1057-1069.
- Burger-Wiersma, T. 1991. *Prochlorothrix hollandica*: a filamentous prokaryotic species containing chlorophylls *a* and *b*. *Algological Studies*, 64: 555-558.
- Burger-Wiersma, T., M. Veenhuis, H.J. Korthals, C.C.M. Van de Wiel and L.R. Mur. 1986. A new prokaryote contain chlorophylls *a* and *b*. *Nature*, 320: 262-264.
- Callieri, C. 2008. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1.
- Callieri, C. and R. Piscia. 2002. Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47: 941-956.
- Callieri, C. and Stockner, J.G. 2002. Freshwater autotrophic picoplancton: a review. *Journal of Limnology*, 61: 1-14.
- Callieri, C., E. Caravati, G. Morabito and A. Oggioni. 2006. The unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus* and mixotrophic flagellates: evidence for a functional association in an oligotrophic, subalpine lake. *Freshwater Biology*, 51: 263-273.
- Callieri, C., B. Modenutti, C. Queimalinos, R. Bertoni and E. Balseiro. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41: 511-523.

- Callieri, C., S. Moro, E. Caravati, N.D. Crosbie and T. Weisse. 2005. Strain specific photosynthetic response of freshwater picocyanobacteria. *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 29: 777-782.
- Campbell, L. and R. Iturriaga. 1988. Identification of *Synechococcus* spp. in the Sargasso Sea by immunofluorescence and fluorescence excitation spectroscopy performed on individual cells. *Limnology and Oceanography*, 33: 1196-1201.
- Carr, M.H., T.W. Anderson and M.A. Hixon. 2002. Biodiversity, population regulation, and the stability of coral-reef fish communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 11241-11245.
- Chisholm, S.W., R.J. Olson, E.R. Zettler, R. Goericke, J.B. Waterbury and N.A. Welschmeyer. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334: 340-343.
- Clark, J.S. and J.S. McLachlan. 2003. Stability of forest biodiversity. *Nature*, 423: 635-638.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, 56: 457-487.
- Condon, C., C. Squires and C.L. Squires. 1995. Control of Ribosomal-Rna Transcription. In *Escherichia-Coli. Microbiological Reviews*, 59: 623-645.
- Corno, G. and K. Jürgens (submitted). Structural and functional patterns of bacterial communities along experimental predation and productivity gradients. *Environmental Microbiology*.
- Crosbie, N.D., M. Pöckl and T. Weisse. 2003. Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer sequence Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5716-5721.
- Daley, R.J. and J.E. Hobbie. 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnology and Oceanography*, 20: 875-882.
- Dodson, S.I., S.E. Arnott and K.L. Cottingham. 2000. The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology*, 81: 2662-2679.
- Ereshevsky, M. 1992. *The Units of Evolution: Essays on the Nature of Species*. Cambridge MA: MIT Press.
- Ernst, A., S. Becker, U.I.A. Wollenzien and C. Postius. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology*, 149: 217-228.
- Everroad, R.C. and A.M. Wood. 2006. Comparative molecular evolution of newly discovered picocyanobacterial strains reveals a phylogenetically informative variable region of beta-phycoerythrin. *Journal of Phycology*, 42: 1300-1311.
- Finlay, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296: 1061-1063.
- Finlay, B.J. and G.F. Esteban. 2004. Ubiquitous dispersal of free-living microorganisms. In: A.T. Bull (Ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*. ASM Press: 216-224.
- Fuller, N.J., G.A. Tarran, M. Yallop, K.M. Orcutt and D.J. Scanlan. 2006. Molecular analysis of picocyanobacterial community structure along an Arabian Sea transect reveals distinct spatial separation of lineages. *Limnology and Oceanography*, 51: 2515-2526.
- Gieskes, W.W.C. and G.W. Kraay. 1983. Unknown chlorophyll a derivatives in the North Sea and Tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnology and Oceanography*, 28: 756-766.

- Giller, P.S., H. Hillebrand, U.G. Berninger, M.O. Gessner, S. Hawkins, P. Inchausti *et al.* 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos*, 104: 423-436.
- Goericke, R. and D.J. Repeta. 1993. Chlorophyll-a and Chlorophyll-B and Divinyl Chlorophyll-a and Chlorophyll-B in the Open Subtropical North-Atlantic Ocean. *Marine Ecology-Progress Series*, 101: 307-313.
- Golden, S.S. 1995. Light-Responsive Gene-Expression in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 177: 1651-1654.
- Gurtler, V. and V.A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology-Uk*, 142: 3-16.
- Guttell, R.R., N. Larsen and C.R. Woese. 1994. Lessons from an Evolving Ribosomal-Rna - 16s and 23s Ribosomal-Rna Structures from a Comparative Perspective. *Microbiological Reviews*, 58: 10-26.
- Hariston, N.G., J.D. Allan, R.K. Colwell, D.J. Futujama, J. Howell, M.D. Lubin *et al.* 1968. The relationship between species diversity and stability: an experimental approach with protozoa and bacteria. *Ecology*, 49: 1091-1101.
- Hawley, G.R.W. and B.A. Whitton. 1991. Survey of algal picoplankton from lakes in five continents. *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 24: 1220-1222.
- Head, I.M., J.R. Saunders and R.W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35: 1-21.
- Hewson, I. and J.A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3425-3433.
- Honda, D., A. Yokota and J. Sugiyama. 1999. Detection of Seven Major Evolutionary Lineages in Cyanobacteria Based on the 16S rRNA Gene Sequence Analysis with New Sequences of Five Marine *Synechococcus* Strains. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 723-739.
- Hooks, C.E., R.R. Bridigare, D.M. Keller and R.L. Guillard. 1988. Coccoid eukaryotic marine ultraplankters with four different HPLC pigment signatures. *Journal of Phycology*, 24: 571-580.
- Hooper, D.U., F.S. Chapin, J.J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel *et al.* 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75: 3-35.
- Iteman, I., R. Rippka, N.T. de Marsac and M. Herdman. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, 146: 1275-1286.
- Ives, A.R., J.L. Klug and K. Gross. 2000. Stability and species richness in complex communities. *Ecology Letters*, 3: 399-411.
- Janse, I., M. Meima, W.E.A. Kardinaal and G. Zwart. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6634-6643.
- Jaspers, E. and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4831-4839.
- Johnson, P.W. and J.M. Sieburth 1982. In situ morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *Journal of Phycology*, 18: 318-327.

- Jürgens, K. and C. Matz. 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81: 413-434.
- Komárek, J. 1996. Towards a combined approach for the taxonomic and species delimitation of picoplanktic cyanoprokaryotes. *Algological Studies*, 83: 377-401.
- Komárek, J. 2003. Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria. *Algological Studies*, 109: 281-297.
- Lan, R.T. and P.R. Reeves. 1996. Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 47-55.
- Lawrence, J.G. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 519-523.
- Lawrence, J.G. 2002. Gene transfer in bacteria: Speciation without species? *Theoretical Population Biology*, 61: 449-460.
- Lindstrom, E.S., A. Eiler, S. Langenheder, S. Bertilsson, S. Drakare, H. Ragnarsson and L.J. Tranvik. 2007. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? Comment. *Ecology*, 88: 252-253.
- Linton, D., F.E. Dewhirst, J.P. Clewley, R.J. Owen, A.P. Burnens and J. Stanley. 1994. 2 Types of 16s Ribosomal-Rna Gene Are Found in Campylobacter-Helveticus - Analysis, Applications and Characterization of the Intervening Sequence Found in Some Strains. *Microbiology-Uk*, 140: 847-855.
- Loreau, M., S. Naeem, P. Inchausti, J. Bengtsson, J.P. Grime, A. Hector *et al.* 2001. Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science*, 294: 804-808.
- MacArthur, R.H. and E.O. Wilson. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton: Princeton University Press.
- Magurran, A.E. and P.A. Henderson. 2003. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 422: 714-716.
- Mann, N.H. 2003. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *Fems Microbiology Reviews*, 27: 17-34.
- Margalef, R. 1994. Diversity and biodiversity - their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 66: 3-14.
- Margalef, R. 1997. *Our Biosphere*: Ecology Institute.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- McMurter, H.J.G. and F.R. Pick. 1994. Fluorescence Characteristics of a Natural Assemblage of Fresh-Water Picocyanobacteria. *Journal of Plankton Research*, 16: 911-925.
- Mittelbach, G.G., C.F. Steiner, S.M. Scheiner, K.L. Gross, H.L. Reynolds, R.B. Waide *et al.* 2001. What is the observed relationship between species richness and productivity? *Ecology*, 82: 2381-2396.
- Morris, C.E., M. Bardin, O. Berge, P. Frey-Klett, N. Fromin, H. Girardin *et al.* 2002. Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 592-616.
- Mullis, K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Nagata, T., K. Takai, K. Kawanobe, D.S. Kim, R. Nakazato, N. Guselnikova *et al.* 1994. Autotrophic Picoplankton in Southern Lake Baikal - Abundance, Growth and Grazing Mortality During Summer. *Journal of Plankton Research*, 16: 945-959.

- Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra and P. Simonet. 1996. ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*: 1-12.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel, M. Kuhl and G. Muyzer. 1999. Spatial scale and the diversity of benthic cyanobacteria and diatoms in a salina. *Hydrobiologia*, 401: 199-206.
- Olsen, G.J., C.R. Woese and R. Overbeek. 1994. The Winds of (Evolutionary) Change - Breathing New Life into Microbiology. *Journal of Bacteriology*, 176: 1-6.
- Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni and N.R. Pace. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual review of microbiology*, 40: 337-365.
- Olson, R.J., D. Vaultot and S.W. Chisolm. 1985. Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep Sea Research*, 32: 1273-1280.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734-740.
- Pace, N.R., D.A. Stahl, J.L.D. Lane and J.O.G. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 9: 1-55.
- Padisak, J., L. Krienitz, R. Koschel and J. Nedoma. 1997. Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*, 32: 403-416.
- Partensky, F., W.R. Hess and D. Vaultot. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 106-127.
- Pedrós-Alió, C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14: 257-263.
- Pedrós-Alió, C. 2007. Dipping into the rare biosphere. *Science*, 315: 192-193.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 537-546.
- Pisabarro, A., A. Correia and J.F. Martin. 1998. Characterization of the *rrnB* operon of the plant pathogen *Rhodococcus fascians* and targeted integrations of exogenous genes at *rrn* loci. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1276-1282.
- Pommier, T., J. Pinhassi and A. Hagstrom. 2005. Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 41: 79-89.
- Rainey, F.A., N.L. WardRainey, P.H. Janssen, H. Hippe and E. Stackebrandt. 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology-Uk*, 142: 2087-2095.
- Raven, J.A. 1986. Physiological consequences of extremely small size for autotrophic organisms in the sea. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, 214: 1-70.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, R. Morales-Baquero and E.O. Casamayor. 2005. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology*, 86: 1715-1722.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, R. Morales-Baquero and E.O. Casamayor. 2007. Does ecosystem size determine aquatic bacteria richness? Reply. *Ecology*, 88: 253-255.
- Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167: 3-27.
- Robertson, B.R., N. Tezuka and M.M. Watanabe. 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 861-871.
- Rocap, G., Distel, D.L., Waterbury, J.B., and Chisholm, S.W. (2002) Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA

- internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1180-1191.
- Rosenzweig, M.L. 1995. *Species diversity in space and time*. Cambridge: University Press.
- Rossello-Mora, R. and R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews*, 25: 39-67.
- Ruggiu, D., R. Bertoni, C. Callieri, M. Manca and A.M. Nocentini. 1998. Assessment of biota in lakes from the Khumbu Valley, High Himalayas. In: G. Tartari, R. Baudo, and M. Munavar. (Eds), *Top of the world environmental research*. Ecovision World Monograph Series: 219-233.
- Schallenberg, M. and C.W. Burns. 2001. Tests of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient enrichment in an ultra-oligotrophic lake. *Freshwater Biology*, 46: 27-37.
- Shapiro, L.P., E.M. Haugen, D.M. Keller, R.R. Bridigare, L. Campbell and R.L. Guillard. 1989. Taxonomic affinities of marine coccoid ultraplankton: a comparison of immunochemical surface antigen cross-reactions and HPLC chloroplast pigment signatures. *Journal of Phycology*, 25: 794-797.
- Soumia, A. 1982. Is there a shade flora in marine plankton? *Journal of Plankton Research*, 4: 391-399.
- Stackebrandt, E. and F.A. Rainey. 1995. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In: A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, F. J. De Bruijn (Eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht, Kluwer: 1-17.
- Stahl, D.A., D.J. Lane, G.J. Olsen and N.R. Pace. 1984. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*, 224: 409-411.
- Stahl, D.A., D.J. Lane, G.J. Olsen and N.R. Pace. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S ribosomal RNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1379-1384.
- Staley, J.T., R.W. Castenholz, R.K. Colwell, J.G. Holt, M.D. Kane, N.R. Pace *et al.* 1997. *The Microbial World: Foundation of the Biosphere. A report from the American Academy of Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology.
- Stockner, J.G. 1991. Autotrophic Picoplankton in Fresh-Water Ecosystems - the View from Th Summit. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 76: 483-492.
- Stockner, J.G. and N.J. Antia. 1986. Algal Picoplankton from Marine and Freshwater Ecosystems: A Multidisciplinary Perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43: 2472-2503.
- Stockner, J.G., C. Callieri and G. Cronberg. 2000. Picoplankton and Other Non Bloom-Forming Cyanobacteria in Lakes. In: B.A. Whitton and M. Potts. (Eds), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 195-231.
- Stomp, M., J. Huisman, F. de Jongh, A.J. Veraart, D. Gerla, M. Rijkeboer *et al.* 2004. Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432: 104-107.
- Stomp, M., J. Huisman, L. Vörös, F.R. Pick, M. Laamanen, T. Haverkamp and L.J. Stal. 2007. Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters*, 10: 290-298.
- Swift, M.J. 1974. Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. In: J.M. Anderson and A. McFadyen. (Eds), *The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes*. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 185-221.

- Takahashi, M. and T. Hori. 1984. Abundance of picophytoplankton in the subsurface chlorophyll maximum layer in subtropical and tropical waters. *Marine Biology*, 79: 177-186.
- Taton, A., S. Grubisic, P. Balthasart, D.A. Hodgson, J. Laybourn-Parry and A. Wilmotte. 2006. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *Fems Microbiology Ecology*, 57: 272-289.
- Thingstad, T.F. 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 45: 1320-1328.
- Tilman, D. 1993. Species Richness of Experimental Productivity Gradients - How Important Is Colonization Limitation. *Ecology*, 74: 2179-2191.
- Tilman, D. 1994. Competition and Biodiversity in Spatially Structured Habitats. *Ecology*, 75: 2-16.
- Urbach, E., D.J. Scanlan, D.L. Distel, J.B. Waterbury and S.W. Chisholm. 1998. Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution*, 46: 188-201.
- VandePeer, Y., S. Chapelle and R. DeWachter. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24: 3381-3391.
- Vincent, W.F. 2000. Cyanobacterial dominance in polar regions. In: B.A. Whitton and M. Potts. (Eds), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers: 321-340.
- Vörös, L., C. Callieri, K.V. Balogh and R. Bertoni. 1998. Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia*, 370: 117-125.
- Ward, D.M., M.J. Ferris, S.C. Nold and M.M. Bateson. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1353-1370.
- Ward, D.M., M.M. Bateson, R. Weller and A.L. Ruffroberts. 1992. Ribosomal-Rna Analysis of Microorganisms as They Occur in Nature. *Advances in Microbial Ecology*, 12: 219-286.
- Waterbury, J.B., S.W. Watson, F.W. Valois and D.G. Franks. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, 214: 71-120.
- Weisse, T. and U. Kenter. 1991. Ecological Characteristics of Autotrophic Picoplankton in a Prealpine Lake. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 76: 493-504.
- Willame, R., C. Boutte, S. Grubisic, A. Wilmotte, J. Komarek and L. Hoffmann. 2006. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology*, 42: 1312-1332.
- Wilson, E.O. 1994. *Naturalist*. New York, Warner Books.
- Wimp, G.M. and T.G. Whitham. 2001. Biodiversity consequences of predation and host plant hybridization on an aphid-ant mutualism. *Ecology*, 82: 440-452.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- Woese, C.R., O. Kandler and M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 4576-4579.
- Yoon, J.H., S.T. Lee, S.B. Kim, M. Goodfellow and Y.H. Park. 1997. Inter- and intraspecific genetic analysis of the genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 661-669.

Zhang, R., M.G. Weinbauer and P.Y. Qian. 2007. Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters. *Environmental Microbiology*, 9: 3008-3018.

I Capitolo: Approccio molecolare allo studio della diversità dei picocianobatteri

Introduzione

La difficoltà di studiare la diversità dei microrganismi basandosi su osservazioni morfologiche e la complessità di isolare e coltivare un numero molto elevato di genotipi importanti dal punto di vista ecologico (Scanlan and West, 2002), ha indirizzato la comunità scientifica verso lo studio di differenze specifiche a livello genetico, come mezzo per una adeguata definizione delle comunità microbiche con tecniche "coltura-indipendenti", cioè non basate sull'isolamento ed il mantenimento in coltura di organismi. Le nuove tecniche basate su un approccio molecolare hanno rivelato in generale una diversità microbica molto più elevata rispetto a quella precedentemente evidenziata con i metodi "coltura-dipendenti" (Pace, 1997).

Esistono diverse tecniche di analisi biomolecolare che consentono di studiare la diversità microbica. La più comune è il *cloning*, mediante la quale precise informazioni filogenetiche degli organismi di una comunità microbica possono essere dedotte dal sequenziamento dei prodotti di PCR di geni *target* clonati. Altri approcci "coltura-indipendenti" sono stati sviluppati recentemente per studiare la diversità delle comunità microbiche. Ad esempio, la metagenomica permette di isolare geni direttamente dalle comunità senza l'utilizzo né della PCR né dell'isolamento (Venter *et al.*, 2004). Sia la metagenomica che il *cloning* però, sono ancora oggi molto dispendiosi in termini di tempo e di denaro. Esistono tuttavia altre tecniche di analisi, oramai molto comuni, come le Tecniche di *Fingerprinting* (FTs) che sono considerate uno strumento molto potente per studiare la diversità dei membri dominanti della comunità batteriche (Pedrós-Alió, 2006).

Le FTs pur non essendo esenti da critiche (Bent *et al.*, 2007) ci consentono di stimare la ricchezza genotipica dei procarioti e la composizione della comunità

in modo rapido e relativamente preciso (Danovaro *et al.*, 2006; 2007). Ad oggi offrono il miglior compromesso tra il numero dei campioni da analizzare e l'informazione ottenuta (Forney *et al.*, 2004). Tuttavia le FTs spesso producono solo un'immagine parziale della comunità anche se allo stesso tempo risultano essere essenziali in situazioni in cui poco o nulla si conosce della comunità stessa. Per queste ragioni, nonostante i limiti, le FTs non sono state accantonate dagli ecologi microbici. Il numero di pubblicazioni ISI che usano le tre più comuni FTs in ecologia microbica (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*_DGGE; *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphysm*_T-RFLP; *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analyses*_ARISA) è cresciuto costantemente da 16 nel 1996 a 395 nel 2006 (Fig. I.1). Nello stesso periodo di tempo articoli indirizzati allo studio dei cianobatteri sono cresciuti da 2 a 15.

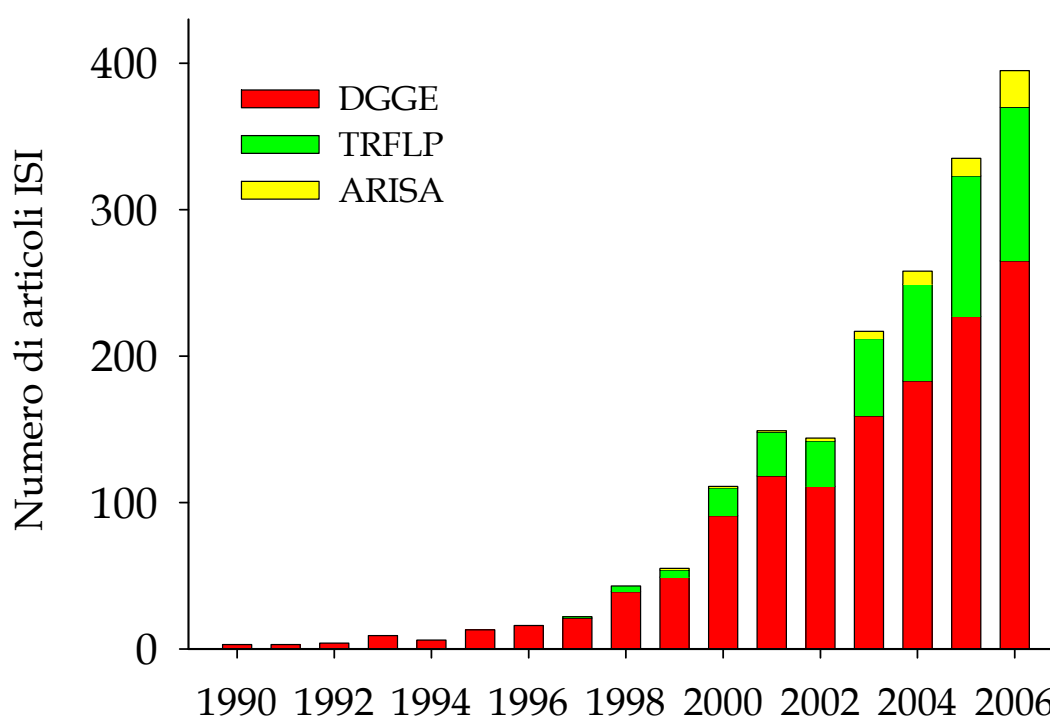


Fig. I.1 - Numero di pubblicazioni ISI dall'anno 1990 al 2006 delle tre principali tecniche di fingerprinting (DGGE, T-RFLP e ARISA).

Per valutare pregi e difetti delle principali FTs nello studio delle comunità lacustri di picocianobatteri si è programmato un esperimento di laboratorio. Si sono utilizzati ceppi puri di picocianobatteri con i quali sono state create comunità artificiali sulle quali testare le FTs e che hanno rappresentato una sorta di controllo dei risultati. Questo ci ha permesso di interpretare più correttamente i risultati delle tre tecniche (DGGE, T-RFLP e ARISA) nella successione spazio-temporale dei picocianobatteri del Lago Maggiore, durante il corso del 2006.

In questo capitolo verranno anche discussi, da un punto di vista esclusivamente metodologico, i risultati dello studio della diversità della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore. Si illustrerà quale risoluzione, in termini di numero di unità tassonomiche (OTU), sia possibile ottenere con queste analisi. L'importanza di questo studio non soltanto evidenzierà quale tecnica si possa considerare più risolutiva ed in quale condizione sperimentale, ma offrirà anche una comparazione del tratto genico studiato (16S rDNA e ITS-1) in relazione alle FTs utilizzate.

La discussione della diversità dei picocianobatteri del Lago Maggiore in chiave ecologica verrà poi ampiamente trattata nel capitolo successivo.

Metodologie di studio

Tutte le tecniche di *fingerprinting* si basano sulla separazione elettroforetica di tratti di DNA amplificato. Uno dei maggiori, ma anche più dibattuti, vantaggi dell'utilità di queste metodologie di studio è quello che tutte utilizzano i prodotti di amplificazione della PCR. Alcuni Autori considerano l'approccio con FTs molto utile nello studio della diversità di una comunità perché si basa sulle componenti dominanti della comunità (Pedrós-Alió, 2006); altri considerano questi tentativi limitanti perché troppo condizionati dai potenziali errori della PCR (von Wintzingerode *et al.*, 1997; Head *et al.*, 1998).

Alcune tecniche FTs si basano sulla separazione elettroforetica in base alla differente composizione nucleotidica (e quindi al differente peso molecolare)

del frammento di DNA amplificato. Tra queste le più importanti sono: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE; Muyzer *et al.*, 1993), *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE; Muyzer and Smalla, 1998) e *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP; Lee *et al.*, 1996). Uno dei vantaggi principali di queste tecniche è la possibilità di recuperare la sequenza nucleotidica delle unità tassonomiche (OTUs) presenti nell'amplificato. D'altro canto uno dei principali limiti del sequenziamento del prodotto di PCR (a volte 300-400 paia di basi (bp)) è che esso potrebbe non contenere, a causa del ridotto numero di basi del frammento, informazioni sufficienti per delineare una precisa collocazione tassonomica delle OTUs (Ovreas, 2000).

Altre tecniche si basano sulla separazione elettroforetica dei frammenti amplificati unicamente in base alla loro lunghezza, misurata come numero di basi (bp), ed indipendentemente dalla loro composizione e dal loro peso molecolare. La diversa lunghezza del frammento di PCR può essere determinata con l'utilizzo di enzimi di restrizione specifici che tagliano l'amplificato in punti differenti oppure in base all'eterogenea lunghezza del prodotto di PCR stesso, diversa a seconda dell'unità tassonomica e del tratto amplificato (es. ITS-1). La *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP; Avanissaghajani *et al.*, 1994) è la tecnica più comunemente utilizzata con prodotti di PCR digeriti, mentre l'*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA; Fisher and Triplett, 1999) si usa per analizzare il frammento di DNA comprendente l'ITS-1, con lunghezza in bp anche molto differente tra specie e specie.

In questo capitolo sono state confrontate le tecniche di *fingerprinting* più comuni (DGGE, T-RFLP e ARISA) nello studio di una comunità di picocianobatteri d'acqua dolce soffermandosi sui limiti e sui vantaggi di ogni tecnica rispetto all'altra. Verrà affrontato, per la comunità del Lago Maggiore, anche uno dei principali problemi che condizionano la stima della diversità, ovvero la sensibilità delle tecniche verso le specie più rare (e quindi meno abbondanti).

Disegno dell'esperimento

Comunità artificiale

Sono stati selezionati 5 ceppi di picocianobatteri tra quelli già disponibili nel laboratorio di ecologia microbica dell'ISE-CNR e quelli isolati in questa ricerca. Il criterio di scelta è stato quello di usare ceppi diversi fenotipicamente e genotipicamente ed anche provenienti da laghi molto diversi per caratteristiche trofiche e morfometriche (Tab. I.1).

Comunità naturale

I campioni della comunità picocianobatterica naturale sono stati prelevati in doppio nel punto di massima profondità (stazione di Ghiffa) del Lago Maggiore, da marzo ad ottobre 2006, a due profondità fisse (3m e 20m). È lecito aspettarsi che l'analisi della comunità naturale sia più complessa non solo per il numero più elevato di OTUs, ma anche per la successione spazio-temporale dei ceppi di picocianobatteri nel lago.

Tab. I.1 - Informazioni sui ceppi di picocianobatteri utilizzati nell'esperimento.

Ceppo	Pigmentazione	Ambiente	Zona biogeografica
MW100C3 (Crosbie)	Ficocianina (PC)	Lago Haltarensee	Prealpina
MW73D5 (Crosbie)	Ficoeritrina (PE)	Lago Mondsee	Prealpina
LCPC05	Ficocianina (PC)	Lago Candia	Subalpina
LMPC05	Ficocianina (PC)	Lago Maggiore	Subalpina
LMORPE06	Ficoeritrina (PE)	Lago Morenito	Andina

Analisi Molecolari

Le analisi di *fingerprinting* consentono di lavorare su tratti di DNA più conservativi (16S rDNA) o meno conservativi (ITS-1). Si è deciso di confrontare la DGGE e la T-RFLP nel tratto del 16S rDNA e la DGGE e l'ARISA sul tratto del ITS-1.

Estrazione del DNA

Il DNA dei ceppi è stato estratto con il kit Microbial (MoBio) da colture con un numero di cellule quantificato (300×10^6 cell ml^{-1}). La concentrazione di DNA è stata misurata mediante QuBit (Invitrogen). Si sono potute costruire, perciò, due comunità artificiali di picocianobatteri: una con i ceppi presenti in uguale proporzione (Com. A) e l'altra con un gradiente in termini di abbondanza dei singoli ceppi (Com. B; Tab. I.2).

Tab. I.2 - Informazioni sulla composizione della comunità artificiale.

Ceppo	Pigmentazione	%A	%B
MW100C3 (Crosbie)	Ficocianina (PC)	20	5
MW73D5 (Crosbie)	Ficoeritrina (PE)	20	20
LCPC05	Ficocianina (PC)	20	64
LMPC05	Ficocianina (PC)	20	1
LMORPE06	Ficoeritrina (PE)	20	10

Per quanto riguarda la comunità naturale i campioni prelevati sono stati prefiltrati su $10 \mu\text{m}$ e il materiale è poi stato concentrato su filtri Supor® con porosità $0.2 \mu\text{m}$ (filtrando volumi d'acqua tra i 200 ml e i 500 ml di acqua). Il DNA è stato estratto dalle cellule concentrate sui filtri utilizzando il kit commerciale UltraClean DNA Soil Kit (MoBio) come consigliato da Stepanauskas e coautori (2003). L'utilizzo di questa tecnica di estrazione è stata consigliata da Luna e coautori (2006), i quali ne hanno evidenziato i vantaggi rispetto alla tecnica classica (fenolo-cloroformio, Giovannoni e coautori (1990) e successive modifiche), non ultimo il minor contatto con agenti tossici. Luna e coautori (2006) hanno dimostrato come l'utilizzo del kit per suoli, rispetto ai metodi di lisi su colture cellulari, dia una più accurata misura della ricchezza e della diversità della comunità microbica bentonica marina. Anche dopo l'estrazione, il DNA è stato quantificato con il fluorimetro QuBit (Invitrogen).

Amplificazione (PCR)

L'amplificazione è stata effettuata in doppio utilizzando primer specifici (Tab. I.3) per cianobatteri. Uno dei problemi principali è stato evidenziato durante l'amplificazione del DNA dei campioni estratti dalla comunità naturale. A dispetto della grande cura e degli svariati accorgimenti metodologici, il prodotto di PCR era spesso troppo scarso e le procedure risultavano difficilmente ripetibili tanto da aumentare il rischio di errori nell'amplificazione stessa (*overamplification*, *primer-dimer*, ecc.).

