

RICERCHE SULLA BIODIVERSITÀ DELLE COMUNITÀ BATTERICHE IN TRE LAGHI ANTARTICI

LUIGI MICHAUD*, ANGELINA LO GIUDICE,
CONSOLAZIONE CARUSO, SANTINA MANGANO, AND VIVIA BRUNI

(Nota presentata dal Socio Ordinario Vivia Bruni)

ABSTRACT. The bacterial diversity in three Antarctic lakes located at Crater Cirque (CC), Inexpressible Island (INI) and Luther Peak (LH) in the Victoria Land was investigated by a combination of culture-dependent and culture-independent techniques. The *in situ* abundance of different bacterial groups was determined by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), while bacterial diversity among the cultivable microflora was investigated by culturing and genetic fingerprinting. Differences in the composition of bacterial assemblages were observed among the lakes investigated, when using the two approaches reported above. Overall, the detection rate by FISH of DAPI-stained cells varied from 48.4% to 68.9% with the general bacterial probe EUB338. Bacteria hybridizing with the group-specific probe CF319a were found to be abundant in the three lakes. A total of 478 strains were isolated from R2A agar plates and grouped by restriction analysis technique; sequencing of representative 16S rDNAs was performed to elucidate the taxonomic positions of isolates. Overall, isolates were placed within five different taxa: γ -*Proteobacteria* (39%), *Bacteroidetes* (35%), β -*Proteobacteria* (8%), *Actinobacteria* (7%) and α -*Proteobacteria* (5%). Finally, the 5.8% of total isolates shared the highest degree of sequence identity with unclassified bacteria. Members of the γ -*Proteobacteria* predominated at INI, whereas isolates from CC and LH mainly belonged to the *Bacteroidetes*. Among the γ -*Proteobacteria*, the genus *Pseudomonas* was predominant, whereas *Flavobacterium* spp. were very common among the *Bacteroidetes*. Finally, several *Actinobacteria* were closely related to unknown Antarctic bacteria.