Pertanto abbiamo optato per una amplificazione ripetuta, chiamata *nested* o *semi-nested*, procedura molto utilizzata per ottenere un consistente risultato in casi particolarmente difficili (Boutte *et al.*, 2006).

Tab. I.3 - Schema dei primer utilizzati nelle analisi di fingerprinting.

Tratto Genico	Primer 1° PCR	Primer 2°PCR	Analisi
16s	16s 5'F-23s30'R	16s359F + GC-16s 781rb	DGGE
16s	16s 5'F-23s30'R	16s359F (FAM) -16s 781rb	T-RFLP
ITS-1	16s 359F-23s125R	16s CSIF + GC-23s125R	DGGE
ITS-1	16s 359F-23s125R	16s CSIF -23s125R (TET)	ARISA

La prima reazione di PCR (termociclatore BioRad) è stata effettuata in una soluzione di 50 µl contenente 2 µl per ogni primer (10nM) e 20 µl di PCR Taq Master Mix (Promega) al quale sono stati aggiunti 1-5 µl di DNA di campione.

Per il tratto 16S rDNA (16S27F-23S30R) sono stati effettuati trenta cicli di PCR con il seguente schema: 45 secondi (sec.) a 94°C, 45 sec. a 57°C, e 120 sec. a 68°C preceduti da 5 minuti di denaturazione a 94°C. La fase finale di estensione era di 7 min. a 68°C.

Per il tratto ITS-1 (359F- 23S125R) sono stati effettuati trenta cicli consistenti in 60 sec. a 94°C, 60 sec. a 55°C e 120 sec. a 72°C preceduti da 3 min. di denaturazione a 94°C. La fase finale di estensione era di 10 min. a 72°C.

La *nested*-PCR è stata effettuata anch'essa in 50 µl contenente 2 µl per ogni primer (10nM) e 20 µl di PCR Taq Master Mix (Promega) al quale sono stati aggiunti 1 µl di DNA della prima PCR.

Per il tratto 16S rDNA (CYA359F-CYA781Rb; Nübel e collaboratori 1997 e successive modifiche proposte da Boutte e collaboratori, 2006) si è usata una procedura di *touch-down* la quale prevede alcuni cicli (10 in questo caso) nella quale la temperatura di *annealing* scende di 1 grado ogni ciclo (da 65°C a 55°C) preceduta da 45 sec. di denaturazione, seguita da una estensione di 120 sec. Successivamente si procedeva ad altri 20 cicli consistenti in 45 sec. di denaturazione a 94°C, 45 sec. a 55°C e 120 sec. a 68°C. La fase finale di estensione era di 5 min. a 68°C.

Per il tratto ITS-1 (16S CSIF-23S 125R) la reazione è avvenuta con la stessa procedura descritta per la prima reazione sul tratto ITS-1 seguendo il protocollo di Kent e coautori (2004) riducendo il numero di cicli da 30 a 25.

Tutti i campioni amplificati sono stati controllati visivamente in un gel di agarosio (1X), quantificati con il fluorimetro QuBit (Invitrogen) e purificati, prima di essere processati, con il kit di purificazione (Qiagen). Per quanto riguarda la comunità naturale, le due repliche di ogni campione sono state processate singolarmente (fino alla purificazione). Prima di effettuare le rispettive analisi di *fingerprinting*, i due prodotti di PCR purificati sono stati mescolati tra loro a formare perciò un unico campione.

DGGE

La *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) si basa sul principio per cui ogni frammento amplificato corrispondente ad una unità tassonomica ha un suo punto specifico di denaturazione, pertanto ad ogni banda che compare nel gel corrisponde una diversa unità funzionale. Il gel risulta denaturante ed ha un gradiente che può essere molto variabile a seconda dei microrganismi in questione ed è costituito da diverse concentrazioni di formammide che è la sostanza denaturante.

Si preparano due soluzioni a diversa concentrazione, variabile da 0 a 100% di urea-formammide (in questo studio 30% e 65%), contenenti il 6% di acrilammide-bisacrilammide. Le due soluzioni vengono miscelate con un apposito apparato che consente la creazione del gradiente desiderato.

L'elettroforesi viene effettuata a 60°C per circa 10 ore ad un voltaggio di 150V. La quantità di campione caricato nel gel per ottenere un segnale consistente dovrebbe variare tra 5 e 10 ng/ μ l. L'apparato in cui avviene l'elettroforesi è una camera verticale D-Code (BioRad) a stretto controllo di temperatura.

Alla fine della corsa elettroforetica il gel è colorato con SYBR-Green (0.5 mg ml^{-1}), per circa 30 minuti e poi visualizzato ai raggi UV mediante l'apparato GelDoc (BioRad).

T-RFLP

La *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphysm* (T-RFLP) è una tecnica che si basa sull'utilizzo di enzimi di restrizione che riconoscono siti specifici di una sequenza nucleotidica e tagliano in corrispondenza di essi. Ogni frammento tagliato ha una specifica lunghezza in bps ed è considerato una unità tassonomica. I frammenti tagliati sono detti terminali perché uno o entrambi i *primers* sono legati ad una molecola fluorescente che è riconosciuta dal laser dello strumento. I frammenti vengono separati elettroforeticamente a 2800 V per 8 ore in un gel di acrilammide (5%).

La scelta degli enzimi di restrizione è molto importante e spesso si utilizzano più di due enzimi di restrizione per recuperare la ricchezza totale del campione analizzato (Engelbreton and Moyer, 2003). Basandoci su uno dei pochi casi di analisi della comunità di cianobatteri *in situ* abbiamo utilizzato due enzimi di restrizione *MspI* e *Rsa* (Redfield *et al.*, 2002). Tuttavia l'utilizzo di un singolo enzima *MspI* (10 U per 10 μ l di reazione) ci ha permesso di ottenere gli stessi risultati (dati non mostrati). Pertanto si è deciso di utilizzare soltanto questo enzima per le analisi. Altri enzimi sono stati presi in considerazione (*AluI*, *ddEI*), ma né singolarmente né insieme hanno lavorato meglio di *MspI*. È vero però

che l'uso di due o più enzimi di restrizione può produrre delle differenze nella composizione della comunità (Osborne *et al.*, 2006), ma non in termini di ricchezza di filotipi né di diversità (Dunbar *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2005).

La digestione è stata eseguita alla temperatura di 37°C per 3 ore ed è stata interrotta tenendo il campione per 30 minuti a 65°C. Il campione digerito può essere congelato a -20°C o può essere subito processato mescolando 1-2 µl di campione con 0.5 µl di loading buffer, 0.5 µl di standard (ROX 350, Applied Biosystem), 2.5 µl di formammide deionizzata. Prima di essere caricato nel gel il campione è denaturato per 2-3 minuti a 94°C e immediatamente messo in ghiaccio. La quantità ottimale di campione da caricare nel gel varia da 1 a 5 ng/µl. Le analisi sono state effettuate utilizzando un sequencer ABI Prism 377.

ARISA

L'*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA) è tra le tre tecniche quella di più recente introduzione ed è molto promettente nonostante siano stati pubblicati ancora pochi studi. Questa tecnica si basa sull'analisi della regione intergenica. In questo caso la regione intergenica in questione è quella compresa tra il gene 16S rDNA e il gene 23S rDNA, denominata ITS-1.

La procedura di preparazione per l'analisi si basa sullo stesso principio della T-RFLP, la differenza principale tra le due tecniche è legata alla non-digestione del prodotto di PCR. La digestione nell'ARISA non è necessaria perché il tratto ITS-1 è caratterizzato da una variabilità nel numero di basi, specifica a livello di sottospecie (Daffonchio *et al.*, 2003). L'elettroforesi è effettuata con modalità simili a quella della T-RFLP ma dura più a lungo (10 ore) a causa della maggiore lunghezza dei frammenti. Pertanto anche lo standard da utilizzare ROX 2500 (Applied Biosystem) è diverso per identificare frammenti che possono variare da 100 paia di basi a oltre 1000 paia di basi (Borneman and Triplett, 1997). Per ottenere l'esatta lunghezza del frammento ITS-1 inoltre è necessario sottrarre al valore calcolato dal programma di analisi GeneScan, circa 300-350 paia di basi che sono esterne all'ITS-1 (circa 200 del 16S e 125 del 23S).

Trattamento dei dati

Comunità artificiale

Le immagini ricavate dal gel della DGGE (16S rDNA e ITS-1) sono state analizzate con il software QuantityOne (BioRad) che permette di valutare qualitativamente e quantitativamente i profili ottenuti. La risoluzione qualitativa è stata eseguita confrontando la corrispondenza delle singole bande delle comunità con quella dei ceppi singoli analizzati in corse parallele. La valutazione semi-quantitativa è stata effettuata mediando su ogni corsa il dato di intensità luminosa misurato per ogni banda.

Le analisi di T-RFLP (16S rDNA) e ARISA (ITS-1) sono state elaborate semi-automaticamente con il software Gene-Scan (Applied Biosystems). Per ottenere una risoluzione qualitativa significativa del segnale delle comunità artificiali si sono esclusi i picchi con una distanza inferiore a 1.9 paia di basi (*shoulder peaks*) dai picchi più grandi. L'analisi qualitativa per T-RFLP e ARISA è stata eseguita confrontando la corrispondenza dei singoli picchi delle comunità con quella dei ceppi singoli analizzati in corse parallele avvalendosi anche della presenza di uno standard interno (ROX). L'altezza del picco è solitamente considerata una attendibile misura quantitativa.

Comunità naturale

Rispetto alla comunità artificiale l'analisi quali-quantitativa della comunità naturale impone una maggiore attenzione perchè, essendo necessario utilizzare diversi tracciati elettroforetici, bisogna assicurarne la ripetibilità per poter effettuare un confronto corretto. Questo problema risulta meno grave con T-RFLP e ARISA perchè con queste tecniche si deve utilizzare uno standard interno che permette il confronto delle letture di diversi gel. Con la DGGE, mancando lo standard interno, per garantire confronti ripetibili tra le diverse corse elettroforetiche si può utilizzare, per ogni analisi di DGGE e quindi per un massimo di 12 campioni, un *ladder* (1kbp o 100bp) che è disponibile in

commercio e che contiene DNA di peso molecolare noto e tale da terminare la corsa elettroforetica in determinati punti del gel. In altre parole si usa una sorta di standard esterno che permette il confronto di più analisi.

Per quanto riguarda l'analisi qualitativa con T-RFLP è stata effettuata come già descritto per la comunità artificiale. Per quanto riguarda l'analisi qualitativa con ARISA, la maggiore durata dell'elettroforesi ed i conseguenti problemi di riscaldamento del gel, hanno reso necessario l'allineamento dei picchi delle diverse analisi, per aumentare la ripetibilità intra- ed inter-gel. Questo è stato realizzato utilizzando l'approccio proposto da Hewson e Fuhrman (2006). Questi Autori suggeriscono che i picchi vengano legati tra di loro in differenti *fixed windows* a seconda della lunghezza del frammento dei picchi stessi così che ciascun picco risulti allineato a quello presente nella stessa *window* con il seguente margine di errore: 3 bps per picchi compresi tra i 300 e i 700 bps, 5 bps per picchi compresi tra i 700 e i 1000 bps e 10 bps per lunghezze superiori a 1000 bps.

I problemi di quantificazione del segnale della DGGE della comunità naturale verranno illustrati nella discussione.

L'analisi semi-quantitativa dei picchi T-RFLP e ARISA è stata effettuata secondo Dunbar e collaboratori (2001) e prevede una standardizzazione basata sulla somma dell'altezza dei picchi dei campioni che esprime la fluorescenza totale del campione stesso. In particolare, per ogni campione, si calcola il rapporto tra la fluorescenza totale del campione e quella del campione con la fluorescenza più bassa. In questo modo è possibile uniformare la fluorescenza tra i vari campioni, moltiplicando la fluorescenza misurata del campione per il rapporto calcolato. La fase successiva è molto importante e consente di valutare, a standardizzazione effettuata, quali picchi si debbano considerare validi e, per i picchi più bassi, quale "soglia" si debba utilizzare per differenziarli dal rumore di fondo. Questo valore (*cut-off*) è stato calcolato seguendo le indicazioni di Luna e collaboratori (2006) ed è lo 0.24% della fluorescenza totale di un campione (considerata il 100%).

In questo capitolo verranno discussi i dati quantitativi alla luce delle difficoltà metodologiche più sopra menzionate e che comportano problemi nella stima della biodiversità. In particolare verranno confrontate le conseguenze della scelta di tre diversi *cutoff* (0.24%, come proposto da Luna *et al.*, 2006; 0.5%, come proposto da Hewson and Fuhrman, 2006; e 1%), sulla valutazione della diversità della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore.

Risultati

Comunità artificiale

L'uso della comunità artificiale, costituita da un numero noto di OTU (ricchezza di OTU=5) ha permesso il controllo dell'efficacia delle diverse tecniche di *fingerprinting* utilizzate. Nessuna di queste ha permesso di individuare l'effettiva ricchezza della comunità artificiale.

Per quanto riguarda il 16S rDNA, la DGGE (Fig. I.2) si è mostrata molto più selettiva della T-RFLP (Fig. I.3) consentendo l'individuazione di 3 dei 5 picchi rispetto all'unico individuato con la T-RFLP. Quest'ultima non ha permesso (con *MspI* come enzima di restrizione) di distinguere tra i diversi ceppi. La lunghezza dei frammenti tagliata dagli enzimi è risultata essere la stessa (170 ± 2 paia di basi).

La situazione si è ripetuta per il tratto ITS-1 della comunità artificiale dove la DGGE (Fig. I.4) è stata in grado di risolvere 4 picchi dei 5 mentre l'ARISA ne ha risolti soltanto 3 (Fig. I.5). La lunghezza dei frammenti (ITS-1) dei ceppi utilizzati per questo confronto in realtà è di circa 1170-1250 paia di basi.

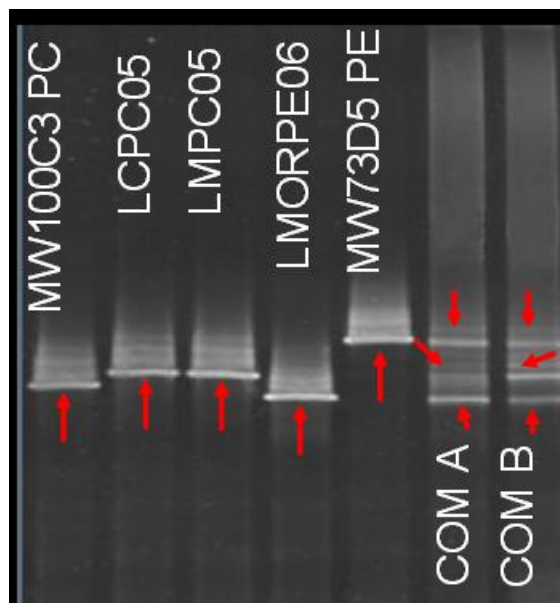


Fig. I.2 - DGGE sul tratto 16S della comunità artificiale di picocianobatteri.

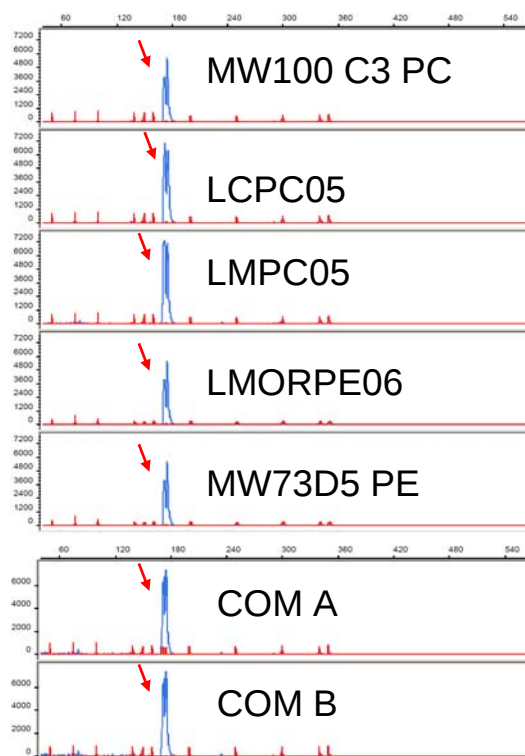


Fig. I.3 - Elettroferogrammi T-RFLP (16S rDNA) della comunità artificiale.

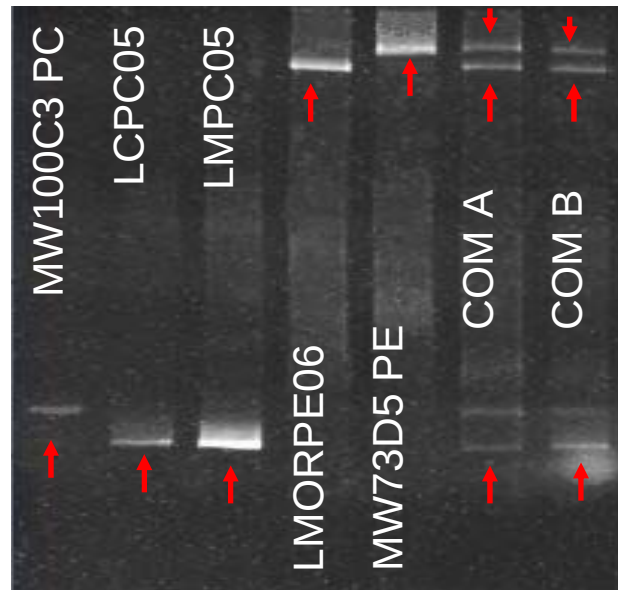


Fig. I.4 - DGGE sul tratto ITS-1 della comunità artificiale.

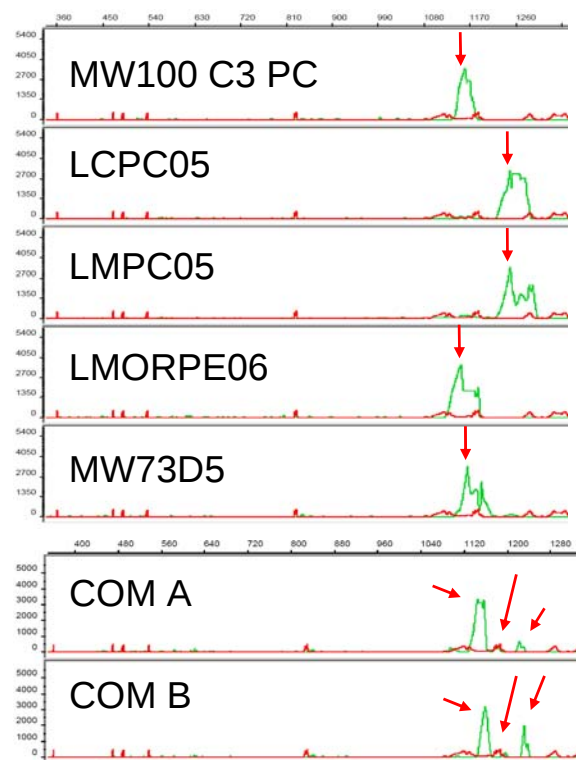


Fig. I.5 - Elettroferogrammi ARISA (ITS-1) della comunità artificiale.

Per quanto riguarda l'aspetto quantitativo la situazione è molto più complessa. Infatti, i singoli ceppi e le comunità analizzate dalle DGGE (sia nel tratto 16S rDNA che nel tratto ITS-1; Fig. I.6) mostrano una quantificazione imprecisa del segnale (espressa come intensità luminosa della banda) nonostante la comunità artificiale A sia composta da pari quantità dei singoli ceppi. T-RFLP e ARISA invece permettono di osservare una quantità di segnale dei diversi ceppi (espressa come altezza del picco) estremamente ripetibile. Inoltre con ARISA, l'analisi quantitativa delle comunità artificiali non ha discriminato i singoli ceppi presenti nella comunità B (quella con il gradiente). Ciò può essere causato dalla scarsa risoluzione di frammenti con lunghezza simile dei ceppi utilizzati (3 su 5).

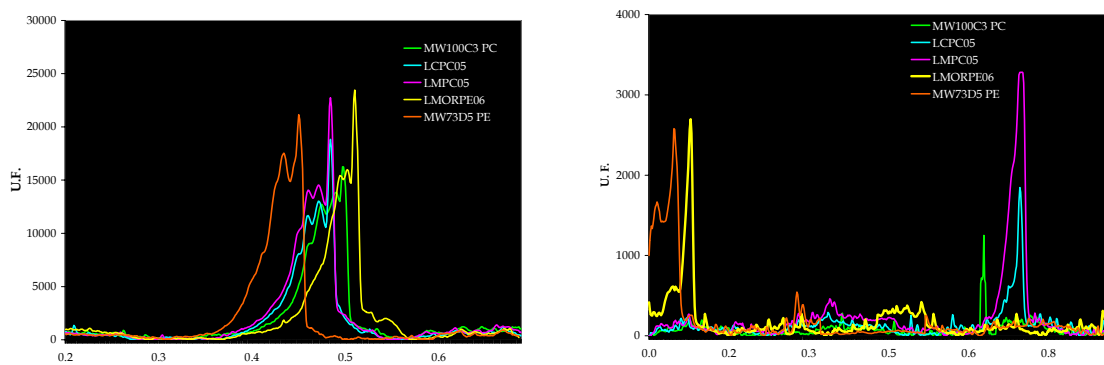


Fig. I.6 - Quantificazione del segnale della DGGE sul 16S rDNA (sx) e della DGGE (dx) sul ITS-1 espressa come unità di fluorescenza della banda (U.F.).

Alla luce dei risultati sopraesposti risulta chiaro che la differenza nel risolvere le componenti della comunità artificiale non sembra legata solamente al tratto genico analizzato ovvero all'ITS-1 e 16S rDNA ma anche alla tecnica utilizzata. Per ambedue i tratti genici le DGGE sono risultate molto più sensibili delle altre tecniche. C'è da notare che con l'analisi dell'ITS-1 si ottiene una discriminazione maggiore (4 OTU con DGGE e 3 OTU con ARISA) rispetto a quella ottenibile dal tratto del 16S rDNA (3 OTU con DGGE e 1 OTU con T-RFLP).

Comunità naturale

La comunità naturale di cellule di picocianobatteri nel corso della successione spazio-temporale presenta un alto picco di abbondanza nel periodo tardo-estivo (5 settembre) di 325×10^3 cell ml^{-1} ; a parte questo dato eccezionale, soprattutto a 20m, e per tutto il periodo di studio, il numero delle cellule non ha mai superato 50×10^3 cell ml^{-1} (Fig. I.7).

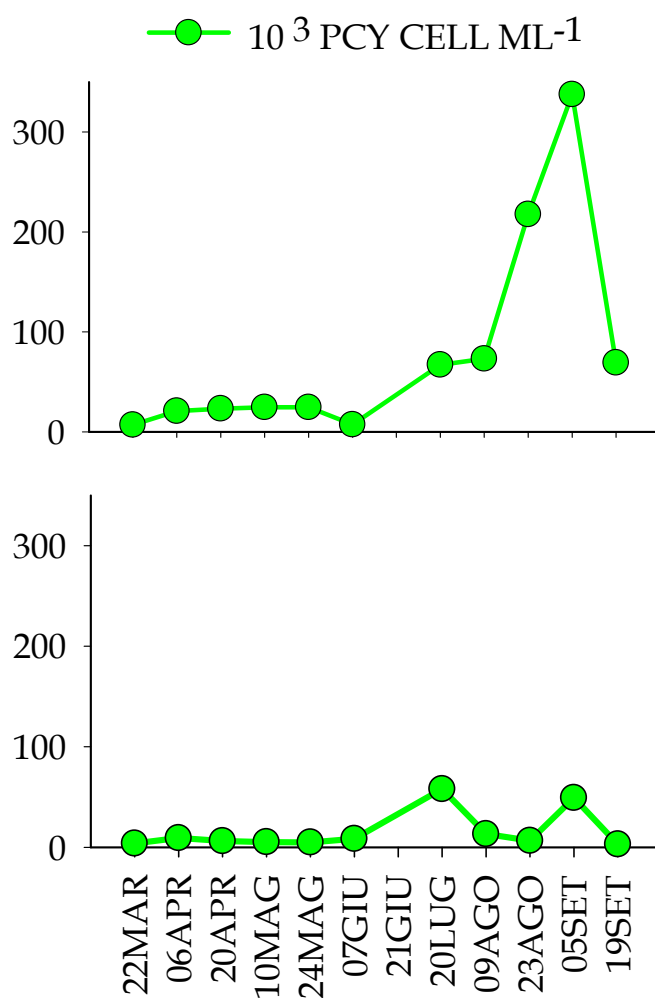


Fig. I.7 - Dinamica spazio-temporale 3 m (sopra) e 20 m (sotto) della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore 2006.

La comunità naturale, a seconda del tratto di gene oggetto dell'analisi, 16S rDNA o ITS-1 (Fig. I.8), è risultata più o meno complessa. In particolare sul

tratto 16S rDNA la ricchezza in OTU è stata di 8-9, con un picco di 18, mentre quella trovata nel tratto ITS-1 è stata di 10-13.

La risoluzione qualitativa, cioè il numero di OTU trovate, delle varie tecniche utilizzate è stata confrontata valutando la differenza tra le tecniche nello stesso tratto, cioè: 1) DGGE del 16S - T-RFLP per il 16S; 2) DGGE del ITS-1 ed ARISA per l'ITS-1. Da questo confronto emerge che la differenza tra le due tecniche applicate sullo stesso tratto genico non è significativa (One-Way Anova, $P > 0.05$).

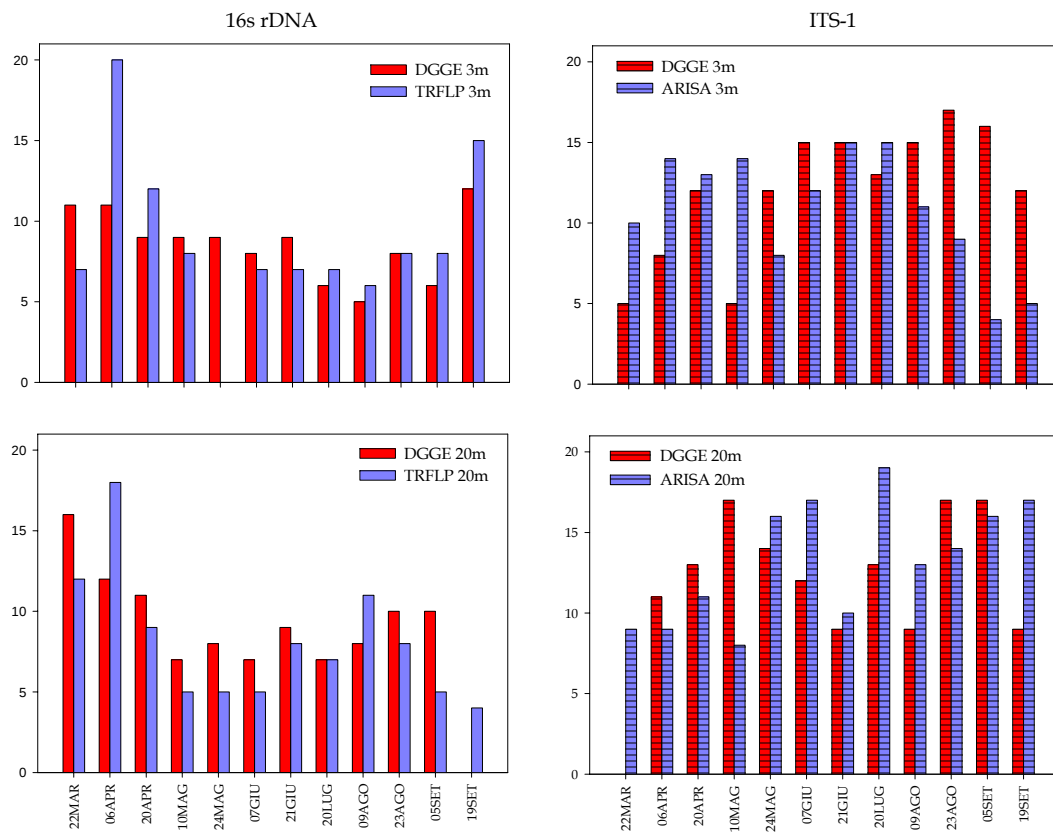


Fig. I.8 - Confronto tra le tecniche di *fingerprinting* DGGE e T-RFLP sul tratto genico 16S (sx) e DGGE e ARISA sul tratto genico ITS-1 (dx) della comunità Lago Maggiore 2006.

Si è valutata la differente capacità dei due tratti genici (16S rDNA e ITS-1; Fig. I.9) di identificare OTU diverse confrontando l'insieme di tutti i dati relativi a

ciascun tratto genico indipendentemente dalla tecnica utilizzata ovvero 16s rDNA (DGGE e T-RFLP) e ITS-1 (DGGE e ARISA). L'analisi statistica (One-Way Anova, $P < 0.05$) ha mostrato l'esistenza di una differenza significativa tra i due tratti genici.

L'analisi del frammento ITS-1 evidenzia una maggiore ricchezza in OTU rispetto al 16S rDNA sia a 3m (11.5 ± 2.3 dell'ITS-1 contro 8.7 ± 3.1 del 16s rDNA) che a 20m (12.5 ± 3.3 dell'ITS-1 contro 8.4 ± 3.4 del 16s rDNA). Quindi a parità di tecnica utilizzata (nello stesso tratto genico), la differenza si osserva nella scelta del marker molecolare da analizzare.

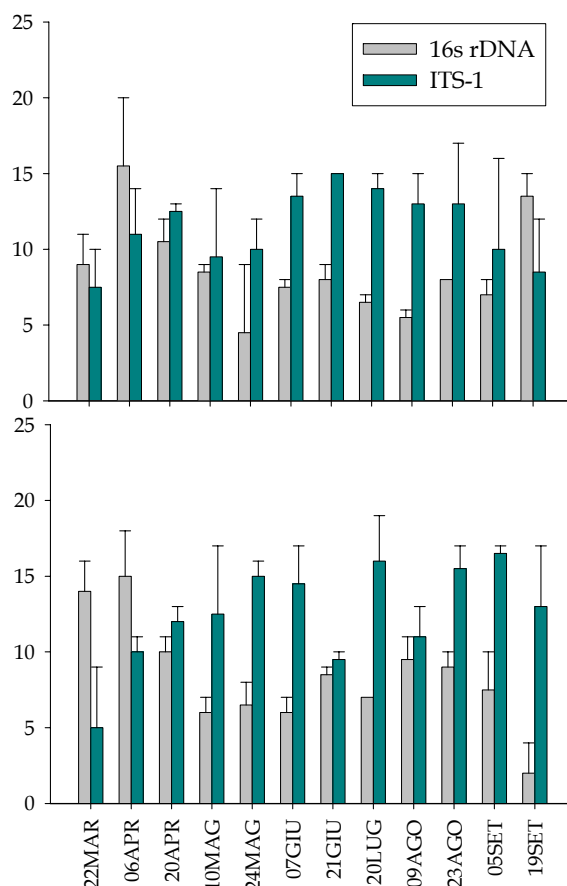


Fig. I.9 - Confronto dei tratti genici studiati nella comunità naturale del Lago Maggiore 3 m (sopra) e 20 m (sotto): 16S rDNA (DGGE e T-RFLP) e ITS-1 (DGGE e ARISA).

Per ARISA si sono inoltre confrontati tre differenti livelli di soglia (*cut-off* o *threshold*) 0.24%, 0.5%, 1% per dimostrare l'importanza della scelta dei picchi per non perdere le unità tassonomiche più rare (Fig. I.10). Si è trovata una differenza significativa (Friedman Test, Tukey tested $P < 0.001$), tra il livello più basso 0.24% e quello più alto 1%. Questo implica una perdita di informazioni molto importante a seconda della scelta di questo limite.

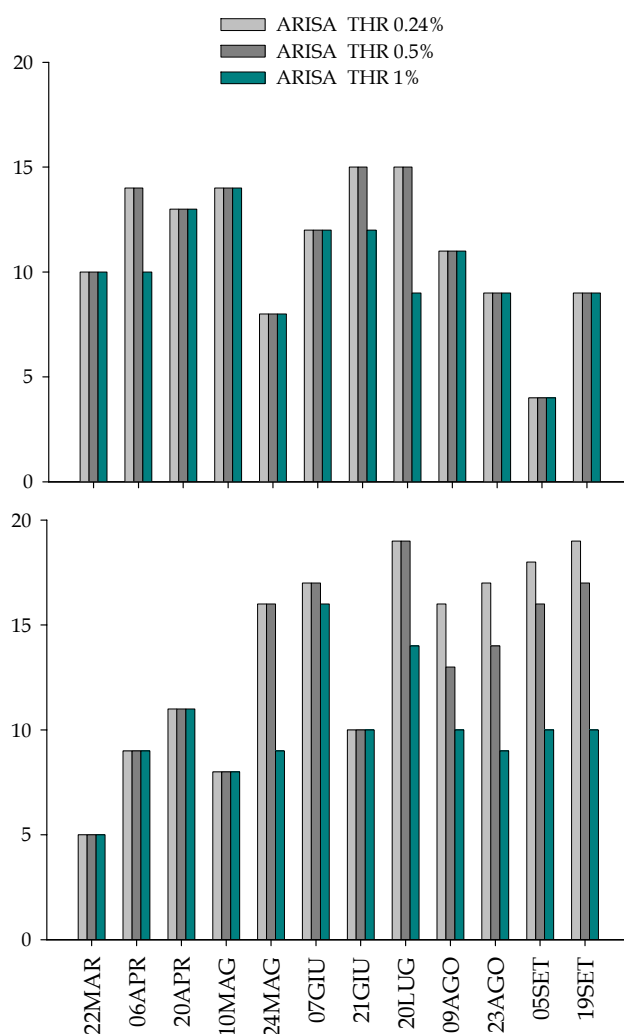


Fig. I.10 - Confronto tra diversi limiti di threshold utilizzato nell'analisi di ARISA della comunità naturale Lago Maggiore (3m-alto; 20m-basso).

Discussione

Il confronto tra le tecniche di *fingerprinting* è molto complesso e molto dibattuto. Recentemente si è discusso su quale fosse la migliore tecnica da usare per lo studio di diverse comunità microbiche: batteri eterotrofi acquatici (Danovaro *et al.*, 2006), del suolo (Jones and Thies, 2007; Smalla *et al.*, 2007), funghi (Anderson and Cairney, 2004). Il confronto delle due comunità di picocianobatteri (naturale ed artificiale) utilizzando le principali tecniche di *fingerprinting* ha messo in evidenza le diverse potenzialità di queste tecniche.

In questo lavoro di tesi, per la prima volta, è stato affrontato il confronto tra DGGE, T-RFLP e ARISA nello studio della comunità dei picocianobatteri d'acqua dolce. Si è deciso di utilizzare come ambiente naturale il Lago Maggiore nel quale i picocianobatteri sono stati studiati dal 1993 e dove hanno un ruolo ecologico importante sia nella comunità fitoplanctonica (Callieri and Piscià, 2002) che nelle catene microbiche (Callieri *et al.*, 2002).

Al contrario di quanto osservato in altri lavori (es. Danovaro *et al.*, 2006) il confronto tra le tecniche è stato legato ad una comparazione della loro efficacia sugli stessi tratti di DNA (16S rDNA e ITS-1) grazie soprattutto all'utilizzo della non così comune DGGE sul tratto intergenico (Janse *et al.*, 2003) per i cianobatteri. Grazie a questi accorgimenti i risultati esposti hanno una maggiore significatività, non permettendo una confusione sull'eventuale differente grado di risoluzione tassonomico legato all'analisi di frammenti genici differenti. Inoltre, per la prima volta, è stata applicata la tecnica ARISA sui picocianobatteri d'acqua dolce, mentre in ambiente marino essa è stata testata con successo da Brown e collaboratori (2005).

Comunità artificiale

In una comunità semplificata e composta da un numero molto limitato di OTU, come quella di laboratorio, la DGGE si è dimostrata la tecnica più sensibile e risolutiva in confronto alla T-RFLP e all'ARISA indipendentemente dal tratto

genico interessato. Il vantaggio di lavorare su una comunità con ricchezza uguale a 5 è inferiore al limite massimo (35) di risoluzione della tecnica (Loisel *et al.*, 2006). In questo modo riducendo l'eventuale sovrapposizione delle bande (soprattutto di quelle più abbondanti) il segnale risulta più pulito e si riescono a differenziare anche ceppi diversi anche per un singolo nucleotide.

La T-RFLP mostra la più bassa risoluzione nel riconoscere i singoli ceppi di picocianobatteri, nonostante la tecnica venga considerata robusta quando occorre identificare le popolazioni dominanti o in una comunità a bassa diversità (Engebretson and Moyer, 2003). La scelta dell'enzima di restrizione poteva essere più accurata o doveva ricadere sulla scelta di più di un enzima. Tuttavia l'enzima *MspI* al pari di altri enzimi (*BstUI*, *DdeI*, *Sau96I*) è considerato uno degli enzimi con la più *high fidelity* nel risolvere un singolo popolamento in alcune comunità modello (Engebretson and Moyer, 2003). Inoltre quando il prodotto è compreso tra 50 e 500 paia di basi, come in questo caso, l'enzima *MspI* risulta essere il più risolutivo (Engebretson and Moyer, 2003).

ARISA è una tecnica che si basa esclusivamente sulla lunghezza del frammento di PCR e, nel tratto intergenico, è meno sensibile della DGGE. Nonostante questa tecnica sia considerata molto risolutiva (Ranjard *et al.*, 2001; Danovaro *et al.*, 2006), i problemi nascono quando si confrontano organismi che, oltre a presentare ITS-1 più lunghi di 1000 paia di basi, abbiano uno scarto di lunghezza del frammento variabile da < di 10 paia di basi a > di 60 paia di basi. Sopra le 1000 paia di basi, infatti, si ritiene che il limite di sensibilità dell'analisi non possa essere inferiore alle 10 basi in condizioni ottimali (vedi metodi) e perciò cercare di differenziare i picchi quando la differenza è così piccola è oggettivamente difficile. Le lunghezze in bps degli spazi intergenici di queste OTU infatti vanno a sovrapporsi con i limiti di risoluzione dell'ARISA (per queste lunghezze).

Comunità naturale

Le stesse analisi comparative di diversità sono state effettuate sulla comunità picocianobatterica naturale del Lago Maggiore nel 2006. La comunità naturale ci ha permesso di valutare un maggior numero di unità tassonomiche rispetto alla comunità artificiale, tuttavia, il numero di OTU significative recuperato attraverso le nostre analisi, se raffrontato a quello delle comunità microbiche acquatiche eterotrofe studiate in altri lavori (50-60 come dato di ricchezza massimo trovato in ambiente marino costiero e pelagico del Mar Mediterraneo da Danovaro *et al.*, 2006 e 30-50 in ambiente d'acqua dolce in un distretto di laghi del Wisconsin da Yannarell and Triplett, 2004) risulta caratterizzante una comunità relativamente semplificata. Non ci sono dati in bibliografia che ci permettono di confrontare direttamente il numero di OTU di picocianobatteri ottenuto con tecniche di *fingerprinting* della comunità naturale del Lago Maggiore con quelli di altri ambienti. Solo nel Mar Baltico (Haverkamp *et al.*, 2008) è stata fatta una stima del numero di OTU dal numero di cloni di picocianobatteri ottenuti da un tratto 16S-ITS (mediante curve di rarefazione) e sono state ottenute da 40 a 11 OTU a seconda della similarità tra le sequenze (da 100% a 97%).

Una delle grosse limitazioni nel lavorare su una comunità di picocianobatteri naturale così piccola numericamente in confronto alla componente eterotrofa risulta una forte competizione tra questi 2 tipi di cellule sia a livello di estrazione del DNA, ma anche a livello di PCR. In questi casi la differenza principale è basata sulla specificità dei *primers* che idealmente non dovrebbe discriminare nell'amplificazione di tutte le sequenze *target* della comunità. Tuttavia la qualità dei *primers* (intesa come specificità del punto di aggancio al DNA *target*) dipende pesantemente dalle sequenze disponibili nelle banche dati per quel tratto specifico di gene (Nocker *et al.*, 2007) e, nel caso dei picocianobatteri purtroppo non è amplissima, soprattutto per il tratto intergenico ITS-1 (<50, Gen Bank). Nell'analisi della comunità naturale è probabile che la differente composizione tassonomica (successione stagionale di

ceppi diversi) possa influire sul fatto che non sembra esserci una tecnica che risulti più appropriata per stimare la diversità picocianobatterica.

Tutte queste tecniche inoltre soffrono di problemi di fondo generati da *bias* nell'amplificazione tramite PCR, che possono portare ad una sottostima della diversità totale a causa dell'amplificazione preferenziale di un DNA rispetto ad un altro (von Wintzingerode *et al.*, 1997).

La maggiore complessità della comunità naturale ci permette di osservare come tra le varie tecniche la DGGE non è più risolutiva delle altre e che il suo risultato sia comparabile alla T-RFLP per il tratto 16S rDNA e ad ARISA per il tratto ITS-1. Tuttavia si osserva una maggiore risoluzione della T-RFLP che nella comunità naturale risulta comparabile ai risultati ottenuti dalla DGGE (16S rDNA). A tale proposito la scelta di un determinato valore di *threshold* per l'analisi è uno dei fattori più importanti e in certi casi discriminante, primo perché ci permette di andare a distinguere le OTU dal rumore di fondo e soprattutto perché ci permette di individuare le unità tassonomiche più rare che spesso sfuggono alle analisi di diversità di una comunità. In bibliografia sono pubblicati molti livelli di *threshold* calcolati o proposti e tra questi può esserci talvolta una grossa differenza a seconda dell'utilizzo di un *cut-off* rispetto ad un altro (Blackwood *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005). Per T-RFLP e per ARISA è possibile calcolare questo limite (Luna *et al.*, 2006). L'analisi di DGGE, invece, a causa di limiti tecnici dovuti alla colorazione del gel rende difficile distinguere il segnale di fondo dalle bande più deboli originate dalle OTU meno abbondanti e quindi rende più complicato calcolare questo limite, che difficilmente scende sotto lo 0.5-1%. Anche la conversione del gel della DGGE in immagine spesso non riflette l'intera comunità, al contrario di quello che accade per T-RFLP e ARISA per le quali è possibile digitalizzare gli elettroferogrammi (Nocker *et al.*, 2007). La presenza del *GC-clamp* del *primer* in posizione 5' o 3' durante questa analisi influisce sull'efficienza del prodotto di PCR che è più basso e va ad incidere sui rischi di artefatti sia in fase di *annealing* che nella formazione di *heteroduplex* (Ferris and Ward, 1997). A causa di questi motivi pertanto l'analisi

della DGGE risente del cambiamento del tipo di comunità e per questo si osserva una diminuzione della risoluzione, probabilmente dovuta alla perdita delle unità tassonomiche più rare.

L'analisi semi-quantitativa della DGGE sembra in alcune circostanze un po' forzata. Uno dei fattori che influisce maggiormente è la mancanza di uno standard interno come invece esiste per analisi come la T-RFLP e ARISA. In questo caso mancando una ripetibilità intra- ed intergel (e quindi tra laboratori) si perde la possibilità di confrontare la similarità e l'abbondanza delle bande presenti in altre corse elettroforetiche. Solo in questi ultimi anni si è sviluppata una tecnica per inserire uno standard ad ogni campione processato (Petersen and Dahllöf, 2005) che prevede l'aggiunta al campione prima dell'estrazione di DNA di un tratto di 510 paia di basi, fluorescente, che può essere facilmente diagnosticato (spettrofluorometricamente) in tutte le fasi di preparazione delle analisi.

In ARISA ci sono potenziali problemi di amplificazione preferenziale di piccoli frammenti (Fisher and Triplett, 1999) e soprattutto a causa della variazione della lunghezza interoperonica in un singolo genoma un singolo organismo è stato riportato contribuire a più di un segnale (Jensen *et al.*, 1993; Nagpal *et al.*, 1998) e quindi a produrre una sovrastima della diversità. L'analisi dell'ITS-1 tuttavia nonostante tutti i problemi limitativi delle singole tecniche risulta in una maggiore ricchezza se confrontata con quella del 16S rDNA. Se da un lato vi è la possibilità che l'ITS-1 possa essere in qualche modo multicopia nei picocianobatteri e quindi l'ARISA possa produrre anche qui una sovrastima della diversità, nella stragrande maggioranza delle sequenze depositate nelle banche dati (circa il 90%) non si osserva la presenza di più operoni in questo tratto genico (Fisher and Triplett, 1999). A questo proposito alcuni recenti studi su batteri marini hanno trovato una bassa eterogeneità intragenomica fra operoni rRNA multipli di un singolo organismo suggerendo che *bias* di questo genere nelle analisi dell'ITS-1 siano trascurabili (Brown and Fuhrman, 2005; Danovaro *et al.*, 2006). La probabilità quindi che compaiono più picchi da parte

di una o più unità tassonomiche presenti nel campione naturale della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore non può essere esclusa ma è comunque molto bassa.

Conclusioni e Prospettive Future

Il confronto tra due comunità di picocianobatteri di diversa complessità, quella artificiale e quella naturale, ha messo in luce quelli che sono considerati i limiti e i vantaggi delle tecniche di *fingerprinting*.

La differenza nei risultati ottenuti con queste due comunità è molto interessante. Il tratto genico studiato, 16S rDNA piuttosto che ITS-1, è sicuramente determinante nell'analisi di una comunità naturale complessa più che la tecnica utilizzata. In una comunità meno complessa però è molto importante anche la scelta della tecnica. Infatti la DGGE (su entrambi i tratti genici) sembra lavorare meglio delle altre tecniche. Tuttavia, se rapportato ai dati di comunità naturale, non sembra esserci una FT più risolutiva di un'altra.

In confronto alla velocità e al costo dell'analisi, le analisi di diversità da FTs sono tutte vantaggiose rispetto al *cloning* (che si può eventualmente associare a queste nel caso si voglia un'analisi più dettagliata). Infatti da una singola analisi si riesce a visualizzare il DNA dell'intera comunità microbica. Le FTs non hanno comunque la risoluzione tassonomica del *cloning*, anche se la DGGE in alcuni casi è molto risolutiva (soprattutto sul ITS-1) ed è già stato dimostrato che tecniche come T-RFLP e ARISA distinguono rispettivamente fino al livello di genere e a quello di specie.

Per studi prettamente ecologici l'ARISA può considerarsi un buon compromesso tra le tre FTs confrontate, con il vantaggio di lavorare sul tratto intergenico e quindi più eterogeneo con l'accuratezza e sensibilità che un sequenziatore può avere nel quantificare il segnale.

Uno degli sviluppi di questo lavoro è il clonaggio degli amplificati prodotti dalle analisi effettuate in questo studio generando pertanto per ogni singolo campione una vera e propria libreria di cloni che ci permetterebbe di comparare

eventuali bande o picchi di un campione ambientale con quelli già presenti nella banche dati di cloni. L'importanza di studiare approfonditamente questo tratto intergenico, come già pubblicato sulla componente eterotrofa (Hewson and Fuhrman, 2004; Hewson *et al.*, 2007), potrebbe fornirci informazioni addizionali basandosi sul fatto che differenti lunghezze di ITS-1 possano in qualche modo essere legate a differenti ruoli ecologici nella comunità (Jaspers and Overmann, 2004).

Bibliografia

- Anderson, I.C. and J.W.G. Cairney. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6: 769-779.
- Avanissaghajani, E., K. Jones, D. Chapman and C. Brunk. 1994. A Molecular Technique for Identification of Bacteria Using Small-Subunit Ribosomal-Rna Sequences. *Biotechniques*, 17: 144-149
- Bent, S.J., J.D. Pierson and L.J. Forney. 2007. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: The emperor has no clothes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2399-2399.
- Blackwood, C.B., T. Marsh, S.H. Kim and E.A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 926-932.
- Borneman, J. and E.W. Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2647-2653.
- Boutte, C., S. Grubisic, P. Balthasart and A. Wilmotte. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *Journal of Microbiological Methods*, 65: 542-550.
- Brown, M.V. and J.A. Fuhrman. 2005. Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. *Aquatic Microbial Ecology*, 41: 15-23.
- Brown, M.V., M.S. Schwalbach, I. Hewson and J.A. Fuhrman. 2005. Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environmental Microbiology*, 7: 1466-1479.
- Callieri, C. and R. Piscia. 2002. Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47: 941-956.
- Callieri, C., S.M. Karjalainen and S. Passoni. 2002. Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *Journal of Plankton Research*, 24: 785-796.
- Daffonchio, D., A. Cherif, L. Brusetti, A. Rizzi, D. Mora, A. Boudabous and S. Borin. 2003. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5128-5137.
- Danovaro, R., G.M. Luna, A. Dell'Anno and B. Pietrangeli. 2006. Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5982-5989.
- Danovaro, R., G.M. Luna, A. Dell'Anno and B. Pietrangeli. 2007. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: The emperor has no clothes - Authors' reply. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2399-2401.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2943-2950.

- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 190-197.
- Engebretson, J.J. and C.L. Moyer. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4823-4829.
- Ferris, M.J. and D.M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1375-1381.
- Fisher, M.M. and E.W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4630-4636.
- Forney, L.J., X. Zhou and C.J. Brown. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 210-220.
- Giovannoni, S.J., E.F. Delong, T.M. Schmidt and N.R. Pace. 1990. Tangential Flow Filtration and Preliminary Phylogenetic Analysis of Marine Picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2572-2575.
- Hartmann, M., B. Frey, R. Kolliker and F. Widmer. 2005. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: Comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 61: 349-360.
- Haverkamp, T., S.G. Acinas, M. Doeleman, M. Stomp, J. Huisman and L.J. Stal. 2008. Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. *Environmental Microbiology*, 10: 174-188.
- Head, I.M., J.R. Saunders and R.W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35: 1-21.
- Hewson, I. and J.A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3425-3433.
- Hewson, I. and J.A. Fuhrman. 2006. Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microbial Ecology*, 51: 147-153.
- Hewson, I., M.E. Jacobson-Meyers and J.A. Fuhrman. 2007. Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environmental Microbiology*, 9: 923-933.
- Janse, I., M. Meima, W.E.A. Kardinaal and G. Zwart. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6634-6643.
- Jaspers, E. and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4831-4839.
- Jensen, M.A., J.A. Webster and N. Straus. 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 945-952.
- Jones, C.M. and J.E. Thies. 2007. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 256-267.

- Kent, A.D., S.E. Jones, A.C. Yannarell, J.M. Graham, G.H. Lauster, T.K. Kratz and E.W. Triplett. 2004. Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microbial Ecology*, 48: 550-560.
- Lee, D.H., Y.G. Zo and S.J. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3112-3120.
- Loisel, P., J. Harmand, O. Zemb, E. Latrille, C. Lobry, J.P. Delgenes and J.J. Godon. 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8: 720-731.
- Luna, G.M., A. Dell'Anno and R. Danovaro. 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8: 308-320.
- Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73: 127-141.
- Muyzer, G., E.C. Dewaal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16S Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Nagpal, M.L., K.F. Fox and A. Fox. 1998. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *Journal of Microbiological Methods*, 33: 211-219.
- Nocker, A., M. Burr and A.K. Camper. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54: 276-289.
- Nübel, U., GarciaPichel, F. and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3327-3332.
- Osborne, C.A., G.N. Rees, Y. Bernstein and P.H. Janssen. 2006. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1270-1278.
- Ovreas, L. 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3: 236-251.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734-740.
- Pedrós-Alió, C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14: 257-263.
- Pedrós-Alió, C. 2007. Dipping into the rare biosphere. *Science*, 315: 192-193.
- Petersen, D.G. and I. Dahllöf. 2005. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 339-348.
- Ranjard, L., F. Poly, J.C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse and S. Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4479-4487.
- Redfield, E., S.M. Barns, J. Belnap, L.L. Daane and C.R. Kuske. 2002. Comparative diversity and composition of cyanobacteria in three predominant soil crusts of the Colorado Plateau. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 55-63.

- Scanlan, D.J. and N.J. West. 2002. Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 1-12.
- Smalla, K., M. Oros-Sichler, A. Milling, H. Heuer, S. Baumgarte, R. Becker *et al.* 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 69: 470-479.
- Stepanauskas, R., M.A. Moran, B.A. Bergamaschi and J.T. Hollibaugh. 2003. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 85-98.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen *et al.* 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66-74.
- von Wintzingerode, F., U.B. Gobel and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213-229.
- Yannarell, A.C. and E.W. Triplett. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: Investigations using multiple spatial scales. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 214-223.

II Capitolo: Diversità della comunità di picocianobatteri nel Lago Maggiore (2006)

Introduzione

Le Tecniche di Fingerprinting (FTs) consentono, con una singola analisi, un confronto diretto del DNA di comunità microbiche provenienti da diversi campioni e sono considerate strumenti importanti per valutare rapidamente i cambiamenti della struttura delle comunità nel tempo e nello spazio (Yannarell *et al.*, 2003; Eiler and Bertilsson, 2007). In aggiunta le FTs forniscono anche informazioni sulla dinamica della comunità. A seconda della loro risoluzione, le unità tassonomiche trovate con queste tecniche possono rappresentare, in alcuni casi, distinti popolamenti con determinati adattamenti genetici che probabilmente occupano nicchie ecologiche differenti (Hewson and Fuhrman, 2004; Jaspers and Overmann, 2004).

La diversità della comunità di picocianobatteri negli ambienti d'acqua dolce è ancora poco conosciuta e solo pochi studi sono stati effettuati per capire sia la dinamica dei genotipi che la distribuzione stagionale dei popolamenti (Ernst *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2007; Callieri *et al.*, 2007b). L'impossibilità di distinguere morfologicamente le specie di picocianobatteri e quindi la difficoltà di evidenziare la connessione tra morfotipo e genotipo, ha stimolato l'interesse a comprendere quante e quali unità tassonomiche costituissero la comunità di picocianobatteri di un grande lago subalpino come il Lago Maggiore ed in quali condizioni ambientali queste potessero eventualmente coesistere.

Una parte importante di questo lavoro di tesi è stata dedicata allo studio della comunità di picocianobatteri, affrontata con metodi classici di conteggio e con FTs, alla luce di alcuni parametri fisico-chimici del Lago Maggiore. In particolare, in questo capitolo, verrà discussa la distribuzione spazio-temporale

della diversità picocianobatterica nel Lago Maggiore durante il 2006, a due profondità.

La dinamica della diversità delle unità tassonomiche (OTUs) verrà messa in relazione alla struttura termica, al clima ottico subacqueo ed alle concentrazioni di fosforo che è il nutriente limitante in questo lago (Calderoni *et al.*, 1997).

Ambiente di studio

Il Lago Maggiore è un grande lago subalpino profondo ed è il secondo dei laghi italiani sia per area che profondità massima (Fig. II.1). I parametri morfologici del lago sono riportati in tabella II.1. La sua origine è fluvio-glaciale, il modellamento glaciale pleistocenico infatti è avvenuto su una morfologia fluviale (canyon) preesistente provocata dalla crisi messiniana (Bini *et al.*, 1978). Il Lago Maggiore è classificato, dal punto di vista termico, come lago monomittico caldo (Tonolli, 1964; Hutchinson, 1967). Tuttavia l'olomissi a causa di alcune caratteristiche intrinseche della cuvetta lacustre (l'elevata profondità massima e media del lago) e climatiche (vento invernale e differenza temperatura aria-acqua) non si presenta ogni anno (Ambrosetti *et al.*, 1979). È pertanto più corretto definire il Lago Maggiore un lago olo-oligomittico con circolazione totale solo in particolari situazioni climatiche (Ambrosetti *et al.*, 1982).

Tab. II.1 - Parametri Morfologici principali del Lago Maggiore.

Quota media del lago	194 m s.l.m.
Profondità di Criptodepressione	176 m
Volume	37.50 km
Larghezza massima	10 km
Profondità media	176.5 m
Area	212.5 km ²
Perimetro	170 km
Profondità massima	370 m
Indice di sinuosità	3.07
Tempo di rinnovo teorico delle acque	4 anni (circa)

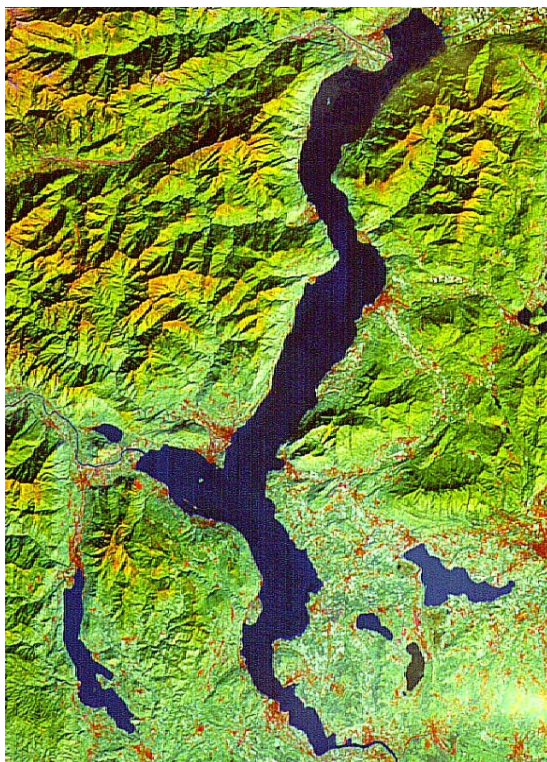


Fig. II.1 - Lago Maggiore.

Dai primi anni cinquanta, il lago è stato sottoposto a continue modificazioni trofiche: in un primo periodo, compreso tra l'inizio degli anni sessanta e la fine degli anni settanta, il lago è andato incontro al processo di eutrofizzazione. In seguito, dalla fine degli anni settanta fino ad oggi, si è osservato il processo inverso di oligotrofizzazione (Manca *et al.*, 1992; Calderoni *et al.*, 1997; Ruggiu *et al.*, 1998; Morabito and Pugnetti, 2000; Callieri and Piscia, 2002).

La concentrazione di fosforo totale in lago (misurata durante il mescolamento invernale) ha raggiunto il valore massimo di $30 \mu\text{g l}^{-1}$ nel 1978 (Ruggiu, 1989). Dalla fine degli anni settanta il fosforo totale è diminuito costantemente fino a ritornare, all'inizio degli anni novanta, a valori inferiori ai $10 \mu\text{g l}^{-1}$, misurati sporadicamente prima del processo di eutrofizzazione (Calderoni *et al.*, 1997; Ruggiu *et al.*, 1998). Tale bassa concentrazione si è mantenuta tra 8 e $12 \mu\text{g l}^{-1}$ per il decennio seguente a conferma dell'avvenuta oligotrofizzazione (Calderoni *et al.*, 2004).

Tuttavia la comunità biotica ha risposto con un lieve ritardo alla ri-oligotrofizzazione del lago. Questo ritardo nella risposta delle comunità planctoniche alla diminuzione della concentrazione dei nutrienti (de Bernardi *et al.*, 1988; Manca *et al.*, 1992; Ruggiu *et al.*, 1998), conosciuta con il termine di resilienza, è stato osservato in diversi laghi in fase di recupero (Sas, 1989).

I picocianobatteri nel Lago Maggiore

L'ecologia dei picocianobatteri, che costituiscono la principale componente del picofitoplancton, è oggetto di studio nel Lago Maggiore da oltre un decennio. All'interno del picofitoplancton la frazione eucariota rappresenta il 2-12% del totale (Callieri and Piscia, 2002).

I picocianobatteri appaiono come cellule singole per la maggior parte dell'anno. Tuttavia si possono formare delle microcolonie principalmente in tarda estate ed autunno (Passoni and Callieri, 2001) quando parte del prodotto di fotosintesi viene escreto, in condizioni di nutrienti limitanti, in forma di mucopolisaccaridi che facilitano la formazione di questi aggregati (Crosbie *et al.*, 2003).

L'analisi delle serie temporali del Lago Maggiore relative al picoplancton (Callieri and Piscia, 2002) ha mostrato che l'importanza relativa di questa componente rispetto alla biomassa totale del fitoplancton è andata aumentando nel corso della oligotrofizzazione (Callieri and Piscia, 2002). Per quanto riguarda la distribuzione verticale nei grandi laghi profondi i picocianobatteri possono raggiungere le densità massime nelle zone di confine tra epilimnio ed ipolimnio dove arrivano a costituire, assieme ad altri organismi autotrofi, quello che viene chiamato *Deep Chlorophyll Maximum* (DCM; Padisak *et al.*, 1997; Callieri *et al.*, 2007a) cioè un massimo di clorofilla in profondità.

I picocianobatteri sono una componente fondamentale del 'microbial loop' poiché rappresentano una preda di ciliati e flagellati (Simek *et al.*, 1995; Pernthaler *et al.*, 1996). Un bilancio annuale dei flussi di energia nel Lago Maggiore ha stimato che circa l'80% del carbonio prodotto da questi organismi

è trasferito nei protozoi e incanalato verso il metazooplancton (Callieri *et al.*, 2002).

Recentemente è stato anche effettuato uno studio sulla fisiologia e diversità dei picocianobatteri del Lago Maggiore, utilizzando come strumento di analisi la DGGE (16S; Callieri *et al.*, 2007b). Sono state ottenute anche parziali sequenze del 16S rDNA dalla riamplicazione delle bande della DGGE e ciò ha dimostrato la presenza di ceppi primaverili diversi da quelli tardo-estivi sulla base della somiglianza con ceppi presenti nelle banche dati.

Metodologie di studio

Campionamenti

I campionamenti effettuati nell'anno 2006 sono stati eseguiti con cadenza più o meno quindicinale da marzo a settembre nel periodo stagionale nel quale vi è sviluppo della comunità picocianobatterica (Weisse, 1988; Postius and Ernst, 1999; Callieri and Stockner, 2002; Crosbie *et al.*, 2003). Sono stati prelevati campioni in centro lago (stazione di Ghiffa) nel punto di massima profondità, a 3 m e 20 m. Si è scelto di campionare questi strati perchè spesso vi si è osservato un picco di abbondanza della comunità fitoplanctonica (Callieri and Piscia, 2002; Passoni *et al.*, 1997).

Con bottiglie a chiusura si sono prelevati campioni per le analisi genetiche, per il conteggio e la stima della biomassa della comunità picocianobatterica e per l'analisi del fosforo.

L'utilizzo della polisonda IDRONAUT (Ocean Seven 316) ci ha permesso di avere anche i profili verticali dei principali parametri limnologici (temperatura, luce, clorofilla *in vivo*, pH, ossigeno, conducibilità).

Conteggi e biomassa della comunità picocianobatterica

Immediatamente dopo il prelievo i campioni venivano trasferiti in bottiglie di vetro da 100 ml e fissati con formaldeide al 20% tamponata con cacodilato alla concentrazione finale del 2% (Hayat, 1981; Callieri and Stockner, 2002). La formaldeide al 20% è stata preparata partendo da una soluzione al 40%, filtrata su filtri da 0.45 μm e successivamente diluita al 20% con tampone cacodilato 0.1 M. L'uso di formaldeide al 20% con tampone cacodilato preserva le cellule senza alterarne le caratteristiche morfologiche ed è perciò stata consigliata in diversi protocolli (Straškrabová *et al.*, 1999; Callieri and Stockner, 2002).

I campioni venivano contati immediatamente o mantenuti a 4°C al buio; è comunque necessario effettuare il conteggio entro una settimana o almeno preparare i filtri da contare e congelarli, per essere sicuri di non avere perdite considerevoli di fluorescenza dai pigmenti (Callieri and Stockner, 2002).

La filtrazione è stata eseguita con un apparato di filtrazione dalla superficie nota e su una membrana in policarbonato (Osmonics) con porosità di 0.2 μm creando un vuoto di circa 5-10 kPa (Kuuppo-Leinikki and Kuosa, 1989; MacIsaac and Stockner, 1993). Il conteggio delle cellule di picofitoplancton è stato effettuato mediante tecniche di microscopia ad epifluorescenza (Johnson and Sieburth, 1979; Waterbury *et al.*, 1979; Davis and Sieburth, 1982); tali tecniche si basano sulla naturale autofluorescenza dei pigmenti fotosintetici (clorofilla e ficobiline) delle cellule. In questo modo le cellule autotrofe sono così facilmente distinguibili dal picoplancton eterotrofo.

I pigmenti autofluorescenti primari che permettono l'individuazione in epifluorescenza sono la clorofilla *a* (chl *a*) e le ficobiline (ficoeritrine e ficocianine). La chl *a* è presente in tutto il picofitoplancton ed è fortemente eccitata da lunghezze d'onda nel blu-violetto (420-440 nm) che emettono nella fascia del rosso (670-690 nm). Eccitate con luce blu le ficocianine emettono nel rosso (640-660 nm) e le ficoeritrine nel giallo-arancio (550-580 nm). Quindi, al microscopio ad epifluorescenza è possibile visualizzare e contare i picocianobatteri eccitandone la fluorescenza con radiazione nel blu-violetto.

Per il conteggio dei campioni del Lago Maggiore è stato utilizzato un microscopio ad epifluorescenza Axioplan (ZEISS) dotato di lampada HBO 100 W, di un obiettivo Neofluar 100x, oculari 10x e di un set di filtri per l'eccitazione nel blu (Zeiss 487909, BP 450-490, FT 510, LP520). Durante il conteggio, a 1250 ingrandimenti, le cellule procariote si distinguono per il loro colore giallo-arancio. Il conteggio è stato effettuato su campi microscopici randomizzati, fino al raggiungimento almeno di 400 cellule (Lund *et al.*, 1958).

Dal numero medio di cellule per campo si può risalire alla concentrazione del campione (cell ml⁻¹) tramite la seguente formula:

$$\text{Densità (cell ml}^{-1}\text{)} = F \times \frac{N}{\text{ml filtrati} \times 0.95}$$

dove:

N = numero medio di cellule per campo;

F = fattore di conversione derivato dal rapporto: superficie di filtrazione/area del campo oculare microscopico. A 1250 ingrandimenti è uguale a 8835;

0.95 = fattore di correzione dovuto al fatto che il campione di 100 ml è stato diluito con 5 ml di fissativo.

Le misure per il calcolo del biovolume cellulare dei picocianobatteri sono state ottenute utilizzando un sistema di analisi d'immagine (Image Pro-Plus) che permette l'elaborazione delle immagini catturate, mediante telecamera ad alta sensibilità montata sul microscopio, dal filtro usato per il conteggio. Il sistema è semiautomatico e chi esegue le misure stabilisce l'intensità luminosa soglia per passare ad un'immagine binaria; esso è quindi in grado di misurare automaticamente asse maggiore, asse minore e area delle cellule. Il volume è calcolato per due tipi morfologici: cocci e bacilli. I cocci vengono considerati prossimi a sfere mentre i bacilli sono visti come un cilindro con un'emisfera a ciascuna estremità. Le misure sono state prese a 787.5 ingrandimenti. Per ciascun campione enumerato sono state prese le misure di almeno 100

individui, una volta calcolato il biovolume medio cellulare, si è proceduto al calcolo della biomassa totale dei picocianobatteri nel seguente modo:

$$\begin{aligned}\text{biomassa (mm}^3 \text{ m}^{-3}\text{)} &= \text{densità totale picocianobatteri} \times \text{biovolume cellulare medio} \\ &= (\text{cell ml}^{-1}) \times (\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}) \times 10^{-3}\end{aligned}$$

Analisi del Fosforo

La misura delle concentrazioni del fosforo è stata effettuata su tutti i campioni prelevati. Si è utilizzato il metodo colorimetrico che prevede un'ossidazione in autoclave ed una successiva determinazione delle concentrazioni tramite lettura allo spettrofotometro (A.P.H.A., 1985).

Il fosforo totale (TP), reattivo (SRP) e totale disciolto (TDP), vengono determinati per reazione dell'ortofosfato ottenuto dopo ossidazione con l'ammonio molibdato ed il potassio antimonio tartrato. La reazione porta alla formazione del complesso antimonio fosfomolibdico che, una volta ridotto dall'acido L-ascorbico si converte in un complesso blu che presenta un massimo di assorbanza a 895 nm. Il campione, dopo circa 15 minuti dall'aggiunta della miscela di reazione, assume una colorazione blu la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione di fosforo. Il fosforo totale disciolto ed il fosforo reattivo sono stati analizzati dopo una preliminare filtrazione (su filtri GF/C 1-0.8 μm). Il fosforo totale non prevede invece nessuna filtrazione. La digestione in autoclave (120°C per 30 minuti a 1 atm) viene effettuata con l'aggiunta di persolfato di potassio solo per la determinazione del TP e TDP.

Sonda Multiparametrica

I principali parametri limnologici dell'intera colonna d'acqua sono stati misurati *in situ* con una sonda multiparametrica IDRONAUT (mod. OS316; Fig. II.2), in grado di misurare i seguenti parametri: temperatura, conducibilità, PAR (Photosynthetically Active Radiation), pH, concentrazione di ossigeno disciolto e di clorofilla *in vivo*.

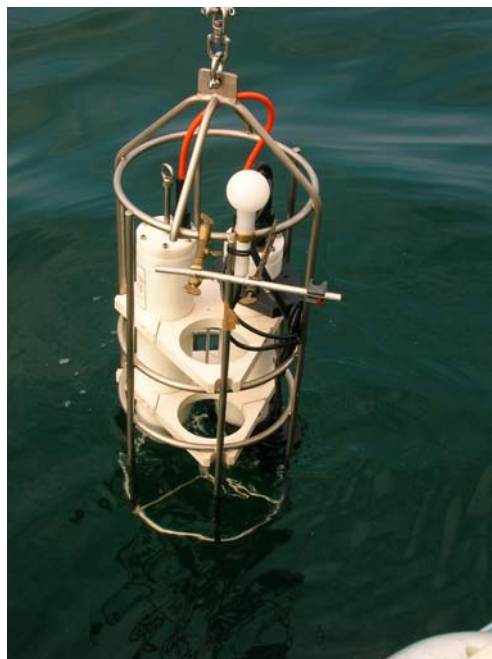


Fig. II.2 - Sonda multiparametrica IDRONAUT (mod. OS316).

Il sensore della pressione è in grado di generare un segnale costante con risoluzione dell'ordine del centimetro dalla superficie fino a profondità elevate (raggiunte in mare). Il sensore della temperatura consiste in una resistenza termometrica di platino (Pt 100) alloggiata in una sede di acciaio inossidabile in grado di resistere fino a 7000 m di profondità. Il sensore necessita appena di 50 ms per stabilizzarsi e dare un valore attendibile. Il sensore per la misura della conducibilità è costituito da una cella con elettrodi di platino affacciati, attraverso i quali scorre l'acqua durante la calata della sonda. La cella è montata in uno speciale dispositivo in grado di realizzare la compensazione della pressione. La lettura stabile dei valori di conducibilità si ottiene dopo 50 ms con un flusso idrico con velocità di 1 m s^{-1} .

La misura dell'ossigeno è stata effettuata con un sensore di tipo polarografico con un anodo costituito da un tubo d'argento che circonda un corpo in vetro contenente un ago di platino che funge da catodo. Lo spazio libero presente nel sensore è riempito con un elettrolita che permette il passaggio del flusso di corrente tra l'anodo e il catodo. Una membrana permeabile ai gas ricopre

completamente il sensore evitando la fuoriuscita dell'elettrolita. L'errore di questo sensore è stimato intorno al 3%. La concentrazione di ossigeno è espressa in percentuale di saturazione ed in ppm. Le due grandezze sono legate dalla relazione:

$$\text{ppm} = \text{saturazione} \times \text{solubilità} / 100.$$

La calibrazione del sensore avviene in aria aperta. La lettura ottenuta durante la calibrazione è definita come il 100% di saturazione per quella particolare temperatura dell'aria.

Il corpo del sensore per la misurazione del pH è in titanio con l'estremità in vetro resistente fino a 150 bar ed internamente è formato da una cella in argento/cloruro d'argento in un gel solido di cloruro di potassio (3 M). Un sensore di riferimento costruito in maniera simile gli è associato. Il sensore presenta la particolarità di avere un minuscolo foro sulla punta del corpo in vetro per permettere una compensazione della pressione tra il gel elettrolita interno e l'acqua esterna, così da garantire una miglior efficienza di funzionamento ed un range di pressioni di esercizio più elevato.

Il sensore per la misura *in vivo* della clorofilla è un fluorimetro (Seapoint Chlorophyll Fluorometer). La clorofilla contenuta nelle alghe è eccitata da una sorgente di luce blu (470 nm) ed emette fluorescenza nel rosso (685 nm) con una intensità proporzionale alla concentrazione di clorofilla presente nel cammino ottico del fluorimetro. La luce emessa dalla clorofilla *a* passa attraverso la finestra di rilevamento per poi essere collimata tramite una lente su di un filtro selezionante la lunghezza d'onda utile (685 nm). La stabilità della lettura si ottiene dopo 0.6 ms dall'accensione e la sensibilità dello strumento è tale da consentire misure di concentrazione di clorofilla *a* attorno ad 1 µg l⁻¹. La particolare conformazione dello strumento impedisce alla luce ambientale di arrivare direttamente al rilevatore.

La radiazione subacquea è misurata grazie al sensore (Li-cor, SPHERICAL QUANTUM SENSOR modello 3361) che è una fotocellula al silicio. È utilizzato per la misurazione del PAR (Photosynthetically Active Radiation) negli

ambienti acquatici ed in modo specifico la PPFFR (Photosynthetic Photon Flux Fluence Rate) che riguarda i fotoni aventi una lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 700 nm incidenti per unità di tempo sulla superficie di una sfera. La radiazione è espressa in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e, pur essendo il sensore attivo fino alla massima profondità, viene presa in considerazione solo fino al raggiungimento del 1% della radiazione superficiale dove si situa il limite della zona eufotica (Z_{euf}).

Zona di mescolamento (Z_m)

La zona di mescolamento attivo della colonna d'acqua può essere calcolata in diversi modi. Ad esempio si può utilizzare il numero di Richardson, o il numero di Wedderburn (Davis *et al.*, 2003), altrimenti si può calcolare la stabilità della colonna d'acqua utilizzando la frequenza di Brunt-Väisälä.

In questa ricerca però la profondità di mescolamento è calcolata valutando solamente il profilo termico: Z_m è definita come quella profondità dove c'è il massimo gradiente di temperatura. Nel caso poi compaia nel profilo termico un secondo gradiente, tra i due si tiene come limite inferiore dello strato mescolato quello che presenta il gradiente più elevato (Hocking and Straskraba, 1999). Infine, per stabilire Z_m nei periodi in cui il mescolamento supera i 30 m di profondità sono stati analizzati i profili termici presenti in Ambrosetti e collaboratori (2007).

Quando Z_m supera la profondità della zona eufotica (Z_{euf}), il popolamento algale durante il mescolamento si trova per un certo tempo nella zona afotica. In questa situazione si possono verificare dei mutamenti, anche adattativi, a livello della comunità fitoplanctonica in risposta alle differenti condizioni ambientali (Reynolds, 1984). Uno dei più semplici metodi per rappresentare questa relazione è il rapporto Z_m/Z_{euf} . Quando questo valore è maggiore di 1 significa che le alghe nel mescolamento non sempre si trovano in condizioni di illuminazione e quindi trascorrono parte del loro tempo in condizioni di

assenza di luce fotosinteticamente attiva. Questi periodi al buio sono tanto più lunghi quanto più questo rapporto (Z_m/Z_{euf}) aumenta.

Analisi molecolari

Le analisi genetiche eseguite sui campioni del Lago Maggiore sono state ampiamente descritte nel capitolo precedente. Vi sono però alcune considerazioni da aggiungere quando si vogliono analizzare e discutere dati genetici con dati di dinamica spazio temporale ottenuti con FTs.

Uno dei fattori limitanti del trattamento dei dati (per T-RFLP e ARISA) è la procedura di standardizzazione che secondo molti autori deve essere utilizzata molto attentamente (Dunbar *et al.*, 2001). Infatti se un campione in tutto il set di dati fosse caratterizzato da una fluorescenza totale (e quindi una quantità di DNA) molto inferiore rispetto agli altri, la procedura di standardizzazione del campione su tutto il set produrrebbe una perdita della maggior parte dei dati ed una distorsione delle relazioni tra i campioni.

Si può ovviare a questo problema cercando di minimizzare la variazione del rapporto che c'è tra un campione ed un altro aggiungendo la stessa quantità di DNA per l'analisi di fingerprinting. Questa operazione è facilitata misurando la quantità di DNA con strumenti appositi (Qubit, Invitrogen).

La procedura di standardizzazione ci permette, con i dovuti accorgimenti, di quantificare il peso di ogni singola unità tassonomica nella composizione di un singolo campione ed osservare un'eventuale successione di ceppi durante il periodo di studio. Questa elaborazione è stata eseguita solo sui campioni di T-RFLP e di ARISA.

Trattamento dei dati

Analisi molecolari (da Hughes and Bohannan, 2004)

Gli studi di diversità microbica ambientale soffrono di una problematica comune anche ad altri studi ecologici, cioè possono campionare solo una

frazione piccola dell'intera comunità. La sfida degli ecologi microbici, ma anche dell'ecologo *sensu stricto*, è quella di comparare la diversità di una comunità usando dei subcampioni quando la stragrande maggioranza delle specie (unità tassonomiche) è sconosciuta. Dopo aver analizzato un subcampione il passo successivo è di caratterizzare questa diversità con indici descrittivi (indici di diversità classici o indici di similarità).

Gli indici di diversità esprimono la ricchezza in specie e la evenness in un campione. La ricchezza, o numero delle differenti OTUs, è la misura più semplice della diversità di una comunità, ma non include nessuna informazione sulla relativa abbondanza delle differenti unità tassonomiche. Per contrasto invece la evenness descrive l'importanza relativa delle diverse OTUs e permette perciò di individuare le OTUs dominanti.

Gli indici di diversità si differenziano uno dall'altro a seconda se incorporano ricchezza e evenness in un solo numero. Uno di questi è l'indice di Shannon (H') che è ampiamente applicato ai dati microbici ed assume il valore massimo quando tutte le OTUs sono equamente distribuite:

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

dove: S è il numero delle OTUs e P_i la relativa importanza della i -esima OTU.

Altri indici sono l'indice di Fisher (alfa) e Simpson. Quest'ultimo è pesantemente influenzato dall'abbondanza delle OTUs più comuni.

Quando si vuole comparare statisticamente la diversità microbica, per esempio tra ambienti, una delle prime assunzioni è che la diversità genetica (sia ricchezza che evenness) del sottocampione sia direttamente correlata con la diversità del campione più grande. Se i campioni sono comparabili in grandezza allora basta utilizzare analisi parametriche o non-parametriche della variazione e si può testare se la ricchezza media o l'indice di diversità sia statisticamente differente tra ambienti (o campioni).

Per T-RFLP e ARISA sono stati calcolati indici di diversità di Shannon, mentre per DGGE questi indici non sono stati calcolati per alcuni limiti quantitativi e di ripetibilità dell'analisi, esposti nel capitolo precedente.

Gli indici di diversità sono stati calcolati usando l'altezza del picco che si assume rappresenti la relativa abbondanza di ciascun genotipo. Comunque, sebbene questa procedura è stata largamente utilizzata per il calcolo di questi indici (Hewson and Fuhrman, 2004; Luna *et al.*, 2004, 2006) deve essere usata con estrema cautela (Dunbar *et al.*, 2000, 2001), dato che le analisi elettroforetiche possono essere influenzate dall'interferenza tra i frammenti più piccoli e grandi e non si può escludere per T-RFLP in particolare che l'uso di enzimi di restrizione diversi possa condurre ad una differente stima della diversità e evenness di una comunità microbica.

Un altro modo di esprimere la diversità è quello di caratterizzare la similarità tra i diversi campioni con indici di similarità che riassumano la somiglianza della composizione tra due campioni. Molti di questi indici si basano sulla presenza-assenza delle unità tassonomiche (Jaccard, Sorensen, ecc.). Altri indici invece tengono conto anche della relativa abbondanza di ogni OTU (Bray-Curtis, Whittaker, ecc.). Questi indici possono essere valutati per formulare ipotesi sulla differente composizione della comunità. Per fare questo test bisogna calcolare l'indice di similarità tra tutti i campioni fino a produrre una matrice di similarità (software PopTools). Il secondo passo è quello di collegare queste similarità graficamente utilizzando un algoritmo di cluster (software Mega3).

Il calcolo degli indici di presenza-assenza sono stati eseguiti utilizzando diverse formule presenti in bibliografia. È stato scelto di visualizzare l'indice di Jaccard, ma anche Sorensen ha prodotto identici risultati. Sono stati calcolati anche indici di similarità che si basano sulla relativa abbondanza delle singole OTU (Bray-Curtis). Le relazioni di questi indici tra i campioni sono state espresse graficamente costruendo una cluster con il metodo UPGMA (Unweighted

Paired Group Mean Average) spesso utilizzato per rappresentare similitudini tra campioni o ambienti in ambito ecologico (Sneath and Sokal, 1973).

Analisi multivariate (tecniche di ordinamento)

Tutte le specie si presentano in un caratteristico, limitato "range" di habitat; all'interno del loro range le specie tendono ad essere più abbondanti entro un ristretto optimum ambientale. La composizione delle comunità biotiche così, cambia lungo questo gradiente (ter Braak and Prentice, 1988). Le tecniche di ordinamento, per esempio quelle canoniche, permettono di relazionare la composizione delle specie della comunità con il loro ambiente.

Questi tipi di analisi del gradiente ambientale sono dette indirette perché, al contrario dell'analisi diretta, considerate un problema di regressione, sono invece un problema di ordinamento in cui gli assi di variazione sono derivati dall'insieme dei dati della comunità. La *Redundancy Analysis* (RDA) spiega la varianza tra i dati delle specie utilizzando una regressione che minimizza il totale delle singole somme residue dei quadrati dei dati selezionando quella combinazione di variabili ambientali che massimizza la distribuzione dei dati delle specie. La percentuale della varianza totale spiegata da un asse è indicata dagli autovalori (*eigenvalues*). RDA costituisce perciò un'efficiente tecnica di ordinamento quando i dati relativi all'abbondanza relative delle specie (od OTU) presentino risposte lineari, nell'ambito di gradienti ambientali ristretti (inertia dell'analisi < 3 determinata con una DCCA iniziale). Se invece le risposte non sono lineari, ma seguono una risposta unimodale (inertia dell'analisi > 3) sarebbe necessario eseguire una Canonical Correspondence Analysis (CCA). Nell'analisi RDA le variabili ambientali da inserire nel modello sono incluse seguendo una "Manual Forward Selection". Ciascuna variabile è inclusa nel modello manualmente in successivi step che sono testati e permutati per ogni nuova variabile (test di Montecarlo, 1000 permutazioni). Le variabili ambientali sono incluse nella RDA solo se con $P < 0.05$. Le OTU ($> 5\%$) sono state trasformate (radice quadrata) per ridurre eventuali sbilanciamenti dell'analisi

legate ad un maggiore varianza delle OTU percentualmente più abbondanti. Non si è resa necessaria una trasformazione logaritmica dei parametri ambientali poiché nel Lago Maggiore i singoli valori non presentano variazioni elevate (Marchetto pers. comm.).

La RDA è una forma canonica della *Principal Component Analysis* (PCA). A differenza della PCA, la RDA considera anche le combinazioni lineari di variabili ambientali, scegliendo quella che descrive la massima varianza. In questo modo si ha un'idea della correlazione tra la frequenza relativa delle OTU presenti nei campioni e le variabili ambientali.

L'interpretazione più semplice è quella grafica. Nel diagramma le OTU e le variabili ambientali sono indicate con una freccia ed i campioni in cui sono state trovate con un punto. C'è un utile simbolismo nell'uso delle frecce. La freccia si rivolge nella direzione di massima variazione nell'abbondanza della OTU, e la sua lunghezza è proporzionale al suo tasso di variazione in quella direzione. Conseguentemente, le specie ai margini del diagramma (lontane dall'origine) sono le più importanti per indicare le differenze tra i siti; le specie vicino al centro hanno minor importanza. Inoltre, più le specie si dirigono nella direzione dell'asse più sono correlate con questo. L'angolo tra le frecce delle OTU (o delle variabili ambientali) indica la correlazione (o covarianza) tra esse. Se l'angolo tra le frecce è di 90° la correlazione (o covarianza) tra le OTU (o le variabili ambientali) è nulla.

Per effettuare tali analisi è stato utilizzato il programma CANOWIN, versione per Windows di CANOCO (ter Braak and Smilauer, 1998).

Risultati

Caratteristiche della colonna d'acqua

Le caratteristiche termiche della colonna d'acqua del Lago Maggiore nel periodo di studio sono tipiche di un lago temperato boreale, con un riscaldamento primaverile delle acque superficiali che porta all'instaurarsi di un termoclinio a partire da maggio e che perdura fino agli inizi di ottobre. Il termoclinio è reperibile in estate a profondità variabile dai 10 ai 16-17 metri. L'evoluzione termica del lago (Fig. II.3) ed i principali cambiamenti fisici della colonna d'acqua sono riportati in tabella II.2.

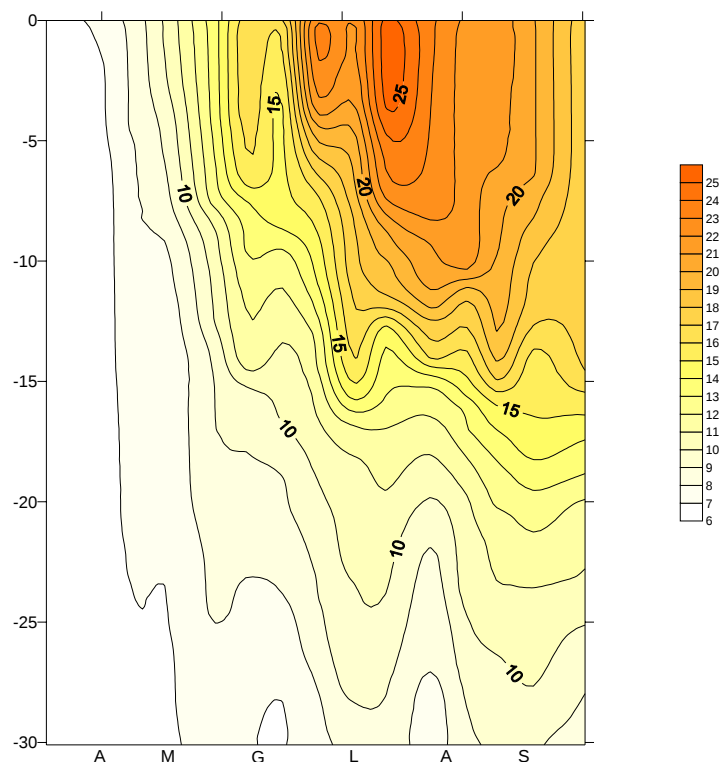


Fig. II.3 - Isoterme del Lago Maggiore 2006 nel periodo di studio.

La profondità della zona eufotica (1% della PAR, *Photosynthetically Active Radiation*, Fig. II.4) ha avuto il suo massimo il 22 marzo (26 m) ed il suo minimo il 10 maggio (8.5 m).

Tab. II.2 - Riassunto della profondità di mescolamento (Z_m) e del rapporto Z_m/Z_{euf} del Lago Maggiore 2006.

Data	Z_m (m)	Z_m/Z_{euf}
22 marzo	>30	>2.5
06 aprile	>30	>2.5
20 aprile	>30	>2.5
10 maggio	7.5	0.88
24 maggio	6.5	0.52
07 giugno	8.5	0.70
21 giugno	3.5	0.22
20 luglio	15.5	1.24
09 agosto	11.5	0.92
23 agosto	10	0.77
05 settembre	15	1.5
19 settembre	12.5	0.78

La profondità media della zona eufotica è stata, nel 2006, di 13.6 m. La profondità di campionamento è stata vicina alla profondità dello 0.1% della PAR (media: 19.2 m).

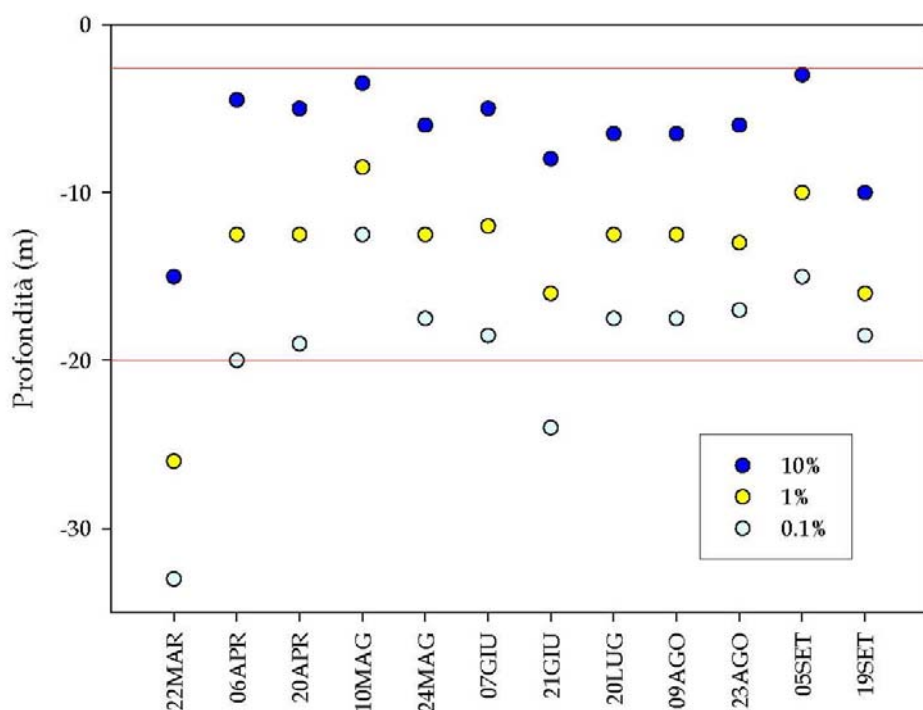


Fig. II.4 - Variazioni stagionali della profondità della zona eufotica (1% in giallo) in relazione alla profondità di campionamento (3 m e 20 m, riga rossa continua) e al 10% e 0.1% della radiazione (PAR) misurata in superficie, nel Lago Maggiore 2006.

Il fosforo totale (TP) presenta il suo massimo il 20 aprile a 3 m con $14 \mu\text{g l}^{-1}$ ed il suo valore minimo con $3 \mu\text{g l}^{-1}$ il 5 settembre a 3 m. La concentrazione massima del fosforo totale disciolto è stata massima a 20 m il 22 marzo ed il 19 settembre ($9 \mu\text{g l}^{-1}$). Il 19 settembre la concentrazione di TDP è stata uguale a quella di TP dimostrando la dominanza della frazione disciolta di questo nutriente. Al contrario il 6 aprile il fosforo era quasi esclusivamente in forma particellata. Infine il valore più elevato di SRP è stato misurato il 22 marzo a 20 m con quasi $7 \mu\text{g l}^{-1}$.

Non vi è differenza statisticamente significativa (paired t-test) tra la serie 3 m e quella 20 m per tutte le diverse frazioni del fosforo (Fig. II.5). Tuttavia vi è una correlazione significativa, negativa, r (Sperman) = -0.655, ($P < 0.05$), tra l'abbondanza dei picocianobatteri a 3 m ed il valore del fosforo totale a 3 m.

Gli altri parametri misurati con la sonda multiparametrica (conducibilità, pH, percentuale di saturazione dell'ossigeno, chl *in vivo*) non verranno mostrati nella parte dei risultati, ma soltanto utilizzati per le analisi statistiche multivariate.

Dinamiche spazio-temporali dei picocianobatteri nel Lago Maggiore

L'analisi della diversità della comunità naturale picocianobatterica del Lago Maggiore per l'anno 2006 è stata effettuata per tutto il periodo primaverile-estivo, da marzo a settembre.

Le dinamica spazio-temporale dei picocianobatteri, già parzialmente descritta nel capitolo precedente, è stata caratterizzata da una certa stabilità e ha mostrato un unico picco a 3 m di oltre $350 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$. A 20 m il numero delle cellule è stato modesto durante il periodo di studio e non ha presentato il consueto DCM intorno ai 10-15 m. Non è inoltre apparso alcun notevole picco primaverile, spesso osservato in altri anni (Callieri and Piscià, 2002).

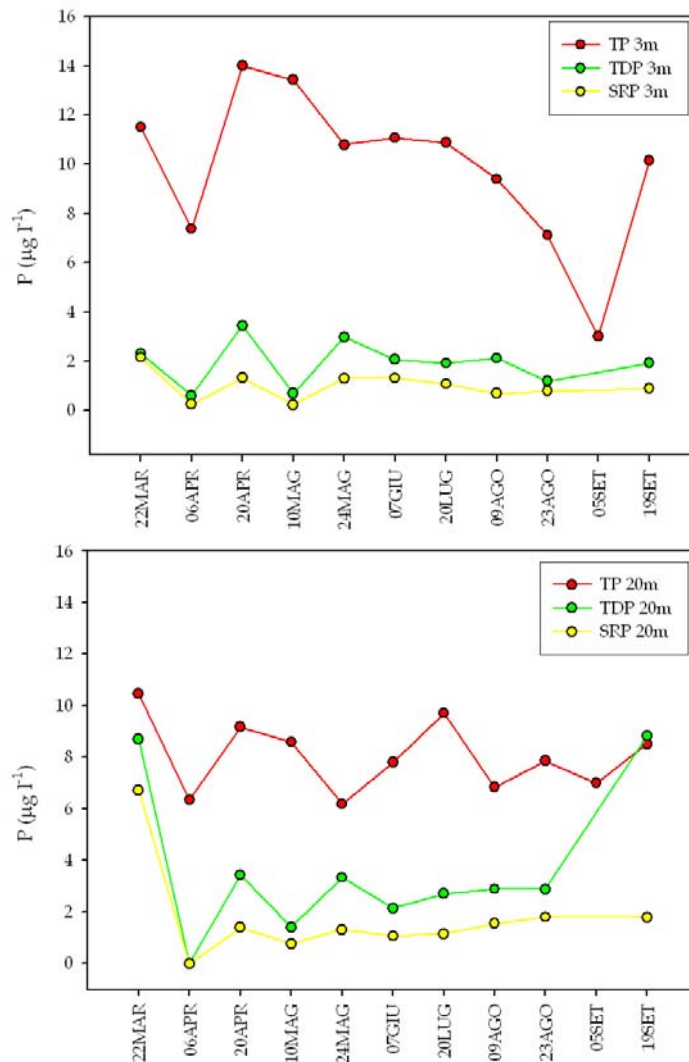


Fig. II.5 - Variazioni stagionali della concentrazione di fosforo nella frazione totale (TP-rosso), totale disciolta (TDP-verde) e reattiva solubile (SRP- giallo), a 3 m e 20 m nel Lago Maggiore, 2006.

Si sono osservate delle variazioni del biovolume cellulare dei picocianobatteri (sia nelle cellule coccoidali che in quelle a bastoncelli) lungo il corso dell'anno (Tab. II.3) con i valori più elevati in corrispondenza del 22 marzo ($1.44 \mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$) contro una media annuale di $0.63 \mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$. Durante il periodo estivo inoltre, si è osservato un aumento dell'asse maggiore delle cellule che quindi erano prevalentemente a bastoncello.

Tab. II.3 - Riassunto del biovolume medio e dell'asse maggiore medio delle cellule di picocianobatteri (valore 0-20 m).

Data	Biovolume ($\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$)	Lunghezza asse maggiore (μm)
22 marzo	1.44	1.40
06 aprile	0.09	0.62
20 aprile	0.16	0.73
10 maggio	0.11	0.60
24 maggio	0.12	0.70
07 giugno	0.7	1.29
21 giugno	0.84	1.4
20 luglio	1.14	1.54
09 agosto	0.93	1.43
05 settembre	0.60	1.26
19 settembre	0.73	1.27

Analisi molecolari

I dati di ricchezza di ogni singola analisi e campione sono stati già presentati e discussi nel capitolo precedente. È tuttavia importante valutare da un punto di vista ecologico le variazioni stagionali di abbondanza, diversità e composizione dei picocianobatteri.

Il dato di *evenness* (e quindi anche di Shannon) è stato calcolato per T-RFLP e ARISA, tecniche con le quali è stato possibile quantificare percentualmente la diversa composizione in unità tassonomiche (Fig. II.6).

C'è da osservare che la tecnica ARISA evidenzia una maggiore diversità, rispetto a T-RFLP, statisticamente significativa (t-test; $P < 0.001$), tra le profondità sia in termini di indice di diversità (Shannon) che di omogeneità della composizione (*evenness*). Dai confronti statistici tra gli indici di Shannon delle due profondità emerge una differenza significativa per ARISA (t-test; $P = 0.04$), con valori più elevati a 20 m, ma non per T-RFLP (t-test; $P = 0.17$).

L'analisi della composizione della comunità tramite T-RFLP (Fig. II.7) ci mostra la presenza delle OTU 169 e OTU 173 che sono ubiquitarie e dominanti sia a 3 m che a 20 m per tutto il periodo di studio e costituiscono sempre almeno l'80% della comunità picocianobatterica. Nessuna delle altre unità tassonomiche raggiunge il 5% della composizione totale.

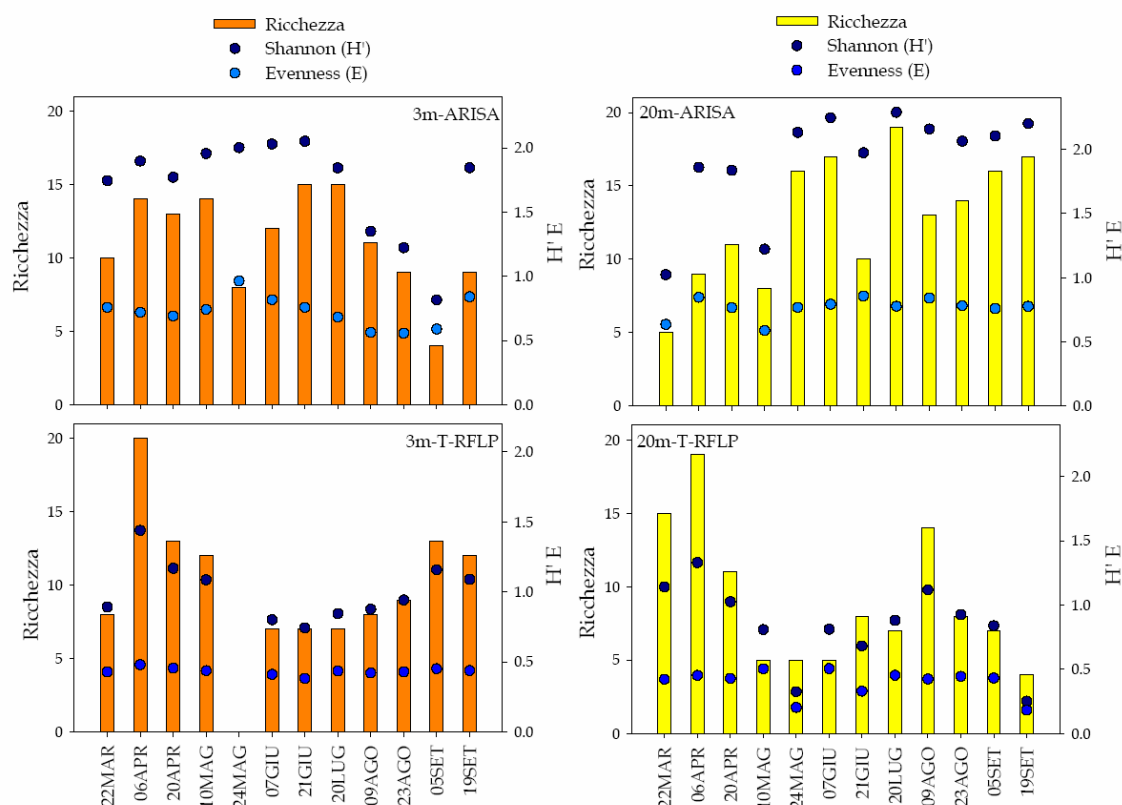


Fig. II.6 - Ricchezza, Indice di Shannon e Evenness 3 m e 20 m per ARISA (sopra) e T-RFLP (sotto). I valori mancanti sono dovuti a PCR senza successo.

Nell'analisi della composizione della comunità tramite ARISA si è scelto di mostrare (per riuscire a seguire anche graficamente la differente composizione e successione dei ceppi) solo i ceppi che almeno una volta durante l'anno (3 m e/o 20 m) compongono più del 5% della comunità picocianobatterica totale (Fig. II.8). Spesso, infatti, in studi di dinamiche fitoplanctoniche (Kruk *et al.*, 2002; Callieri *et al.*, 2006), si sceglie un *cut-off* per le specie dominanti del 5%. La dinamica visibile dalla figura ci permette di osservare una successione dei ceppi dominanti sia a 3 m che a 20 m. Non ci sono, tuttavia, come era visibile nei risultati della T-RFLP, OTU ubiquitarie. L'OTU 1073 è l'unità tassonomica che costituisce percentualmente la più alta abbondanza in tutti i campioni analizzati arrivando a raggiungere il 74% il 5 settembre 2006 a 3 m. La OTU 1073 risulta inoltre importante in tutto il periodo estivo (dal 20 luglio al 5 settembre). Altre

unità tassonomiche sono molto importanti nel periodo primaverile, come ad esempio le OTU 1139 e OTU 762 dominanti sia a 3 m che a 20 m.

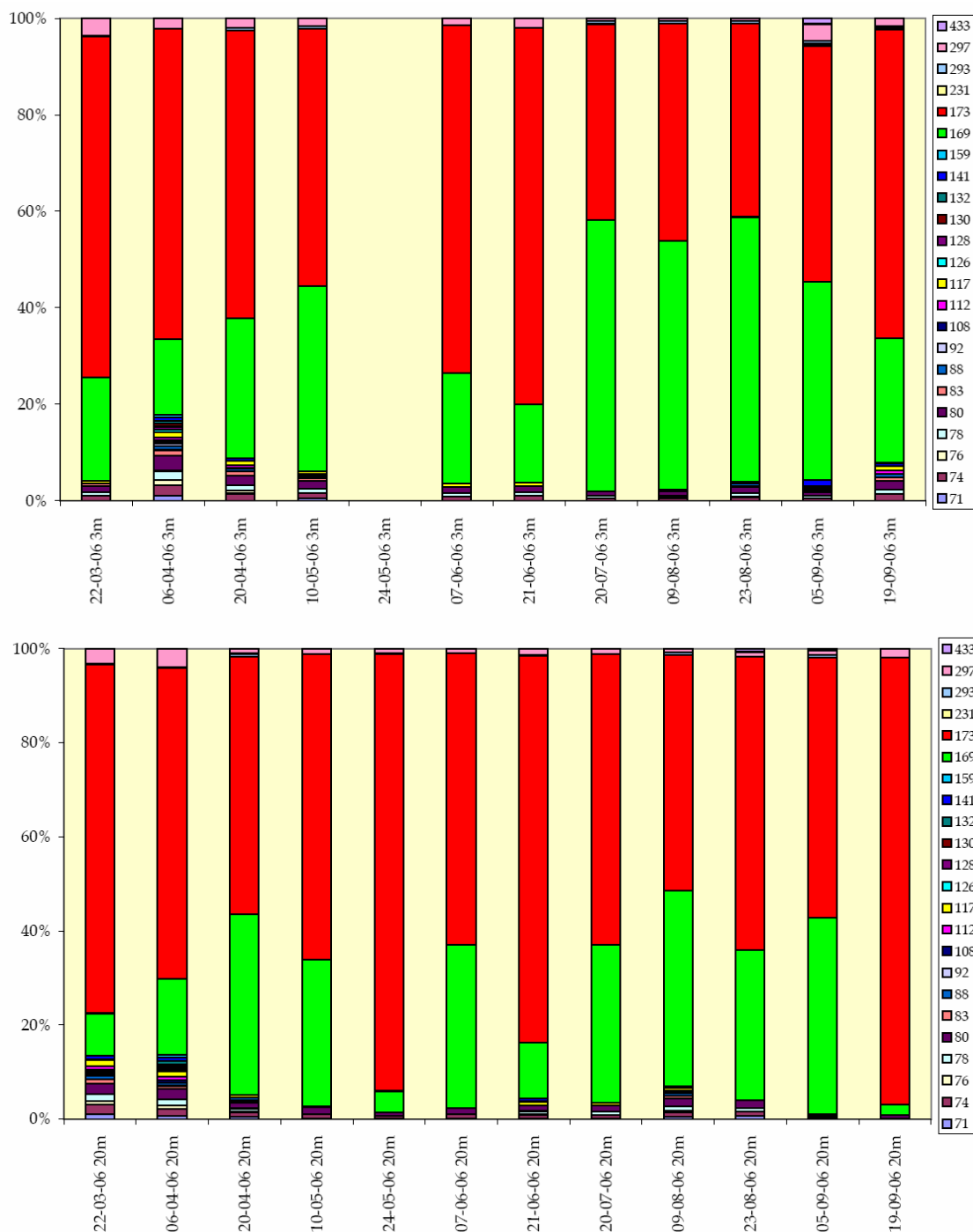


Fig. II.7 - Dinamica spazio-temporale (3 m grafico in alto e 20 m in basso) della percentuale delle unità tassonomiche (OTUs) ottenute con l'analisi della T-RFLP. I valori mancanti sono dovuti a PCR senza successo.

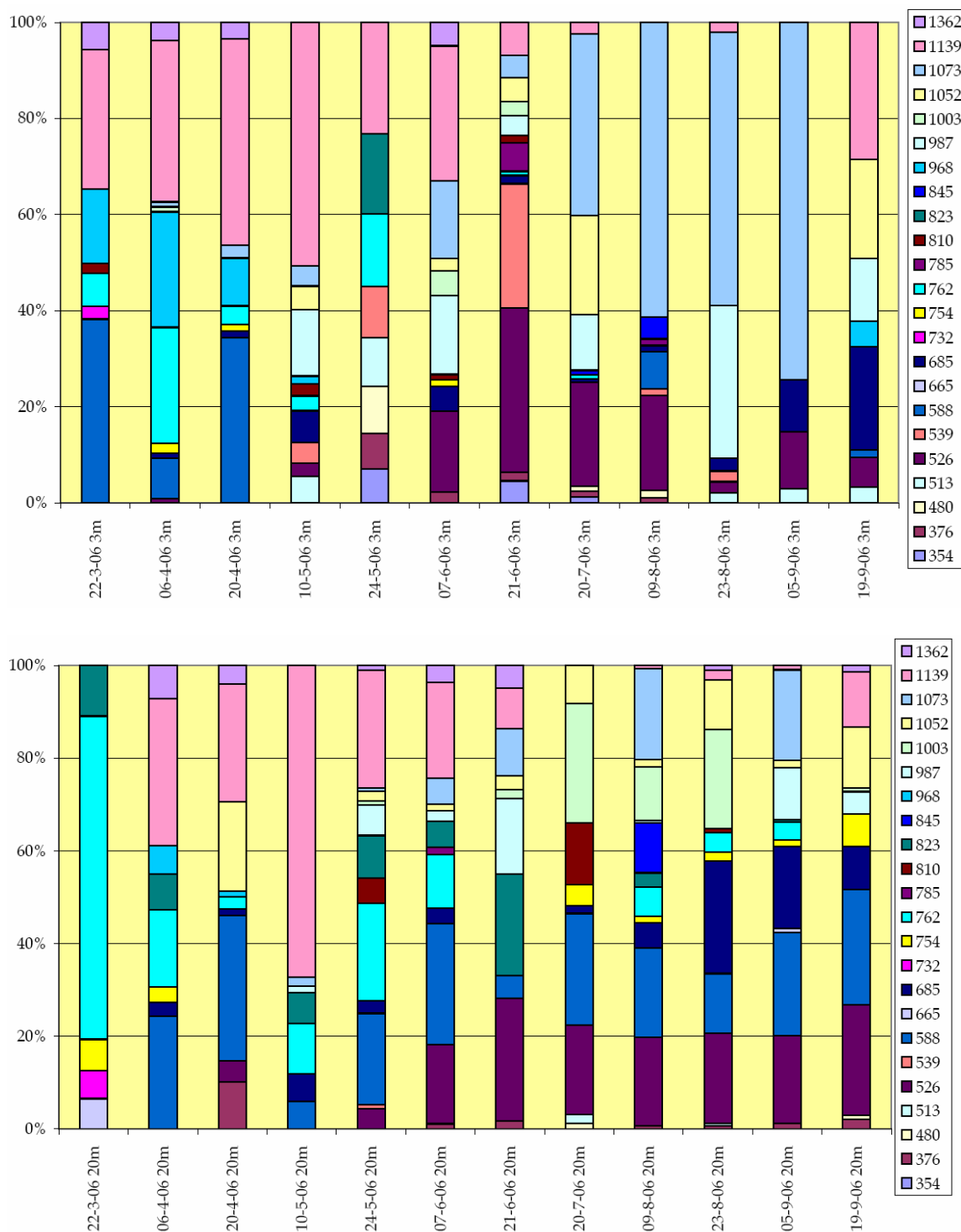


Fig. II.8 - Dinamica spazio-temporale (3 m grafico in alto e 20 m in basso) della percentuale delle unità tassonomiche (OTUs; >5%) ottenute con l'analisi ARISA.

L'OTU 588 è presente tutto l'anno soprattutto a 20 m. Insieme alla OTU 1073, la 588 è sempre presente nel periodo estivo alla profondità di 20 m. Infine altre OTU come la 526 compaiono sia a 3 m che a 20 m nel periodo estivo.

Gli indici di similarità (Figg. II.9-10) riflettono la composizione dei campioni qui sopra esposta e per T-RFLP, sia Jaccard (presenza-assenza), che Bray-Curtis (anche abbondanza), non ci permettono di differenziare dei chiari raggruppamenti nel corso dell'anno. Infatti, la distanza tra tutti i campioni è molto bassa: 0.25 per Jaccard e 0.14 per Bray-Curtis. Molti campioni infatti nel calcolo di presenza-assenza sono completamente simili. Dall'analisi della similarità della composizione dei campioni per ARISA (Figg. II.11-12), soprattutto con l'indice di Bray-Curtis, la distribuzione delle principali unità tassonomiche permette di individuare nettamente dei cluster nel corso dell'anno. Ad una distanza di 0.35 si osservano due cluster distinti, uno che raggruppa i campioni di inizio primavera (con l'eccezione di 19 settembre 3 m) fino al 24 maggio ed un altro che raggruppa i campioni estivi da giugno a settembre. Analizzando in dettaglio i due principali cluster non emergono differenze tra i campioni di 3 m e quelli di 20 m nel cluster primaverile.

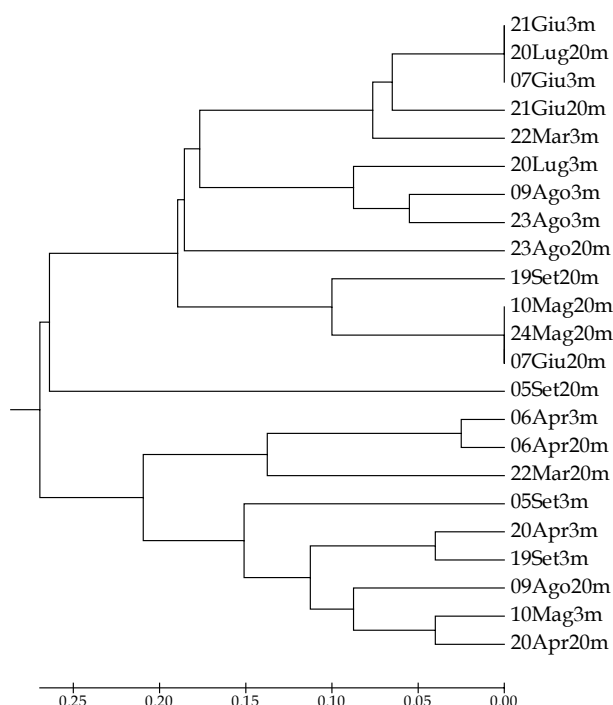


Fig. II.9 - Cluster UPGMA degli indici di similarità di Jaccard della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore utilizzando T-RFLP.

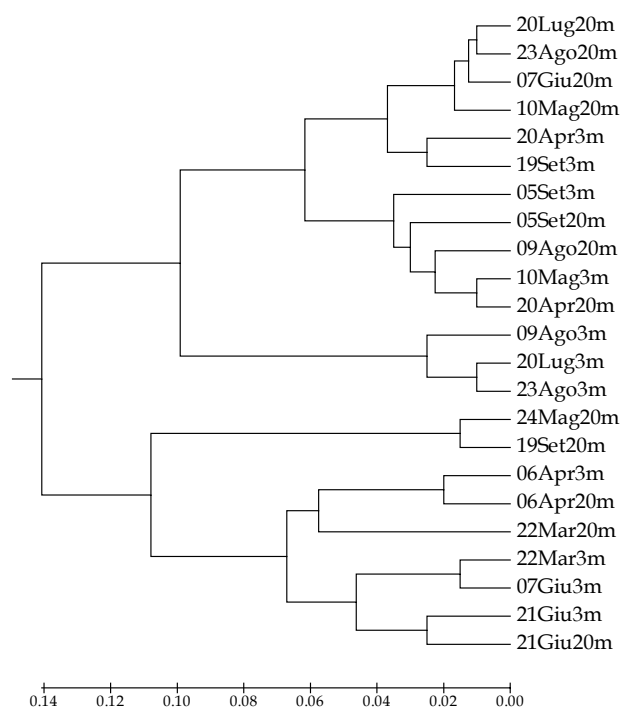


Fig. II.10 - Cluster UPGMA degli indici di similarità di Bray-Curtis della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore utilizzando T-RFLP.

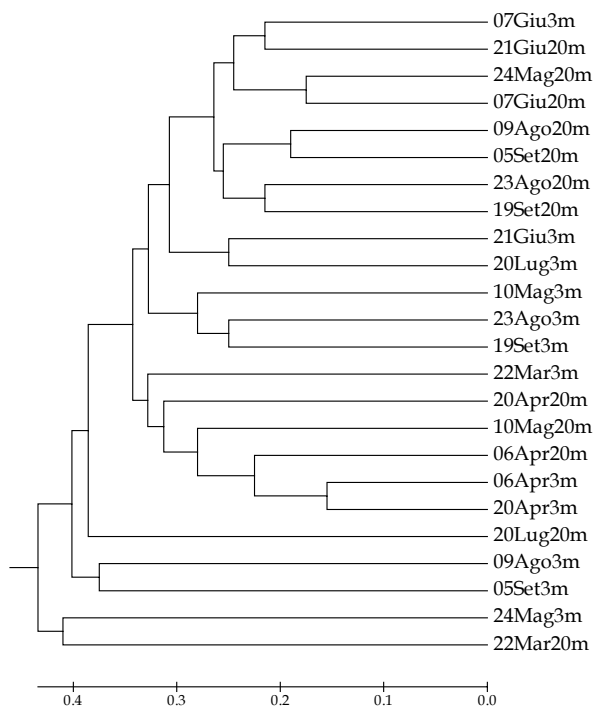


Fig. II.11 - Cluster UPGMA degli indici di similarità di Jaccard della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore utilizzando ARISA.

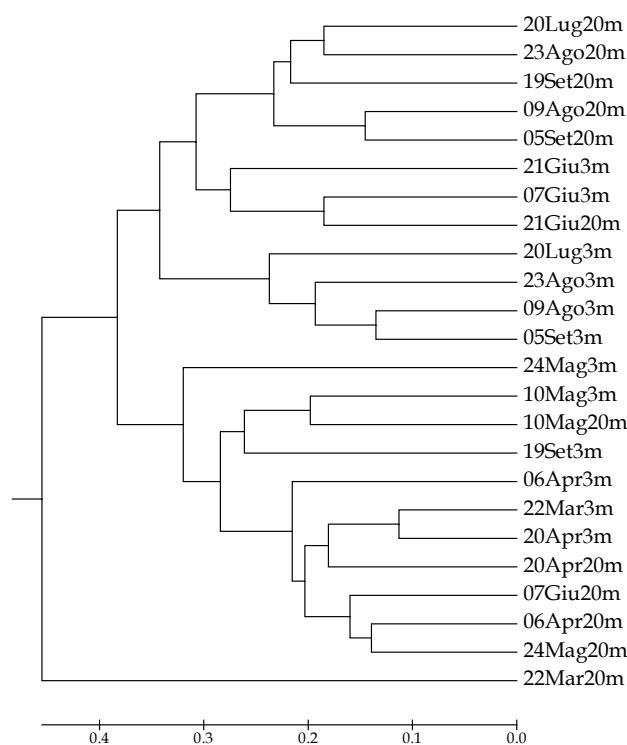


Fig. II.12 - Cluster UPGMA degli indici di similarità di Bray-Curtis della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore utilizzando ARISA.

Nel cluster estivo invece vi è una netta distinzione (0.28) tra un gruppo di campioni di 20 m, uno di 3 m ed uno misto.

Con questa analisi di similarità (Bray-Curtis), utilizzando i dati ricavati dall'analisi dell'ITS-1 (ARISA), si riesce a valutare più in dettaglio la dinamica spazio-temporale della comunità picocianobatterica rispetto ai dati ottenuti con l'analisi del 16S rDNA (T-RFLP). Infatti si è in grado di valutare una successione di OTU dominanti a 3 m, tra la primavera e l'estate, ed una netta distinzione tra le OTU caratterizzanti i 3 m ed i 20 m nel periodo tardo-estivo.

RDA: variabili ambientali significative della dinamica delle OTUs lungo il gradiente ambientale

Dall'analisi multivariata utilizzando RDA come tecnica di ordinamento sono state escluse (test di Montecarlo $P > 0.05$) molte delle variabili ambientali considerate non significative. Le variabili significative interessanti per valutare

la dinamica spazio-temporale della comunità picocianobatterica lungo il gradiente ambientale sono tre: la temperatura ($P < 0.001$), la profondità della zona di mescolamento (Z_m) (Z_m , $P = 0.037$) ed il pH ($P = 0.01$).

La temperatura è la variabile che meglio spiega la varianza del primo asse della RDA (65.3%). Le altre variabili inserite nell'analisi (intensità della luce, clorofilla in vivo, TP, TDP, SRP, disco di secchi, conducibilità, percentuale di saturazione dell'ossigeno) non sono risultate significative ($P < 0.05$), pertanto non sono state rappresentate in figura.

Dal biplot (OTU-variabili ambientali; Fig. II.13) e dal triplot (OTU-campioni-variabili ambientali; Fig. II.14), si può osservare che ci sono molte OTU che si possono considerare tipiche di periodi a temperatura elevata (come la 1073, 539, 827, tra le più importanti) ed altre tipiche di acque più fredde nella prima parte della stagione (588, 732 e 754 tra le più importanti). Nello stesso tempo ci sono anche delle OTU che non sembrano correlate con nessuna di queste variabili e sono visibili pertanto vicine al centro del grafico (per es. 376).

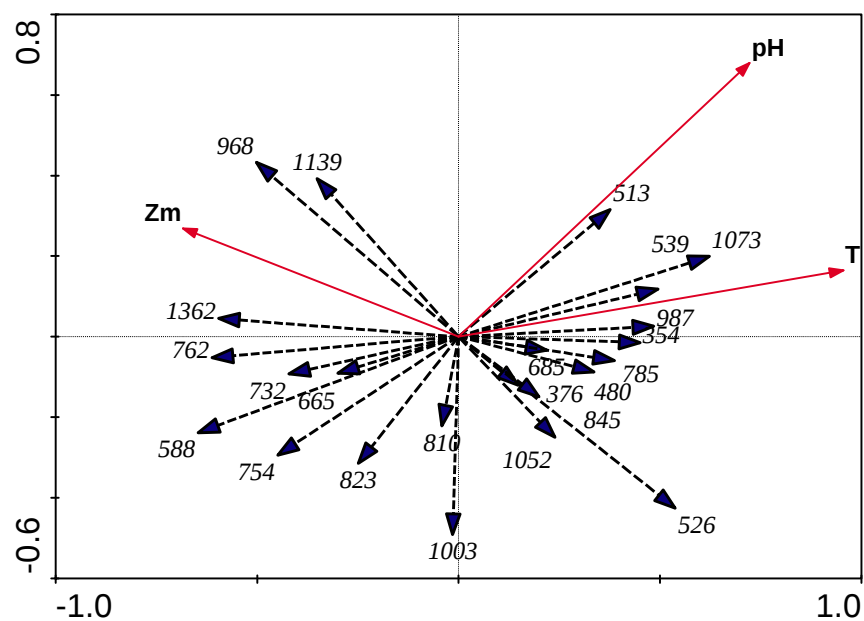
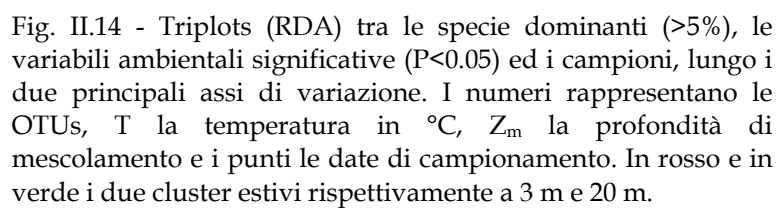


Fig. II.13 - Biplots (RDA) tra le specie dominanti (>5%) e le variabili ambientali significative ($P < 0.05$) lungo i due principali assi di variazione. I numeri rappresentano le OTUs, T la temperatura in °C, Z_m la profondità di mescolamento.



Discussione

La diversità della comunità di picocianobatteri del Lago Maggiore durante il 2006 è stata studiata utilizzando tecniche di FTs (DGGE, T-RFLP e ARISA) su vari tratti genici 16S rDNA e ITS-1. Alcune di queste tecniche (T-RFLP e ARISA) ci hanno permesso di valutare per la prima volta nel Lago Maggiore la composizione e le variazioni della dinamica spazio-temporale.

La comunità di picocianobatteri del Lago Maggiore è costituita da cellule ricche in ficoeritrina (PE) come evidenziato da studi pregressi effettuati nella zona pelagica del lago. Tali studi sulla distribuzione verticale dei picocianobatteri in base alla qualità della radiazione subacquea hanno mostrato la scarsa presenza di cellule ricche in ficocianina (PC; Callieri and Pinolini, 1995). La qualità della radiazione luminosa influisce sulla presenza di una o dell'altra tipologia sia in esperimenti di laboratorio (Stomp *et al.*, 2004) che in ambiente naturale (Vörös *et al.*, 1998; Stomp *et al.*, 2007).

Nel Lago Maggiore la dinamica stagionale dell'abbondanza dei picocianobatteri, nell'anno 2006, ha mostrato un solo picco a 3 m nel periodo tardo-estivo autunnale che non rispecchia il tipico andamento bi-modale riscontrato in anni precedenti (Stockner *et al.*, 2000). Come ipotizzato in studi pregressi nel Lago di Costanza (Gaedke and Weisse, 1998) e nel Lago Stechlin in Germania (Padisak *et al.*, 1997), una delle probabili cause della variazione interannuale della dinamica picocianobatterica è l'influenza, proprio nel periodo primaverile, del periodo di mescolamento e del successivo inizio della stratificazione termica (Weisse, 1993).

In questa campagna di studio non si è rilevato alcun picco di abbondanza di picocianobatteri a 20 m. Una delle possibili ipotesi della mancanza di questo picco durante il 2006 è una generalizzata minore trasparenza delle acque che ha determinato un assottigliamento della zona eufotica. Per molti campionamenti infatti la profondità dei 20 m riceveva sicuramente meno dell'1% del PAR superficiale. La presenza, oltre il limite della zona eufotica, di radiazione PAR anche se in basse percentuali (<1% del PAR in superficie) permette la crescita di

cellule acclimatate a basse intensità luminose. Nel Lago Maggiore, come in altri grandi laghi profondi, si sono osservati DCM (Deep Chlorophyll Maxima) composti anche da picocianobatteri oltre che da alghe associate a bassi regimi luminosi (Gervais *et al.*, 1997; Modenutti and Balseiro, 2002; Camacho *et al.*, 2003; Callieri *et al.*, 2007a).

In corrispondenza di basse concentrazioni di fosforo nel periodo tardo estivo si sono osservati massimi di abbondanza di picocianobatteri. È noto infatti che il *Synechococcus* spp. (il genere di picocianobatteri più comune nei laghi) ha un'alta affinità per l'ortofosfato (Moutin *et al.*, 2002) e che il tasso specifico di utilizzo del fosforo è superiore rispetto a quello delle altre alghe e batteri in situazione di aggiunte controllate di fosforo (Vadstein, 2000). Vi sono molte prove pertanto, sia in ambiente naturale che in laboratorio, dell'alta capacità dei picocianobatteri di sopravvivere in condizioni limitanti. Un'altra spiegazione alternativa è data dall'abilità di queste cellule di utilizzare anche il fosforo organico. Diverse alghe in condizioni limitanti di fosforo inorganico idrolizzano fosforo organico ambientale utilizzando fosfatasi extracellulari trasportando così l'ortofosfato nelle loro cellule (Jansson, 1988).

Dinamica stagionale delle OTUs

Nel capitolo precedente, la risoluzione delle tecniche, in base al numero delle unità tassonomiche rilevate, era considerata più sensibile per le analisi sull'ITS-1 rispetto a quelle sul 16S rDNA. La dinamica delle OTU di picocianobatteri più abbondanti nel Lago Maggiore mostra come l'analisi sull'ITS-1 (con ARISA) debba considerarsi probabilmente anche più risolutiva tassonomicamente rispetto all'analisi eseguita sul 16S rDNA (con T-RFLP). Se si osserva infatti la composizione delle unità tassonomiche della comunità, le OTU dominanti stimate dall'analisi sull'ITS-1 si succedono e cambiano durante il corso dell'anno, al contrario di ciò che si verifica dall'analisi del 16S rDNA dove compaiono soltanto due OTU dominanti per tutto il periodo di studio. A questi risultati sono giunti anche alcuni autori che hanno affrontato lo studio delle

comunità batteriche eterotrofe (Hewson and Fuhrman, 2004; Danovaro *et al.*, 2006). Questi ultimi hanno interpretato la diversa risoluzione tassonomica raggiungibile con le due tecniche (ARISA e T-RFLP) concludendo che con l'analisi del 16S rDNA (con T-RFLP) si arriva a definire il genere mentre con analisi dell'ITS-1 (con ARISA) si può definire persino la specie. Anche se effettivamente non si riesce a dimostrare la maggiore sensibilità tassonomica dell'analisi ITS-1 sui nostri campioni è indubbia la maggiore diversità trovata con ARISA rispetto a T-RFLP.

Confrontando i dati ARISA con i dati chimico-fisici a disposizione, uno dei fattori che determina una differente composizione dei campioni a 3 m e 20 m, è la struttura termica della colonna d'acqua intesa sia come temperatura che come profondità della zona di mescolamento (Z_m) come si risulta dalla significatività di queste due variabili nella RDA. In altri ambienti d'acqua dolce e marini (Camacho *et al.*, 2003; Fuller *et al.*, 2005) il gradiente di temperatura e la stabilità della colonna d'acqua influenzano la dinamica della comunità picocianobatterica.

Nel Lago Maggiore la comunità picocianobatterica ha una diversa composizione nel periodo primaverile ed estivo. Le differenze a livello genotipico si ripercuotono anche a livello fenotipico con cambiamenti della morfometria delle cellule ad inizio estate, quando vi è una predominanza di cellule allungate (valori massimi di asse maggiore delle cellule). Questo risultato se fino ad alcuni anni fa poteva sembrare ovvio, attualmente ha maggiore importanza perché spesso cambiamenti morfometrici non sempre sono l'espressione di cambiamenti genotipici. Sarebbe molto interessante approfondire la discussione di questo argomento, ma i dati disponibili ad ora sono sufficienti soltanto per formulare nuove ipotesi di lavoro. Per esempio, una conseguenza diretta e strettamente relazionata ai cambiamenti morfometrici verificatisi nelle cellule di picocianobatteri è la variazione del rapporto superficie-volume (S/V). Questo rapporto ha molta importanza a livello di cellula fitoplanctonica, infatti, le cellule con alti rapporti S/V (cellule

coccoidi) hanno dei vantaggi competitivi molto importanti rispetto a cellule con bassi rapporti S/V (cellule allungate) nella velocità di assunzione dei nutrienti. D'altro canto anche l'aumento di cellule allungate, in alcuni periodi dell'anno, può essere considerato una strategia vincente contro la predazione da parte di piccoli flagellati mixotrofi o eterotrofi (Pernthaler, 2005).

È probabile che a determinare la distribuzione verticale dei ceppi picocianobatterici nel periodo estivo del 2006 nel Lago Maggiore sia una combinazione di fattori.

Il cambiamento della struttura della comunità lungo la colonna d'acqua è evidente all'inizio di giugno (cluster B-Curtis, ARISA) in corrispondenza dell'instaurarsi del termoclinio. Il 21 giugno, quando viene misurato un rapporto $Z_m/Z_{euf} = 0.22$ e quindi il limite inferiore della zona eufotica è isolato dagli strati più superficiali, si osserva il massimo di diversità delle OTU con ARISA. Il rapporto Z_m/Z_{euf} è un parametro che indica la proporzione tra zona buia e illuminata nella zona di mescolamento e quindi può essere messo in relazione alla risposta luce-adattativa delle alghe (Reynolds, 1984). Un valore molto basso di tale rapporto indica che il popolamento algale si è trovato in una zona mescolata ben illuminata mentre un valore alto indica la possibilità delle alghe di trovarsi in volumi d'acqua con luce limitante: tutto ciò potrebbe stimolare adattamenti e quindi aumenti di diversità. La formazione di uno strato metalimnetico costituisce una barriera invalicabile per i picocianobatteri che non hanno possibilità di compiere migrazioni verticali. È perciò ipotizzabile la formazione di due popolamenti adattati a diverse condizioni di luce e di nutrienti e diversi anche geneticamente. I nostri risultati hanno mostrato una diversità delle OTUs, rivelate da ARISA, maggiore a 20 m rispetto a 3 m. Ciò fa supporre che, in condizioni di luce che possono considerarsi limitanti per alcuni organismi fototrofi, i picocianobatteri mostrino un'alta capacità di adattamento. Si potrebbe però anche pensare che in tali condizioni di luce limitante sia stimolata la coesistenza di diverse specie all'interno di uno stesso genere (*Synechococcus*).

Un altro parametro ambientale importante per la dinamica della comunità dei picocianobatteri è risultato essere il pH. Il cambiamento del valore del pH tuttavia potrebbe avere un effetto indiretto sui picocianobatteri influenzando altri parametri ambientali. Tipicamente nei laghi temperati si assiste, nella zona superficiale, ad un aumento estivo del pH concomitante con l'incremento di produzione fitoplanctonica che porta ad una forte diminuzione della CO₂ libera. Questo potrebbe indurre una modifica della struttura della comunità picoplanctonica.

I risultati finora ottenuti nei laghi (Postius and Ernst, 1999; Callieri *et al.*, 2007b) non hanno evidenziato differenze nella composizione delle OTU di picocianobatteri a diverse profondità. Questo lavoro di tesi invece ha evidenziato come l'uso di nuove tecniche molecolari (ARISA) possa far emergere differenze prima non riscontrate.

L'analisi degli indici di diversità nella dinamica spazio-temporale dei picocianobatteri non ci ha permesso di osservare un trend di aumento o diminuzione della diversità imputabile all'evoluzione stagionale. Spesso i cambiamenti nella struttura di una comunità microbica non giungono ad alterarne la diversità poiché la perdita di alcuni gruppi tassonomici potrebbe essere compensata dall'introduzione di altri (Ernest and Brown, 2001). È stato suggerito che, per esempio, la ricchezza piuttosto che la composizione in specie, potrebbe mostrare meno variabilità nella risposta alle variazioni dei fattori ambientali (Hartmann and Widmer, 2006). Ad esempio il valore di ricchezza e l'indice di Shannon più basso (in ARISA) è stato trovato in corrispondenza del picco di abbondanza del 5 settembre a 3 m. In tale data si è anche trovata una OTU (1073) dominante per circa il 75% sul totale. È abbastanza comune trovare in condizioni di stress da nutrienti una specie che si sviluppa e che riesce a vincere la competizione con le altre unità tassonomiche (Callieri *et al.*, submitted).

Accanto all'importanza della struttura termica e delle caratteristiche di regime luminoso qui descritta ci possono essere anche molti fattori biotici che possono

in qualche modo alterare l'abbondanza, la diversità e la composizione della comunità picocianobatterica.

La pressione predatoria per esempio su questa componente è abbastanza importante e prevalentemente a carico di nanoflagellati eterotrofi (HNF) e ciliati e può generare importanti cambiamenti nella dinamica della comunità (Callieri *et al.*, 2002). È noto che oltre a modificare l'abbondanza dei microrganismi, la predazione, in generale, modifica anche la composizione di una comunità microbica favorendone a volte una maggiore diversificazione in termini di unità tassonomiche (Jürgens and Matz, 2002; Pernthaler, 2005).

Conclusioni e prospettive future

L'analisi delle variazioni della comunità picocianobatterica ha dimostrato che un monitoraggio almeno a frequenza quindicinale durante l'intero ciclo stagionale è utile per comprendere la struttura e le dinamiche dei ceppi dominanti.

Il livello di risoluzione di ARISA per la descrizione della comunità picocianobatterica è risultato più completo di quello della T-RFLP, sia in termini di dinamica spazio-temporale che probabilmente anche tassonomica, come è stato dimostrato per altre comunità batteriche (Hewson and Fuhrman, 2004; Danovaro *et al.*, 2006). L'analisi degli indici di diversità spiega molto poco l'effettiva struttura della comunità picocianobatterica. È necessario reinterpretare i valori di questi indici, come suggerito in alcuni lavori recenti sulle comunità microbiche (Blackwood *et al.*, 2007), alla luce della differente composizione piuttosto che della diversità della comunità stessa.

L'analisi multivariata (RDA) ha mostrato che, tra tutte le variabili ambientali considerate, la temperatura è quella che maggiormente influenza la varianza dei ceppi di picocianobatteri lungo tutto il gradiente stagionale.

La successione di ceppi è molto chiara quando si passa dalla stagione primaverile a quella estiva. Inoltre è possibile distinguere una differente comunità picocianobatterica a 3 m e 20 m durante la stagione estiva.

Una delle prospettive future di questo lavoro è il clonaggio dei prodotti di PCR (per ARISA, ma anche T-RFLP) per costruire alberi filogenetici includendo i ribotipi trovati nella comunità picocianobatterica del Lago Maggiore.

Altre ricerche interessanti per capire l'ecologia del picoplancton potrebbero riguardare lo studio della relazione tra la formazione delle microcolonie o l'instaurarsi di cambiamenti morfologici cellulari sulla diversità della comunità.

Vi è poi da verificare l'eventuale impatto della predazione sulla morfologia (Jezberova and Komarkova, 2007) e sulla diversità dei genotipi presenti nell'ambiente naturale.

Bibliografia

- A.P.H.A., A.W.W.A. and W.P.C.F. 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: American Public Health Association.
- Ambrosetti, W., L. Barbanti and A. Rolla. 1979. Mescolamento parziale o totale nel Lago Maggiore nell'ultimo trentennio. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 37: 197-208.
- Ambrosetti, W., L. Barbanti and R. Mosello. 1982. Unusual deep mixing of Lago Maggiore during winter 1980-1981. *Geografia Fisica e Dinamica Quaternaria*, 5: 197-208.
- Ambrosetti, V., L. Barbanti, E.A. Carrara and A. Rolla. 2007. Indagini sull'ambiente pelagico. Limnologia fisica. In: CNR-ISE Sede di Verbania. *Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2003-2007. Campagna 2006*. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 37-45.
- Becker, S., P. Richl and A. Ernst. 2007. Seasonal and habitat-related distribution pattern of *Synechococcus* genotypes in Lake Constance. *Fems Microbiology Ecology*, 62: 64-77.
- Becker, S., A.K. Singh, C. Postius, P. Boger and A. Ernst. 2004. Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance. *Fems Microbiology Ecology*, 49: 181-190.
- Bini, A., M.B. Cita and M. Gaetani. 1978. Southern alpine lakes. Hypothesis of an erosional origin related to the Messinian entrenchment. *Marine Geology*, 27: 271-288.
- Blackwood, C.B., D. Hudleston, D.R. Zak and J.S. Buyer. 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: Insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5276-5283.
- Calderoni, A., R. Mosello and R. de Bernardi. 1997. Evoluzione recente della qualità delle acque dei laghi profondi sudalpini. *Documenta Istituto Italiano di Idrobiologia*, 61: 33-53.
- Calderoni, A., A. Pranzo and G. Tartari. 2004. Chimica lacustre. In: C.N.R.- I.S.E. *Sezione di Idrobiologia ed Ecologia delle Acque Interne. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 1998-2002. Campagna 2002*. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 80-88.
- Callieri, C. and M.L. Pinolini. 1995. Picoplankton in Lake Maggiore, Italy. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, 80: 491-501.
- Callieri, C. and R. Piscia. 2002. Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47: 941-956.
- Callieri, C. and J.G. Stockner. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology*, 61: 1-14.
- Callieri, C., S.M. Karjalainen and S. Passoni. 2002. Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *Journal of Plankton Research*, 24: 785-796.
- Callieri, C., E. Caravati, G. Morabito and A. Oggioni. 2006. The unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus* and mixotrophic flagellates: evidence for a functional association in an oligotrophic, subalpine lake. *Freshwater Biology*, 51: 263-273.
- Callieri, C., B. Modenutti, C. Queimalinos, R. Bertoni and E. Balseiro. 2007a. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean

- ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41: 511-523.
- Callieri, C., C. Corno, E. Caravati, S. Galafassi, M. Bottinelli and R. Bertoni. 2007b. Photosynthetic characteristics and diversity of freshwater *Synechococcus* at two depths during different mixing conditions in a deep oligotrophic lake. *Journal of Limnology*, 66(2): 78-81.
- Callieri, C., E. Caravati, B. Modenutti, C. Corno, E. Balseiro and R. Bertoni (submitted). Diversity and photosynthetic traits of picocyanobacteria assemblages in ultra-oligotrophic Andean lakes. *Environmental Microbiology*.
- Camacho, A., M.R. Miracle and E. Vicente. 2003. Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 157: 321-338.
- Crosbie, N.D., K. Teubner and T. Weisse. 2003. Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 33: 53-66.
- Danovaro, R., G.M. Luna, A. Dell'Anno and B. Pietrangeli. 2006. Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5982-5989.
- Davis, P.G. and J.M. Sieburth. 1982. Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton population in marine waters in epifluorescence microscopy. *Annales de l'Institut Océanographique*, 58: 249-260.
- Davis, P.A., M. Dent, J. Parker, C.S. Reynolds and A.E. Walsby. 2003. The annual cycle of growth rate and biomass change in *Planktothrix* spp. in Blelham Tarn, English Lake District. *Freshwater Biology*, 48: 852-867.
- de Bernardi, R., G. Giussani, M. Manca and D. Ruggiu. 1988. Long-term dynamics of plankton communities in Lago Maggiore (N. Italy). *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 23: 729-733.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2943-2950.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 190-197.
- Eiler, A. and S. Bertilsson. 2007. Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: Linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3511-3518.
- Ernest, S.K.M. and J.H. Brown. 2001. Homeostasis and compensation: The role of species and resources in ecosystem stability. *Ecology*, 82: 2118-2132.
- Ernst, A., S. Becker, K. Hennes and C. Postius. 1999. Is there a succession in the autotrophic picoplankton of temperate zone lakes? In: C.R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Green (Eds), *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Halifax, Canada, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- Fuller, N.J., N.J. West, D. Marie, M. Yallop, T. Rivlin, A.F. Post and D.J. Scanlan. 2005. Dynamics of community structure and phosphate status of picocyanobacterial populations in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Limnology and Oceanography*, 50: 363-375.

- Gaedke, U. and T. Weisse. 1998. Seasonal and interannual variability of picocyanobacteria in Lake Costance. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 53: 143-158.
- Gervais, F., J. Padisak and R. Koschel. 1997. Do light quality and low nutrient concentration favour picocyanobacteria below the thermocline of the oligotrophic Lake Stechlin? *Journal of Plankton Research*, 19: 771-781.
- Hartmann, M. and F. Widmer. 2006. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7804-7812.
- Hayat, M.A. 1981. *Fixation for electron microscopy*. New York, Academic Press.
- Hewson, I. and J.A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3425-3433.
- Hocking, G.C. and M. Straskraba. 1999. The effect of light extinction on thermal stratification in reservoirs and lakes. *International Review of Hydrobiology*, 84: 535-556.
- Hughes, J.B. and B.J.M. Bohannan. 2004. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology. In: G.A. Kowalchuk, F.J. de Bruijn, I.M. Head, A.D. Akkermans and J.D. van Elsas. (Eds), *Molecular Microbial Ecology Manual (2nd Edition)*. Kluwer Academic Publishers: 1321-1344.
- Hutchinson, G.E. 1967. *A Treatise on Limnology. II. Introduction to lake biology and the limnoplankton*. New York.
- Jansson, M. 1988. Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae *Hydrobiologia*, 170: 177-189.
- Jaspers, E. and J. Overmann 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4831-4839.
- Jezberova, J. and J. Komarkova. 2007. Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology*, 9: 1858-1862.
- Johnson, P.W. and J.M. Sieburth. 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography*, 24: 928-935.
- Jürgens, K. and C. Matz. 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81: 413-434.
- Kruk, C., N. Mazzeo, G. Lacerot and C.S. Reynolds. 2002. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research*, 24: 901-912.
- Kuuppo-Leinikki, P. and H. Kuosa. 1989. Preservation of picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic nanoflagellates for epifluorescence microscopy. *Archives of Microbiology*, 114: 631-636.
- Luna, G.M., A. Dell'Anno and R. Danovaro. 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8: 308-320.
- Luna, G.M., A. Dell'Anno, L. Giuliano and R. Danovaro. 2004. Bacterial diversity in deep Mediterranean sediments: relationship with the active bacterial fraction and substrate availability. *Environmental Microbiology*, 6: 745-753.
- Lund, J.W.G., C. Kipling and E.D. Le Cren. 1958. The inverted microscope method for estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11: 143-170.

- MacIsaac, E.A. and J.G. Stockner. 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In: P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole. (Eds), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis: 187-197.
- Manca, M., A. Calderoni and R. Mosello 1992. Limnology in Italy. Limnological research in Lago Maggiore: studies on hydrochemistry and plankton. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 50: 171-200.
- Modenutti, B.E. and E.G. Balseiro. 2002. Mixotrophic ciliates in an Andean lake: dependence on light and prey of an *Ophrydium naumanni* population. *Freshwater Biology*, 47: 121-128.
- Morabito, G. and A. Pugnetti. 2000. Primary productivity and related variables in the course of the trophic evolution of Lake Maggiore. *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 27: 2934-2937.
- Moutin, T., T.F. Thingstad, F. Van Wambeke, D. Marie, G. Slawyk, P. Raimbault and H. Claustre. 2002. Does competition for nanomolar phosphate supply explain the predominance of the cyanobacterium *Synechococcus*? *Limnology and Oceanography*, 47: 1562-1567.
- Padisak, J., L. Krienitz, R. Koschel and J. Nedoma. 1997. Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*, 32: 403-416.
- Passoni, S. and C. Callieri. 2001. Picocyanobacteria single forms, aggregates and microcolonies: survival strategy or species succession? *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 27: 1879-1883.
- Passoni, S., C. Callieri and S. Heinimaa. 1997. Dinamiche di distribuzione del picoplankton autotrofo nel Lago Maggiore. In: *Proceedings 12° AIOL Congress*. Piccazzo, M. (Ed.): 109-118.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 537-546.
- Pernthaler, J., K. Simek, B. Sattler, A. Schwarzenbacher, J. Bobkova and R. Psenner. 1996. Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 18: 443-462.
- Postius, C. and A. Ernst. 1999. Mechanisms of dominance: coexistence of picocyanobacterial genotypes in a freshwater ecosystem. *Archives of Microbiology*, 172: 69-75.
- Reynolds, C.S. 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Ruggiu, D. 1989. An evaluation of phytoplankton communities of Lago Maggiore typifying the stages of its trophic evolution. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 46: 145-172.
- Ruggiu, D., G. Morabito, P. Panzani and A. Pugnetti. 1998. Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy). *Hydrobiologia*, 370: 243-257.
- Sas, H. 1989. *Lake restoration by reduction of nutrient loading: expectations, experiences, extrapolations*. Academia Verlag Richarz.
- Simek, K., J. Bobkova, M. Macek, J. Nedoma and R. Psenner. 1995. Ciliate Grazing on Picoplankton in a Eutrophic Reservoir During the Summer Phytoplankton Maximum - a Study at the Species and Community-Level. *Limnology and Oceanography*, 40: 1077-1090.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco. 573 pp.

- Stockner, J.G., C. Callieri and G. Cronberg. 2000. Picoplankton and Other Non Bloom-Forming Cyanobacteria in Lakes. In: B.A. Whitton and M. Potts. (Eds), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers: 195-231.
- Stomp, M., J. Huisman, F. de Jongh, A.J. Veraart, D. Gerla, M. Rijkeboer *et al.* 2004. Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432: 104-107.
- Stomp, M., J. Huisman, L. Vörös, F.R. Pick, M. Laamanen, T. Haverkamp and L.J. Stal. 2007. Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters*, 10: 290-298.
- Straškrabová, V., C. Callieri, P. Carrillo, L. Cruz-Pizarro, J.P. Fott, P. Hartman *et al.* 1999. Investigations on pelagic food webs in mountain lakes - aims and methods. *Journal of Limnology*, 58: 77-87.
- ter Braak, C.J.F. and I.C. Prentice. 1988. A theory of gradient analysis. *Advances in Ecological Research*, 18: 271-317.
- ter Braak, C.J.F. and P. Smilauer. 1998. CANOCO for Windows: Software for canonical Community Ordination. In: Ithaca: Microcomputer Power.
- Tonolli, V. 1964. *Introduzione allo studio della limnologia*. Istituto Italiano Idrobiologia, Verbania Pallanza (Ed.): 385 pp.
- Vadstein, O. 2000. Heterotrophic, planktonic bacteria and cycling of phosphorus - Phosphorus requirements, competitive ability, and food web interactions. In *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 16: 115-167.
- Vörös, L., C. Callieri, K.V. Balogh and R. Bertoni. 1998. Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia*, 370: 117-125.
- Waterbury, J.B., S.W. Watson, R.R.L. Guillard and L.E.E. Brand. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic cyanobacterium. *Nature*, 227: 293-294.
- Weisse, T. 1988. Dynamics of autotrophic picoplankton in Lake Constance. *Journal of Plankton Research*, 10: 1179-1188.
- Weisse, T. 1993. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In J.G. Jones, (Ed.), *Advances in microbial ecology*. Plenum Press: 327-370.
- Yannarell, A.C., A.D. Kent, G.H. Lauster, T.K. Kratz and E.W. Triplett. 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*, 46: 391-405.

Capitolo III: Diversità e caratteristiche fotosintetiche di comunità picocianobatteriche di laghi andini ultraoligotrofi

Introduzione

I picocianobatteri hanno un ruolo importante nei processi fototrofi che avvengono negli oceani e nei laghi oligotrofi (Bell and Kalff, 2001; Callieri and Stockner, 2002). Nei laghi ultraoligotrofi i picocianobatteri costituiscono la componente dominante del picoplanton autotrofo (Stockner *et al.*, 2000; Callieri *et al.*, 2007) composta principalmente dal genere *Synechococcus*.

La quantità di radiazione subacquea così come la sua qualità sono state considerate tra i fattori della differenziazione di nicchia nelle comunità fitoplanctoniche (Huisman *et al.*, 2004). La presenza di particolari pigmenti fotosintetici (le ficobiliproteine) nei picocianobatteri, così come negli altri organismi fototrofi, fa sì che la radiazione luminosa abbia un ruolo importante nei modelli competitivi (Litchman, 2003; Stomp *et al.*, 2004). Nelle zone più oligotrofiche degli oceani sono stati trovati picocianobatteri adattati ad alte e basse intensità luminose, presenti quindi a differenti profondità nella colonna d'acqua (Rocap *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006). Si è anche individuata una diversa distribuzione dei cluster di *Prochlorococcus* e *Synechococcus* sia verticalmente nella colonna d'acqua che orizzontalmente in diversi punti di campionamento, prodotta da differenti condizioni ambientali (Fuller *et al.*, 2006).

In laghi profondi, trasparenti ed ultraoligotrofi dove lo strato della zona eufotica si estende per oltre 50 m le diverse condizioni di irradiazione lungo la verticale potrebbero selezionare ceppi con differenti capacità di adattamento ad alte e basse irradianza luminose (Postius and Ernst, 1999).

Negli ambienti di acqua dolce la diversità del genere *Synechococcus* non è stata ancora estesamente studiata e non esistono dati sulle caratteristiche fotosintetiche come possibili adattamenti fisiologici di specifici ceppi di *Synechococcus* in differenti laghi e a differenti profondità.

Iniziando una ricerca sulla composizione delle comunità picocianobatteriche nei laghi in relazione alle caratteristiche fotosintetiche ci si scontra principalmente con due problemi. Il primo è legato alla difficoltà di distinguere in natura le caratteristiche fotosintetiche della sola componente procariotica, appunto i picocianobatteri, da quella seppur meno abbondante ed importante eucariotica. Il secondo problema, invece, è legato al fatto che le sequenze del 16Ss rDNA mostrano un'alta similarità all'interno del picocianobatteri d'acqua dolce (Crosbie *et al.*, 2003) e non rispecchiano pertanto la variazione genetica che spesso accompagna la loro diversità fisiologica (Rocap *et al.*, 2002).

Questi problemi sono stati affrontati da un lato lavorando su ambienti ultraoligotrofi dove il 95% del picofitoplancton è composto da picocianobatteri e dall'altro scegliendo come metodologia di analisi l'ARISA (Fisher and Triplett, 1999) che si basa sullo studio della regione meno conservativa ITS-1 (spazio intergenico tra il 16S rDNA e il 23Ss rDNA). L'analisi della porzione ITS-1 in molti gruppi batterici ha una variabilità, sia in lunghezza che in sequenza nucleotidica, tale per cui molto spesso è in grado di distinguere due o più ceppi strettamente relazionati (Rocap *et al.*, 2002). In questo capitolo i profili ARISA sono stati adottati come indicazioni della composizione delle comunità picocianobatterica in un distretto di laghi andini nord patagonici ed il numero di frammenti ricavati da queste analisi sono stati considerati come *proxy* per la ricchezza in specie. Questo approccio semi-quantitativo è stato già usato con successo in altri studi di comunità microbiche ed ha consentito la descrizione della composizione in OTU delle comunità presenti in diversi ambienti acquatici (Moeseneder *et al.*, 2001; Troussellier *et al.*, 2002; Hewson *et al.*, 2007).

Area di studio

Questo studio è stato eseguito su sei laghi andini localizzati tra 41°S e 71°O (760 m s.l.m.) ubicati all'interno del Parco Nazionale Nahuel Huapi in Patagonia (Argentina, Fig. III.1). I laghi selezionati (Nahuel Huapi, Moreno, Correntoso, Mascardi, Espejo e Gutierrez) sono molto grandi (area > 5 km²), profondi

(profondità massima $Z_{\max} > 90$ m) e molto trasparenti con una estensione della zona eufotica che raggiunge i 30-50 m di profondità (Perez *et al.*, 2002; Callieri *et al.*, 2007). Il corpo d'acqua più grande è il Lago Nahuel Huapi, dal quale si sono formati, per successive separazioni di bracci periferici, gli altri laghi che si trovano ad esso vicini e che si possono considerare satelliti (Tatur *et al.*, 2002).

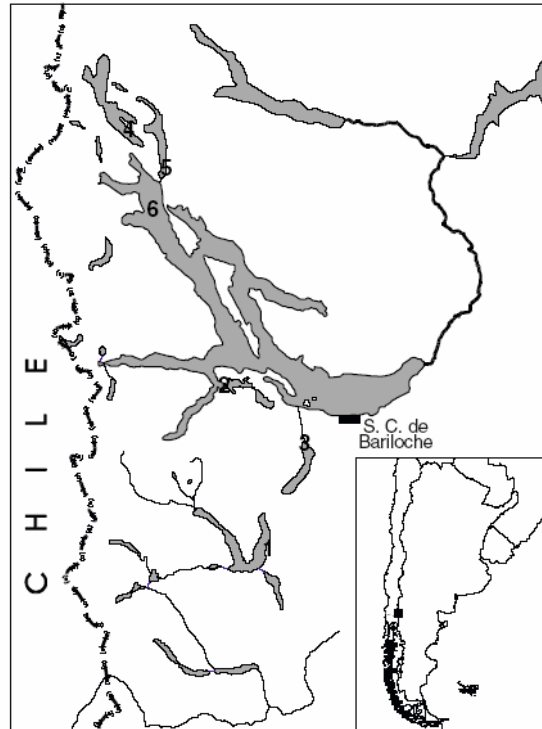


Fig. III.1 - Geografia dell'area di studio: 1 Lago Mascardi, 2 Lago Moreno, 3 Lago Gutierrez, 4 Lago Espejo, 5 Lago Correntoso, 6 Lago Nahuel Huapi. Da: Callieri *et al.*, 2007.

Il Lago Nahuel Huapi è caratterizzato, durante la stagione estiva, da uno strato epilimnetico mescolato che si estende oltre la zona eufotica (Callieri *et al.*, 2007). Il canale che collega il Lago Moreno ed il Lago Nahuel Huapi è corto e grande così che per alcuni versi può essere considerato un ramo del più grande Nahuel Huapi. Escludendo il Lago Mascardi tutte le acque degli altri laghi scaricano nel Lago Nahuel Huapi. Il Lago Espejo si trova in posizione più isolata rispetto agli altri e comunica, nel braccio più a nord, con il Lago Correntoso passando attraverso un bacino più piccolo (Lago Espejo Chico).

I laghi studiati si possono considerare monomittici caldi perchè stratificano durante il periodo tarda primavera - estate (Quirós and Drago, 1985) e posseggono un termoclinio che si forma nella zona eufotica durante gli anni nei quali vi è un vento con bassa velocità (Modenutti *et al.*, 2000).

I laghi sono tutti ultraoligotrofi, presentano concentrazioni totali di fosforo che eccedono mai i 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Modenutti *et al.*, 2000) e concentrazioni di carbonio disciolto basse ($<0.5 \text{ mg l}^{-1}$) e quindi presentano tutti alta trasparenza (Morris *et al.*, 1995).

Metodologia di studio

I sei laghi sono stati campionati durante l'estate australe (Gennaio, 2005). I profili verticali della luce sono stati misurati con un radiometro subacqueo PUV500B (Biospherical Instruments). I campioni per la determinazione della produzione primaria frazionata e della clorofilla *a* sono stati prelevati alle profondità corrispondenti al 100, 50, 25, 10 e 1% della PAR misurata in superficie. I punti di campionamento sono localizzati nella parte più profonda di ciascun bacino. Tutti i campioni sono stati prelevati, in doppio a mezzodì. I campioni per il conteggio e per le analisi molecolari sono stati prelevati a 25% e 1% della PAR superficiale nelle stesse stazioni di campionamento.

Conteggio dei campioni

I campioni per il conteggio sono stati fissati e conservati a 5°C fino all'effettivo conteggio seguendo la stessa procedura descritta nel capitolo precedente. Per il conteggio dei campioni è stato utilizzato un microscopio ad epifluorescenza Axioplan (ZEISS) dotato di lampada HBO 100 W, di un obiettivo Neofluar 100x, oculari 10x e di un set di filtri per l'eccitazione nel blu (Zeiss 487909, BP 450-490, FT 510, LP520).

Determinazione della clorofilla a

La determinazione delle clorofilla *a* dei picocianobatteri è stata eseguita filtrando quantità di acqua >250 ml su un filtro in policarbonato (Osmonics) con diametro nominale dei pori di 2.0 µm seguita da successiva filtrazione su un filtro in policarbonato dal diametro dei pori di 0.2 µm (Osmonics). La procedura di estrazione della clorofilla *a* dal filtro è stata effettuata utilizzando l'etanolo a caldo (Nusch, 1980) e misurata con un fluorimetro 10-AU (Turner Design).

Misura della produzione primaria e delle caratteristiche fotosintetiche

La tecnica utilizzata per stimare la produzione primaria è quella classica del ^{14}C proposta da Steemann Nielsen (1951) e successive modifiche. La procedura di misurazione si basa sull'incorporazione di questo isotopo radioattivo nella sostanza organica prodotta dal fitoplancton durante il processo fotosintetico. Conoscendo infatti, il contenuto di carbonio inorganico totale nel campione d'acqua e la quantità aggiunta di carbonio inorganico marcato, sotto forma di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, è possibile, dalla determinazione del carbonio organico radioattivo contenuto nelle alghe, dopo un periodo di incubazione, calcolare la quantità di carbonio assimilato utilizzando la seguente relazione:

$$^{14}\text{C} \text{ aggiunto} / ^{14}\text{C} \text{ assimilato} = ^{12}\text{C} \text{ disponibile} / ^{12}\text{C} \text{ assimilato}$$

La serie delle bottiglie scure è stata sostituita dalla misura al *time 0* del residuo organico, misurato aggiungendo l'isotopo ad una sola bottiglia scura e immediatamente filtrando e analizzando. Questa modifica, già utilizzata da Fahnenstiel e collaboratori (1994) consente di ottenere un bianco più basso misurando l'incorporazione al tempo zero cioè dovuta agli errori associati a questa tecnica.

L'acqua prelevata dal lago veniva subito trasferita in 4 vials da 25 ml ciascuna e ad ogni vials sono stati aggiunti 1.48kBq di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3 \text{ ml}^{-1}$ (Amersham). L'incubazione *in situ* per 4 ore è stata effettuata intorno a mezzodì. I campioni

da incubare sono stati sospesi alle profondità di campionamento corrispondenti al 100, 50, 25, 10 e 1% della PAR superficiale. In laboratorio da ciascuna bottiglia si prelevavano 500 µl di campione che, posti in una fiala da scintillazione e dopo aggiunta del cocktail di scintillazione (Beckman Ready Gel), venivano subito letti allo scintillatore (Beckman LS 6000) per conoscere la quantità di radioattività totale aggiunta. Questa operazione veniva eseguita perché, nonostante ad ogni campione fosse stata inoculata una quantità nota di radioattività, i possibili errori nell'aggiunta di ^{14}C e/o perdita avute luogo nella manipolazione dei campioni prima dell'incubazione potessero essere quantificati, e quindi riportati nelle elaborazioni successive. Per la determinazione dell'assimilazione del carbonio dei picocianobatteri veniva fatta una filtrazione differenziale post-incubazione (PIDF- *Post Incubation Differential Filtration*; Fahnenstiel *et al.*, 1994). Nella prima filtrazione veniva eseguita con siringhe sterili e apparato di filtrazione di 25mm di diametro. La prima filtrazione veniva effettuata con filtri in policarbonato (Osmonics) con pori di 2 µm di diametro e successivamente il filtrato veniva concentrato su un filtro in nitrato di cellulosa con pori di 0.22 µm di diametro (Millipore TM). I filtri dei campioni filtrati, erano posti sotto cappa per un'ora all'interno di specifiche vials di scintillazione con l'aggiunta di 200 µl di HCl 1N. L'aggiunta di acido permette l'evoluzione di eventuale carbonio inorganico radioattivo non utilizzato e trattenuto sul filtro. Il composto $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ è stabile solo a pH elevati (>9) mentre in ambiente acido libera $^{14}\text{CO}_2$.

In seguito venivano aggiunti 10 ml di cocktail di scintillazione (Beckman Ready Protein) per ogni vial e si procedeva alla lettura dei campioni allo scintillatore (Beckman LS3801). La funzione del cocktail di scintillazione è di convertire l'energia di decadimento delle particelle radioattive β in luce visibile che può essere rilevata dallo scintillatore. L'assimilazione del carbonio inorganico è stata calcolata basandosi sulla proporzione tra l'assunzione di ^{14}C e la disponibilità di carbonio totale inorganico (TIC, ricavato dalle misure di pH e alcalinità).

I tassi fotosintetici degli organismi autotrofi cambiano al variare della radiazione luminosa secondo una funzione non-lineare che graficamente si esprime nelle curve luce-fotosintesi (P/E). Molti modelli matematici sono stati proposti per la costruzione di queste curve tra i quali quello di Vollenweider (1965), di Platt e collaboratori (1980), di Eilers e Peeters (1988) e di Frenette e collaboratori (1993). L'interpretazione dei risultati delle curve P/E dipende dalla variabile (carbonio, numero di cellule, chl *a*) con la quale la fotosintesi è normalizzata (MacIntyre *et al.*, 2002); la forma di queste curve rispecchia i processi metabolici, biochimici e biofisici che regolano la fotosintesi (Falkowski, 1992; Falkowski and Raven, 1997).

La relazione tra fotosintesi (P) e luce (E) è stata ottenuta applicando il modello di Eilers e Peeters (1988). In questo lavoro si sono utilizzati i dati di produzione specifica e di luce alle diverse profondità dell'incubazione *in situ* e perciò la risposta P/E della comunità picocianobatterica naturale produce una relazione che è un insieme della performance fotosintetica delle popolazioni presenti alle diverse profondità e deve perciò essere interpretata con una certa cautela (Henley, 1993). Tuttavia le curve che si ottengono forniscono una misura realistica delle caratteristiche fotosintetiche della comunità picocianobatterica nei laghi (Callieri *et al.*, 2005).

Analisi molecolari

I campioni prelevati alle profondità corrispondenti al 25% e all'1% della PAR superficiale sono stati filtrati su Supor® (0.2 µm) e conservati fino all'estrazione del DNA a -80 ° C in tampone di lisi (Giovannoni *et al.*, 1990).

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit del suolo (MoBio) e l'effettiva estrazione è stata quantificata mediante QuBit (Invitrogen) e valutata visivamente mediante un gel di agarosio 1x.

La PCR per l'analisi del tratto ITS-1 è stata eseguita utilizzando una procedura semi-nested con i cicli di temperatura descritti nei capitoli precedenti, utilizzando come primer per la seconda PCR, il 16S CSIF (Janse *et al.*, 2003)

primer specifico per cianobatteri d'acqua dolce ed il primer 23S 125R (con la subunità 5' alla quale è attaccata una molecola fluorescente TET). Dopo l'amplificazione i campioni sono stati purificati utilizzando il kit di purificazione (Qiagen).

L'analisi di *fingerprinting* ARISA è stata eseguita utilizzando la procedura descritta nei capitoli precedenti. L'altezza dei picchi è stata standardizzata (Dunbar *et al.*, 2001), seguendo quanto descritto nel capitolo precedentemente per la comunità di picocianobatteri del Lago Maggiore. Tutti i picchi sotto le 350 paia di basi (bp) non sono stati considerati nell'analisi perché esterni alla regione target ITS-1. Il *threshold* applicato ai profili di ARISA è stato calcolato utilizzando l'approccio suggerito da Luna e collaboratori (2006) che ha prodotto un valore di 0.24 % della fluorescenza totale.

Analisi statistiche

Gli indici di similarità tra i campioni sono stati calcolati usando l'indice di Whittaker che viene calcolato su dati in percentuale di ogni singola unità tassonomica. La *cluster analysis* è stata eseguita usando il metodo UPGMA.

La correlazione tra la composizione in OTU percentuale ed i parametri fotosintetici è stata eseguita utilizzando una *forward stepwise regression* (SigmaStat 3.1) per evidenziare una possibile convergenza tra tassonomia (le OTU) e fisiologia (parametri fotosintetici).

Il modello Eilers e Peeters (1988) è stato applicato sia per la costruzione della curva luce-fotosintesi che per il calcolo dei parametri fotosintetici, usando l'equazione inserita nel software SigmaPlot.

I dati di produzione (P) e di intensità luminosa (I) utilizzati in questo modello sono quelli misurati rispettivamente dal calcolo della produzione primaria secondo il metodo del C¹⁴ e i dati di radiazione luminosa misurati sul campo.

Questo modello si basa per il calcolo dei parametri fotosintetici (α , I_m , I_k , P_{max}) sulla seguente relazione che lega la produzione (P) e l'intensità luminosa (I) attraverso i parametri a , b , c :

$$P = \frac{I}{aI^2 + bI + c}$$

$$\alpha = \frac{1}{c}; \quad I_m = \sqrt{\frac{a}{c}}$$

$$P_{\max} = \frac{1}{b + 2\sqrt{ac}} \quad ; \quad I_k = \frac{c}{b + 2\sqrt{ac}}$$

dove:

α = coefficiente massimo di utilizzazione della luce, per es. l'assimilazione per unità di clorofilla a e unità radiazione luminosa;

I_m = intensità di luce ottimale misurata al valore di $P_{\max}$;

$P_{\max}$ = massimo tasso fotosintetico misurato per unità di clorofilla;

I_k = parametro di saturazione della luce.

La ricchezza stimata con ARISA è rappresentata dal numero delle OTU. La *evenness* è stata calcolata utilizzando l'indice di *evenness* di Pielou:

$$E = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

dove H' è il numero derivato dall'indice di diversità di Shannon come segue:

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

e dove S è il numero della OTU, p_i è la relative importanza dell'*i*esima OTU e $H'_{\max}$ è il massimo valore di H' , ed è uguale a:

$$H'_{\max} = \ln S$$

Risultati

Caratteristiche dei laghi e abbondanza dei picocianobatteri

L'area in cui sono inseriti i laghi studiati ha un'estensione abbastanza ampia (600 km²) ed essi sono parzialmente interconnessi tra di loro. Tra i laghi satellite soltanto il Lago Mascardi non è connesso al Lago Nahuel Huapi e fa parte di un bacino idrografico differente che scarica le proprie acque nell'Oceano Pacifico. Durante il periodo di campionamento 5 laghi (Moreno, Gutierrez, Mascardi, Correntoso e Espejo) mostravano una stratificazione termica con una profondità del termoclinio che variava da 11 a 22 m. La zona eufotica, in questi 5 laghi, si estende più in profondità del termoclinio (Tab. III. 1): in questo modo anche la zona più superficiale dell'ipolimnio riceve PAR anche se in basse quantità. Nel Lago Nahuel Huapi, il termoclinio si estende ad una profondità maggiore della profondità corrispondente all'1% (Z_{1%}) in questo modo la colonna d'acqua campionata corrisponde interamente alla zona epilimnetica. Durante i campionamenti la PAR superficiale ha raggiunto valori tra 1277 e 1849 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Tab III. 1. Profondità (metri) e irradianza PAR ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e la corrispondente percentuale della PAR superficiale nei 6 laghi campionanti. Z_{term}: profondità del termoclinio (m).

% PAR	Nahuel Huapi		Moreno		Gutierrez		Mascardi		Espejo		Correntoso	
	Depth	PAR	Depth	PAR	Depth	PAR	Depth	PAR	Depth	PAR	Depth	PAR
100	0	1326	0	1735	0	1277	0	1849	0	1436	0	1539
50	6	753	5	860	5	677	4	955	5	823	6	814
25	12	428	10	426	10	358	8	493	10	472	11	479
10	25	126	17	159	17	147	15	155	20	155	22	149
1	50	12	35	13	35	15	30	13	40	17	45	13
Z _{term}	> 50		19.3		22		11.3		15		13.3	

L'abbondanza dei picocianobatteri è variata da $18.9 \pm 1.1 \times 10^3$ a $132.2 \pm 3.2 \times 10^3$ cell ml⁻¹. I valori più elevati sono stati trovati alle profondità dell'1% della PAR superficiale dimostrando così la presenza di un *Deep Chlorophyll Maximum* (DCM). Le abbondanze di picocianobatteri erano significativamente più elevate

all'1% rispetto a quelle trovate al 25% della PAR superficiale (paired t-test: n = 6, P = 0.006).

Caratteristiche fotosintetiche

La produzione specifica per unità di clorofilla *a* della comunità picofitoplanctonica dei 5 laghi (Moreno, Gutierrez, Mascardi, Correntoso, Espejo) è interamente ascrivibile ai picocianobatteri infatti il picofitoplancton è costituito da cellule procariotiche (*Synechococcus* spp; biovolume medio: 0.31 μm^3 per cellula; Callieri *et al.*, 2007). Nel Lago Nahuel Huapi, invece, esiste una frazione, seppur piccola (3-6% del totale), di eucarioti che tuttavia non influenza, se non in modo trascurabile, la stima della produzione dei picocianobatteri.

La relazione tra la fotosintesi (P) e l'irradianza (E) è stata estrapolata utilizzando il modello di Eilers e Peeters (1988). Le curve mostrano un pattern con evidente fotoinibizione della comunità picocianobatterica alle alte intensità luminose per tutti i laghi, anche se in modo variabile, tranne per il Lago Espejo dove la particolare composizione in OTU conferisce alla comunità picocianobatterica una notevole resistenza alla fotoinibizione (Fig. III.2).

Il massimo tasso fotosintetico per unità di clorofilla *a* (P_{max}) è significativamente più alto (t-test, P = 0.001) nei laghi Gutierrez, Mascardi e Correntoso (media: 2.82 mg C (mg chl *a*)⁻¹ h⁻¹) rispetto ai laghi Moreno, Nahuel Huapi e Espejo (media: 1.40 mg C (mg chl *a*)⁻¹ h⁻¹). Il Lago Espejo, l'ambiente nel quale non si osserva fotoinibizione, mostra valori intermedi di P_{max} (1.64 mg C (mg chl *a*)⁻¹ h⁻¹).

Diversità, composizione e ricchezza della comunità picocianobatterica

I dati di diversità (Shannon), ricchezza e evenness della comunità di picocianobatteri presente alle due profondità (25% e l'1% della PAR superficiale) non hanno mostrato differenze statisticamente significative (paired t-test: P > 0.05 per tutte e tre le variabili). Inoltre, anche la percentuale della

composizione delle OTU alle due profondità studiate indica una relativa omogeneità verticale della biocenosi picocianobatterica (Fig. III.3, in ciascun lago, paired t-test: $P > 0.05$)

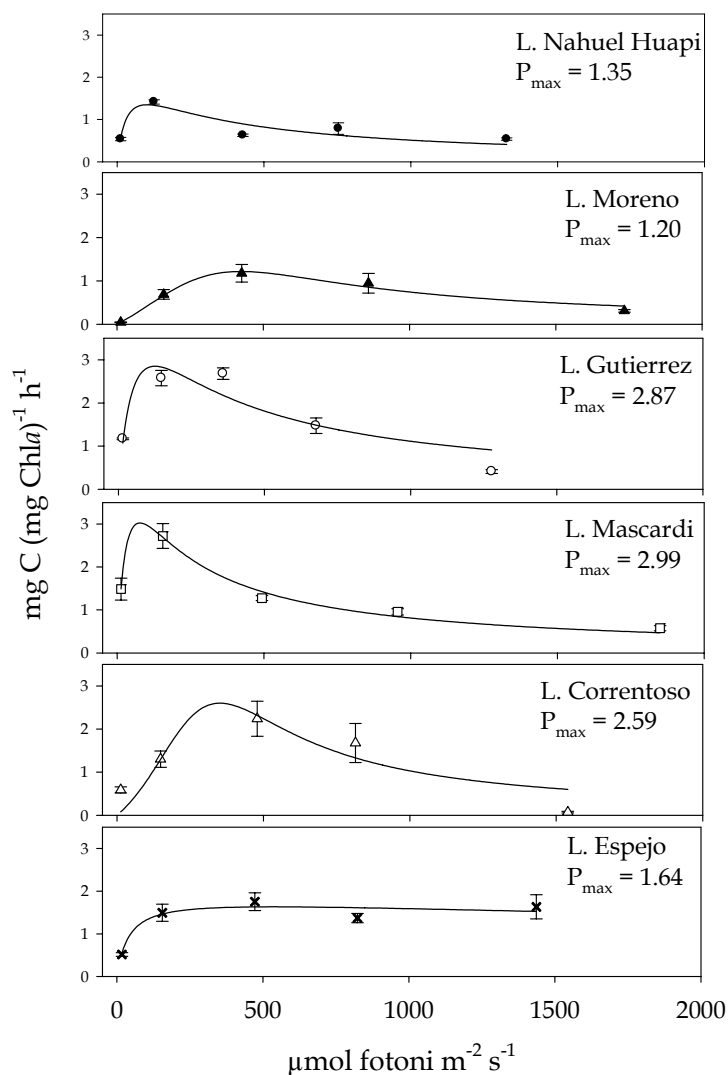


Fig. III.2 - La relazione tra la fotosintesi (P) e l'irradianza lumonsa (E) dei laghi andini studiati. Le curve rappresetano il fitting non-lineare delle 6 misure sperimentali ottenute applicando il modello Eilers e Peeters (1988).

Alcune OTU sembrano essere sito-specifiche mentre altre mostrano una distribuzione più cosmopolita tra i laghi. L'unità tassonomica ubiquitaria (OTU 1094) risulta anche la più abbondante e rappresenta dal 21 al 95% del totale. Questa OTU è dominante particolarmente nel Lago Nahuel Huapi e nel Lago

Moreno. Per contro la OTU 738 è stata trovata solo in 4 laghi: Gutierrez, Mascardi, Espejo e Correntoso così come la OTU 438 (percentualmente meno importante della OTU 738). La OTU 636 è stata ritrovata esclusivamente nel Lago Espejo.

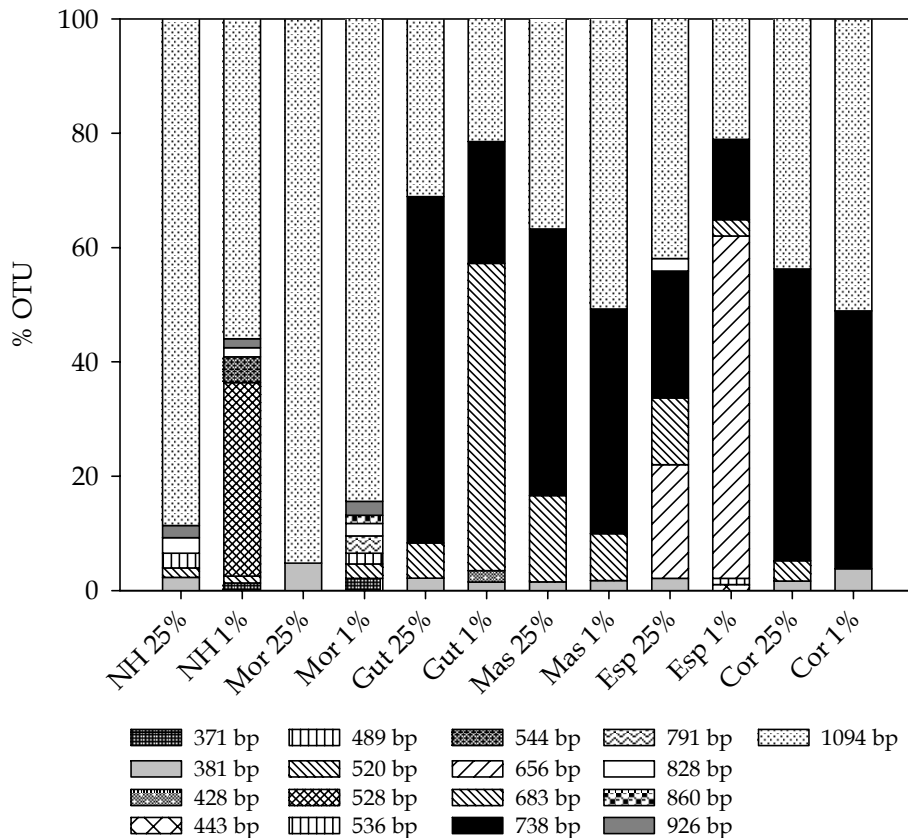


Fig. III.3 - Percentuale delle OTU ottenuta dall'analisi dei frammenti ITS-1. Gli istogrammi rappresentano i diversi laghi andini alle diverse profondità.

La *cluster analysis* costruita con i dati estrapolati dall'analisi di *fingerprinting* della comunità picocianobatterica è basata sul calcolo dell'indice di similarità di Whittaker (Fig. III.4). Nella cluster si distinguono principalmente due gruppi: uno composto dal Lago Moreno e Lago Naue Huapi (entrambe le profondità) e l'altro dai rimanenti laghi, eccetto il Lago Espero - 40 m che è risultato il meno legato agli altri laghi (indice di similarità = 0.60 Moreno, Naue Huapi; indice di similarità = 0.54 Gutierrez, Mascardi, Correntoso).

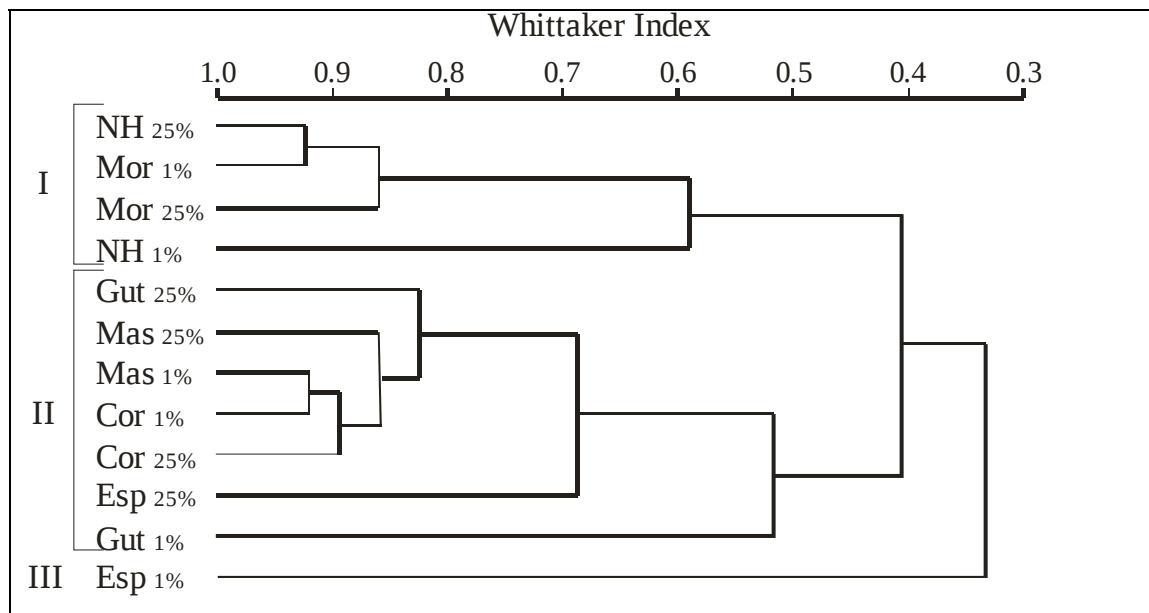


Fig. III.4 -. Cluster analysis della comunità picocinobatteriche dei laghi andini basata sull'indice di similarità di Whittaker.

Il valore più alto di ricchezza in OTU è stato trovato nel Lago Moreno e Nahuel Huapi ($S = 9$ e $S = 8$ rispettivamente) nei campioni relativi alle profondità più elevate (Fig. III.5). Tra i laghi satelliti il valore più alto di ricchezza in OTU è stato trovato nel Lago Espejo, dove è stata anche identificata la OTU 636, esclusiva di questo lago. Inoltre nel complesso Nahuel Huapi-Moreno compare la più bassa *evenness* (omogeneità) delle unità tassonomiche (0.43-0.42 rispettivamente); questo dato è significativamente differente da quelle degli altri laghi satelliti (ANOVA, $P < 0.001$) indicando la presenza di una OTU fortemente dominante (1094).

Si osserva inoltre una differenza significativa (t-test, $n = 6$, $P = 0.022$) della produzione picocianobatterica specifica per unità di clorofilla misurata nei laghi appartenenti ai due principali cluster con valori più alti nei quattro laghi satellite.

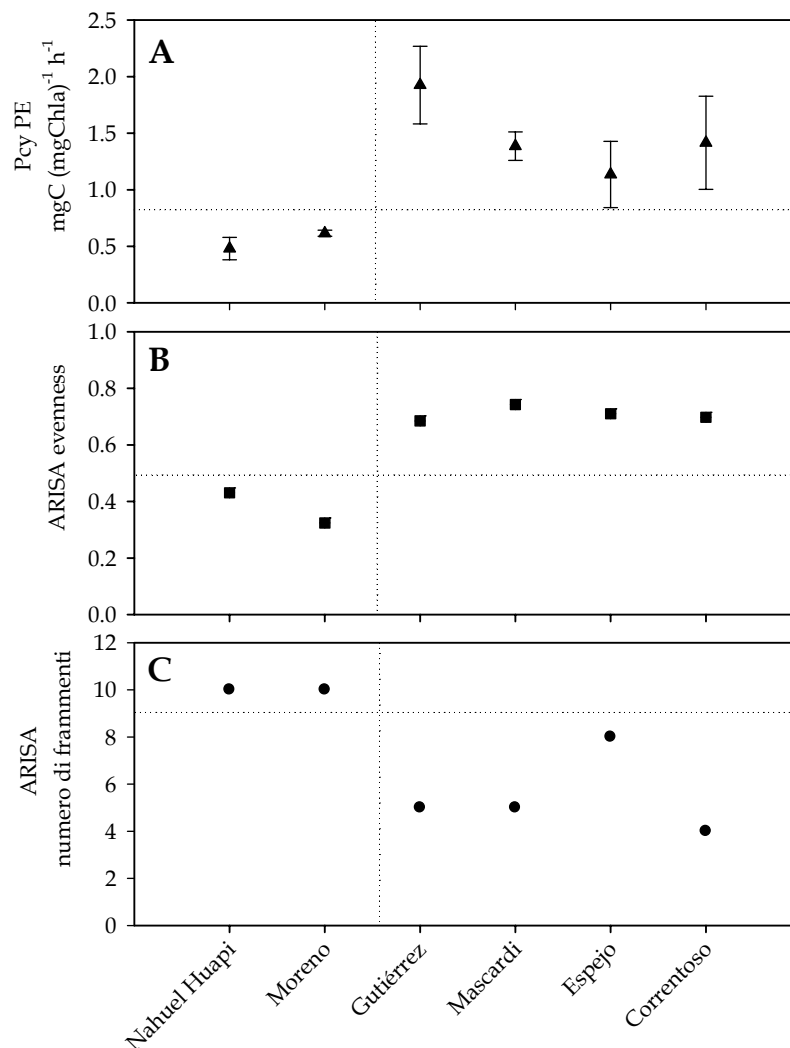


Fig. III.5 - Produzione specifica per unità di clorofilla *a* (A), evenness (B) e ricchezza (C) del distretto dei laghi andini.

La correlazione tra OTU e produzione primaria specifica per unità di clorofilla (ovvero l'efficienza fotosintetica) è stata valutata con la *Forward Stepwise Regression*. I risultati hanno mostrato che solo la OTU 738 è significativamente correlata alla produzione specifica per unità di clorofilla *a* ($P=0.007$). L'esclusiva presenza della OTU 738 nei laghi satelliti (Mascardi, Gutierrez, Espejo e Correntoso) mette quindi in relazione una differenza fisiologica dei popolamenti picocianobatterici presenti nei laghi satellite con la differente composizione della comunità, evidente dalle analisi di *fingerprinting*. La OTU

738 presente solo nel gruppo dei quattro laghi rappresenta dal 14 al 61% del totale della comunità.

Discussione

In questo capitolo le analisi della biocenosi picocianobatterica si sono concentrate sull'importanza che la radiazione luminosa, e quindi le caratteristiche fotosintetiche, potevano avere sulle possibili interazioni competitive esistenti tra le differenti unità tassonomiche che costituiscono questo distretto di laghi andini.

Il Lago Nahuel Huapi ed il Lago Moreno producono simili andamenti delle curve P/E, con bassi valori di P_{max} tipici di popolamenti limitati da luce e/o nutrienti. Questa particolare caratteristica fotosintetica della comunità è stata confermata anche dalla similarità che questi due laghi mostrano nella loro composizione in OTU (vedi cluster). Gli altri laghi che appartengono all'altro cluster delle OTU, e quindi con diversa composizione, mostrano valori molto simili con P_{max} più elevati e fotoinibizione. Solo la comunità presente nel Lago Espejo sembra mostrare una resistenza alla fotoinibizione alle alte irradianze. Globalmente i risultati delle caratteristiche fotosintetiche rispecchiano la diversa composizione picocianobatterica dei laghi.

Le curve luce (E) fotosintesi (P) sono state ottenute applicando il fitting non-lineare dell'equazione proposta da Eilers e Peeters (1998) usata in molti studi inerenti la quantificazione dei parametri fotosintetici (review di Henley, 1993). Queste curve non possono essere interpretate come risposta istantanea della comunità ma, piuttosto, come una risposta composita basata su campioni multipli che hanno una differente *light histories* (Henley, 1993). Le curve sono state considerate una caratterizzazione realistica degli adattamenti fotoacclimatativi della comunità picocianobatterica nei laghi (Callieri *et al.*, 2005), e di una rappresentazione dinamica delle caratteristiche fotosintetiche dei popolamenti che vi vivono.

Sebbene ARISA non fornisca informazioni filogenetiche dirette sulla comunità picocianobatterica, è stato dimostrato che i profili di diversità ottenuti con questa tecnica consentono di approssimare ragionevolmente variazioni ecologiche di una comunità batterica (Yannarell and Triplett, 2005). I cluster genetici definiti dalle sequenze ITS-1 sono stati identificati come “ecotipi” all’interno di un ambiente (Brown and Fuhrman, 2005). Usando questo particolare marker molecolare (ITS-1) è stato possibile studiare con una risoluzione molto elevata la microdiversità batterica nell’ambiente marino (Brown and Fuhrman, 2005). In questo caso la comunità batterica è ristretta allo studio della frazione picocianobatterica dando un importante valore all’irradianza e conseguentemente alle caratteristiche fotosintetiche nelle interazioni competitive.

La variazione delle caratteristiche fotosintetiche dei due cluster con differente diversità delle OTU è in accordo con le ipotesi che le sequenze dell’ITS-1 dei picocianobatteri definiscano gruppi funzionali differenti.

Un risultato molto importante e statisticamente significativo ($P < 0.001$) che è stato ottenuto è la presenza di una specifica OTU (738) positivamente correlata alla produzione specifica per unità di clorofilla *a*. Questa OTU è stata trovata nei laghi Espejo, Correntoso, Gutierrez e Mascardi, isolati naturalmente dal Lago Nahuel Huapi dopo l’ultimo *Glacial Maximum* (GM) (Zattara and Premoli, 2005). La correlazione qui sopra mostrata può dimostrare la specificità dell’habitat di una OTU che è presente solo in gruppo di laghi e che soprattutto è relazionata alla produzione specifica della comunità picocianobatterica di questo gruppo di laghi. I quattro laghi satellite formano un cluster differente da quello composto dal complesso Nahuel-Huapi-Moreno (indice di Whittaker). In questo complesso una OTU domina tutte le altre ed inoltre questi laghi mostrano anche la più alta ricchezza relativa di unità tassonomiche di picocianobatteri. L’attuale ed effettiva similarità delle biocenosi picocianobatteriche di questo distretto di laghi potrebbe riflettere perciò l’ancestrale composizione comune di questi due laghi quando ancora formavano un singolo

corpo d'acqua. Questa ipotesi potrebbe fornire una spiegazione ragionevole della composizione, ricchezza e caratteristiche fotosintetiche delle comunità picocianobatteriche di questo distretto di laghi.

Le analisi di clustering non hanno mostrato sostanziali differenze tra le due profondità studiate considerando tutti i laghi assieme. La diversità delle OTU e la ricchezza, infatti, appaiono molto simili sia all'1% che al 25% della PAR superficiale, indicando una certa omogeneità della composizione della comunità lungo la colonna d'acqua, anche se a regimi luminosi molto differenti. Questa similarità di composizione della comunità alle due diverse profondità, nonostante l'isolamento dovuto alla stratificazione estiva, conferma la grande capacità di acclimatazione a diversi regimi luminosi, caratteristica evidente del genere *Synechococcus*. Si potrebbe ipotizzare che quindi un vero e proprio adattamento potrebbe avvenire soltanto in scale temporali lunghe, dopo un cambiamento delle condizioni ambientali perdurante nel tempo e non solo relativo a condizioni stagionali (Kana and Gilbert, 1987).

Conclusioni e prospettive future

Nei laghi Andini nord patagonici si è trovato che circa il 50% dei frammenti significativi di ARISA sono sito-specifici, cioè unici di un lago e di un gruppo di laghi. Questo risultato si potrebbe mettere in relazione all'isolamento naturale di alcuni laghi dopo "*the Last Glacial Maximum*" (LGM) (Zattara and Premoli, 2005). Altre OTU hanno mostrato una distribuzione cosmopolita e rappresentano dal 21 al 95% del DNA totale amplificato.

La variazione delle caratteristiche fotosintetiche dei due cluster caratterizzati da una diversa composizione in OTU è consistente con l'ipotesi che la sequenza dell'ITS-1 dei picocianobatteri definisce gruppi funzionalmente differenti. In particolare con ARISA si è messa in luce una correlazione positiva tra una singola OTU e la produzione specifica per unità di clorofilla *a*. Questo dato indica le effettive potenzialità dell'analisi ITS-1 di ottenere anche aggiuntive informazioni ecologiche di supporto alla singola informazione di diversità.

Non è stata trovata una differenza significativa della composizione della comunità di picocianobatteri in questi laghi andini ultraoligotrofi lungo il gradiente verticale e ciò è stato messo in relazione alle grandi capacità di acclimatazione del genere *Synechococcus*.

In conclusione questo studio della diversità dei picocianobatteri presenti in sei tra i più importanti laghi nord patagonici ci ha permesso di costruire una prima base conoscitiva di queste comunità, peraltro così importanti in sistemi ultraoligotrofici. In futuro ci proponiamo di estendere le analisi effettuate ad altri laghi in bacini differenti, nella stessa regione andina, per poter approfondire lo studio biogeografico. Inoltre sono tuttora in corso analisi di *cloning* per costruire alberi filogenetici e mettere a confronto i picocianobatteri presenti in questi ambienti remoti con quelli già studiati in laghi dell'emisfero boreale.

Bibliografia

- Bell, T. and J. Kalff. 2001. The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography*, 46: 1243-1248.
- Callieri, C. and J.G. Stockner. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology*, 61: 1-14.
- Callieri, C., B. Modenutti, C. Queimalinos, R. Bertoni and E. Balseiro. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41: 511-523.
- Callieri, C., S. Moro, E. Caravati, N.D. Crosbie and T. Weisse. 2005. Strain specific photosynthetic response of freshwater picocyanobacteria. *Verhandlungen International Verein Limnologie*, 29: 777-782.
- Crosbie, N.D., M. Pöckl and T. Weisse. 2003. Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer sequence Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5716-5721.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor and C.R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 190-197.
- Eilers, P.H.C. and J.C.H. Peeters. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42: 199-215.
- Ernst, A., S. Becker, U.I.A. Wollenzien and C. Postius. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology*, 149: 217-228.
- Fahnenstiel, G.L., D.G. Redalje and S.E. Lohrenz. 1994. Has the Importance of Photoautotrophic Picoplankton Been Overestimated. *Limnology and Oceanography*, 39: 432-438.
- Falkowski, P.G. 1992. Molecular ecology of phytoplankton photosynthesis. In: P.G. Falkowski and A.D. Woodhead. (Eds), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. New York, Plenum Press: 47-68
- Falkowski, P.G. and J.A. Raven. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Malden, Massachussetts, Blackwell Science.
- Fisher, M.M. and E.W. Triplett. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4630-4636.
- Frenette, J.J., S. Demers, L. Legendre and J. Dodson. 1993. Lack of Agreement among Models for Estimating the Photosynthetic Parameters. *Limnology and Oceanography*, 38: 679-687.
- Fuller, N.J., G.A. Tarran, M. Yallop, K.M. Orcutt and D.J. Scanlan. 2006. Molecular analysis of picocyanobacterial community structure along an Arabian Sea transect reveals distinct spatial separation of lineages. *Limnology and Oceanography*, 51: 2515-2526.
- Giovannoni, S.J., E.F. DeLong, T.M. Schmidt and N.R. Pace. 1990. Tangential Flow Filtration and Preliminary Phylogenetic Analysis of Marine Picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2572-2575.

- Haverkamp, T., S.G. Acinas, M. Doeleman, M. Stomp, J. Huisman and L.J. Stal, 2008. Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. *Environmental Microbiology*, 10: 174-188.
- Henley, W.J. 1993. Measurement and Interpretation of Photosynthetic Light-Response Curves in Algae in the Context of Photoinhibition and Diel Changes. *Journal of Phycology*, 29: 729-739.
- Hewson, I., M.E. Jacobson-Meyers and J.A. Fuhrman. 2007. Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environmental Microbiology*, 9: 923-933.
- Huisman, J., J. Sharples, J.M. Stroom, P.M. Visser, W.E.A. Kardinaal, J.M.H. Verspagen and B. Sommeijer. 2004. Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology*, 85: 2960-2970.
- Kana, T.M. and P.M. Glibert. 1987. Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803 -II. Photosynthetic responses and mechanisms. *Deep Sea Research*, 34: 497-516.
- Ivanikova, N.V., L.C. Popels, R.M.L. McKay and G.S. Bullerjahn. 2007. Lake superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4055-4065.
- Janse, I., M. Meima, W.E.A. Kardinaal and G. Zwart. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6634-6643.
- Johnson, Z.I., E.R. Zinser, A. Coe, N.P. McNulty, E.M.S. Woodward and S.W. Chisholm. 2006. Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science*, 311: 1737-1740.
- Litchman, E. 2003. Competition and coexistence of phytoplankton under fluctuating light: experiments with two cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 241-248.
- Luna, G.M., A. Dell'Anno and R. Danovaro. 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8: 308-320.
- MacIntyre, H.L., T.M. Kana, T. Anning and R.J. Geider. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 38: 17-38.
- Modenutti, B.E., E.G. Balseiro and C.P. Queimalinos. 2000. Ciliate community structure in two South Andean lakes: the effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquatic Microbial Ecology*, 21: 299-307.
- Moeseneder, M.M., C. Winter and G.J. Herndl. 2001. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnology and Oceanography*, 46: 95-107.
- Morris, D.P., H. Zagarese, C.E. Williamson, E.G. Balseiro, B.R. Hargreaves, B. Modenutti *et al.* 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 40: 1381-1391.
- Nusch, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archives of Microbiology*, 14: 14-36.
- Perez, G.L., C.P. Queimalinos and B.E. Modenutti. 2002. Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research*, 24: 591-599.

- Platt, T., C.L. Gallegos and W.G. Harrison. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblage of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 38: 687-701.
- Postius, C. and A. Ernst. 1999. Mechanisms of dominance: coexistence of picocyanobacterial genotypes in a freshwater ecosystem. *Archives of Microbiology*, 172: 69-75.
- Quirós, R. and E. Drago. 1985. Relaciones entre variables físicas, morfométricas y climáticas en lagos patagónicos *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 16: 181-199.
- Rocap, G., D.L. Distel, J.B. Waterbury and S.W. Chisholm. 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1180-1191.
- Rocap, G., F.W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N.A. Ahlgren *et al.* 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424: 1042-1047.
- Steemann Nielsen, E. 1951. Measurement of the production of organic matter in the sea by means of carbon-14. *Nature*, 167: 684-685.
- Stockner, J.G., C. Callieri and G. Cronberg. 2000. Picoplankton and Other Non Bloom-Forming Cyanobacteria in Lakes. In: B.A. Whitton and M. Potts (Eds), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 195-231.
- Stomp, M., J. Huisman, F. de Jongh, A.J. Veraart, D. Gerla, M. Rijkeboer *et al.* 2004. Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432: 104-107.
- Tatur, A., R. del Valle, M.M. Bianchi, V. Outes, G. Villarosa, J. Niegodzisz and G. Debaene. 2002. Late Pleistocene paleolakes in the Andean and Extra-Andean Patagonia at mid-latitudes of South America. *Quaternary International*, 89: 135-150.
- Troussellier, M., H. Schafer, N. Batailler, L. Bernard, C. Courties, P. Lebaron *et al.* 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 13-24.
- Vollenweider, R.A. 1965. Calculation models of photosynthesis-depth curves and some implications regarding day rate estimates in primary production. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 18: 425-457.
- Yannarell, A.C. and E.W. Triplett. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 227-239.
- Zattara, E.E. and A.C. Premoli. 2005. Genetic structuring in Andean landlocked populations of *Galaxias maculatus*: effects of biogeographic history. *Journal of Biogeography*, 32: 5-14.

Considerazioni finali

L'importanza di studiare le biocenosi picocianobatteriche negli ambienti d'acqua dolce è stata dimostrata in molti studi riguardanti il numero, la biomassa, la produzione primaria, le dinamiche spazio-temporali, le interazioni trofiche e la competizione per alcune risorse limitanti, quali per esempio luce e nutrienti. Al contrario, i dati sulla diversità di questi microrganismi, necessari per comprenderne il ruolo nel contesto dei parametri ambientali misurati, sono considerati insufficienti.

L'interpretazione dei *pattern* di diversità dei microrganismi, alla luce della funzione che questi potrebbero avere nell'ambiente in cui vengono studiati, è una delle sfide più importanti per l'ecologo microbico. L'interpretazione di questi *pattern* aiuterebbe a comprendere se la diversità microbica possa essere influenzata dagli stessi fattori che alterano la diversità dei macroorganismi (Horner-Devine *et al.*, 2004; Green and Bohannan, 2006) e quindi, a valutare se esistono "*general rules in ecology*" (Lawton, 1999).

Gli studi sviluppati in questo progetto di ricerca hanno affrontato la tematica della diversità dei picocianobatteri studiandola in due ambienti naturali oligotrofi nei quali l'importanza di questi organismi è già stata dimostrata: il Lago Maggiore (Callieri and Piscia, 2002) e un distretto di laghi andini nord-patagonici (Callieri *et al.*, 2007).

Gli studi dei picocianobatteri basati sul loro riconoscimento morfologico ne sottostimano l'effettiva biodiversità che invece, con gli strumenti della biologia molecolare può essere valutata con maggiore sensibilità e dettaglio. La maggior parte delle ricerche effettuate con l'approccio biomolecolare, sono state indirizzate allo studio della diversità, dell'eco-fisiologia e della distribuzione dei picocianobatteri marini, *Synechococcus* (Rocap *et al.*, 2002; Ahlgren and Rocap, 2006) e *Prochlorococcus* (Rocap *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006). La struttura genomica di questi è nota dall'inizio di questo decennio (Palenik *et al.*, 2003).

Più frequentemente lo studio del genoma dei picocianobatteri è basato, come già detto, sull'analisi di porzioni genomiche come il 16S rDNA ed il tratto intergenico compreso tra il 16S rDNA e il 23S rDNA denominato ITS-1. Se le analisi di diversità sul 16S rDNA (*cloning* e analisi di *fingerprinting*) vengono studiate e applicate alle comunità microbiche da un paio di decenni, le analisi basate sullo studio dello spazio intergenico ITS-1 sono di più recente introduzione (Garcia-Martinez *et al.*, 1999).

L'approccio molecolare affrontato in questa ricerca si è basato sull'utilizzo delle analisi di *fingerprinting*. Queste tecniche vengono considerate un buon compromesso, rispetto allo studio per la costruzione di una *clone libraries* in termini di risoluzione e di costo analitico, per valutare la diversità (*sensu* Margalef, 1994). Qui sono state prese in considerazione le metodiche più comunemente utilizzate (DGGE, T-RFLP e ARISA) delle quali le prime due si basano sull'analisi del 16Ss rDNA e l'ARISA sull'analisi dell'ITS-1.

Il confronto metodologico dei due tratti genici, applicato allo studio di una comunità di picocianobatteri lacustre, è stato affrontato nel **Capitolo I**, dove sono state fatte analisi comparative sui due tratti genici (16S rDNA e ITS-1) utilizzando per il 16S rDNA, la DGGE e la T-RFLP, e per l'ITS-1, l'ARISA e la DGGE. La comparazione dell'ARISA e della DGGE sull'ITS-1 rappresenta una novità nel panorama scientifico soprattutto per la particolarità del tratto genico analizzato.

Le analisi sono state eseguite per comprendere quale potesse essere la tecnica (e quindi anche il tratto genico) che meglio avrebbe potuto descrivere la dinamica spazio-temporale della comunità picocianobatterica del Lago Maggiore nel 2006. Per la valutazione di questi risultati e per una loro più corretta interpretazione sono state eseguite le stesse analisi su una comunità artificiale di ceppi di picocianobatteri d'acqua dolce a ricchezza in unità tassonomiche nota. Dalla discussione metodologica dei risultati ottenuti è stato possibile concludere che sia il tratto genico analizzato che la tipologia di comunità (artificiale o naturale) possono influire sulla sensibilità delle analisi effettuate. In

particolar modo l'analisi dell'ITS-1 ha mostrato, mediamente, una risoluzione maggiore dell'analisi del 16S rDNA, in entrambi i tipi di comunità, soprattutto se raffrontata alle rispettive tecniche di studio che lavorano sul 16S rDNA. In bibliografia, l'analisi del tratto ITS-1, effettuato con ARISA, è stata a volte criticata per il rischio di sovrastima della diversità di una comunità per la presenza di operoni rRNA multipli riconducibili alla stessa unità tassonomica (Gurtler and Stanisich, 1996; Crosby and Criddle, 2003). Se raffrontata allo studio di altri gruppi di batteri (es. *Protobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) la sovrastima che si ottiene dall'analisi di questa porzione genica nei *Cyanobacteria* è mediamente inferiore a causa di un numero più basso di copie di operoni ribosomiali per genoma (Stewart and Cavanaugh, 2007). Tuttavia è stato dimostrato che, lavorando in ambienti oligotrofi, la presenza di molti operoni ribosomiali intragenomici è limitata dalla dominanza, tipica per questi ambienti, di organismi con bassi tassi di crescita (Klappenbach *et al.*, 2000). Si sa infatti che i picocianobatteri marini (appartenenti ai generi *Synechococcus* o *Prochlorococcus*) hanno pochi operoni rRNA (Brown and Fuhrman, 2005).

Per tutte le considerazioni sopra illustrate, la scelta di utilizzare l'ARISA per una più sensibile stima della diversità delle comunità di picocianobatteri lacustri, potrebbe essere considerata una strategia vincente.

Nel **Capitolo II** sono stati discussi i dati ottenuti dalle analisi di *fingerprinting* (T-RFLP e ARISA) della comunità di picocianobatteri del Lago Maggiore e soprattutto è stata valutata la distribuzione della diversità misurata sia alla luce della dinamica delle unità tassonomiche (OTU) che in relazione alla struttura termica, al clima ottico subacqueo e alle concentrazioni di fosforo, nutriente limitante in questo lago. Queste tecniche di *fingerprinting* sono considerate strumenti appropriati per una rapida stima dei cambiamenti della struttura della comunità nel tempo e nello spazio (Yannarell *et al.*, 2003; Eiler and Bertilsson, 2007). L'approccio semi-quantitativo utilizzato in questa tesi per studiare la composizione della comunità di picocianobatteri ha consentito una dettagliata comprensione della dispersione delle differenti unità tassonomiche

come in molti altri studi effettuati negli ambienti acquatici (Moeseneder *et al.*, 2001; Hewson *et al.*, 2007).

Gli studi a lungo termine sul Lago Maggiore hanno mostrato una abbondanza più elevata dei batteri (picoplancton eterotrofo) rispetto a quella dei picocianobatteri (picoplancton autotrofo), sempre risultata almeno di un ordine di grandezza inferiore (Bertoni, pers comm; Callieri, 2008). Si tratta in altre parole di una comunità “rara” se considerata nel contesto del dominio dei batteri. Lo studio della sua diversità, con tecniche di *fingerprinting*, si può quindi considerare pionieristico perché generalmente vengono applicate per studiare solamente la diversità delle OTU più abbondanti (Pedrós-Alió, 2007).

La dinamica delle OTU di picocianobatteri dominanti (> 5%) nel Lago Maggiore mostra come l’analisi sull’ITS-1 (con ARISA) debba considerarsi capace di maggiore risoluzione tassonomica di quella eseguita sul 16S rDNA (con T-RFLP) confermando i risultati ottenuti in altri studi (Hewson and Fuhrman, 2004) sul confronto tra 16S rDNA (genere) e ITS-1 (specie).

La composizione dei campioni valutata con la metodica ARISA mette in luce una successione stagionale dei ceppi di picocianobatteri ed un cambiamento della comunità con la profondità, nel periodo estivo.

Le variabili ambientali che, associate, risultano più importanti nell’influenzare le biocenosi picocianobatteriche sono la struttura termica (temperatura e profondità del mescolamento) e, a questa correlate, le condizioni di irraggiamento lungo la colonna d’acqua. Tuttavia quest’ultimo parametro risulta significativo nel determinare una differenza della composizione della comunità soltanto in estate, quando si instaura una ben delineata struttura termica. Tuttavia non si può escludere l’effetto di altre variabili biotiche, come il *grazing*, nel determinare sostituzione di genotipi e variazioni di abbondanza di picocianobatteri.

Per ampliare lo spettro di condizioni ambientali come sorgenti di variabilità nelle popolazioni picocianobatteriche, nel **Capitolo III** si è studiata la correlazione tra la diversità di comunità picocianobatteriche in laghi andini

ultraoligotrofi e le loro caratteristiche fotosintetiche. Si è potuto dimostrare la relazione tra una OTU, presente in un cluster di laghi e la produzione specifica per unità di clorofilla delle popolazioni ivi residenti. Appare quindi evidente il nesso tra una caratterizzazione genetica ed una ecologica delle popolazioni fatto che consente di instaurare relazioni tra genotipo ed ecotipo. In altre parole, questi risultati indicano l'effettiva possibilità dell'analisi ITS-1 di fornire anche informazioni ecologiche in aggiunta a quelle di diversità. Questo è confermato dal fatto che lo studio dell'ITS-1 anche in altre comunità microbiche ha evidenziato l'esistenza di una *microdiversity* che può avere un'importanza ecologica (Jaspers and Overmann, 2004).

Le nuove metodologie analitiche introdotte negli ultimi anni, ed utilizzate nella ricerca oggetto di questa tesi hanno fortemente contribuito ad accrescere le nostre conoscenze sulla diversità dei microrganismi nei laghi anche se, come sottolineano alcuni autori (Prosser *et al.*, 2007), è necessario sviluppare le basi teoriche per modellare i meccanismi regolatori della diversità osservata.

Bibliografia

- Ahlgren, N.A. and G. Rocap. 2006. Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7193-7204.
- Brown, M.V. and J.A. Fuhrman. 2005. Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. *Aquatic Microbial Ecology*, 41: 15-23.
- Callieri, C. 2008. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews* 1.
- Callieri, C. and R. Piscia. 2002. Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47: 941-956.
- Callieri, C., B. Modenutti, C. Queimalinos, R. Bertoni and E. Balseiro. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41: 511-523.
- Crosby, L.D. and C.S. Criddle. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*, 34: 790-802.
- Eiler, A. and S. Bertilsson. 2007. *Flavobacteria* blooms in four eutrophic lakes: Linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3511-3518.
- Garcia-Martinez, J., S.G. Acinas, A.I. Anton and F. Rodriguez-Valera. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 55-64.
- Green, J. and B.J.M. Bohannan. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 501-507.
- Gurtler, V. and V.A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-16.
- Hewson, I. and J.A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3425-3433.
- Hewson, I., M.E. Jacobson-Meyers and J.A. Fuhrman. 2007. Diversity and biogeography of bacterial assemblages in surface sediments across the San Pedro Basin, Southern California Borderlands. *Environmental Microbiology*, 9: 923-933.
- Horner-Devine, M.C., M. Lage, J.B. Hughes and B.J.M. Bohannan. 2004. A taxa-area relationship for bacteria. *Nature*, 432: 750-753.
- Jaspers, E. and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4831-4839.
- Johnson, Z.I., E.R. Zinser, A. Coe, N.P. McNulty, E.M.S. Woodward and S.W. Chisholm. 2006. Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science*, 311: 1737-1740.
- Klappenbach, J.A., J.M. Dunbar and T.M. Schmidt. 2000. RRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1328-1333.
- Lawton, J.H. 1999. Are there general laws in ecology? *Oikos*, 84: 177-192.

- Margalef, R. 1994. Diversity and biodiversity - their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 66: 3-14.
- Moeseneder, M.M., C. Winter, and G.J. Herndl. 2001. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnology and Oceanography*, 46: 95-107.
- Palenik, B., B. Brahamsha, F.W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain *et al.* 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, 424: 1037-1042.
- Pedrés-Alió, C. 2007. Dipping into the rare biosphere. *Science*, 315: 192-193.
- Prosser, J.I., B.J.M. Bohannan, T.P. Curtis, R.J. Ellis, M.K. Firestone, R.P. Freckleton *et al.* 2007. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 384-392.
- Rocap, G., D.L. Distel, J.B. Waterbury and S.W. Chisholm. 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1180-1191.
- Rocap, G., F.W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N.A. Ahlgren *et al.* 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424: 1042-1047.
- Stewart, F.J. and C.M. Cavanaugh. 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 65: 44-67.
- Yannarell, A.C., A.D. Kent, G.H. Lauster, T.K. Kratz and E.W. Triplett. 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*, 46: 391-405.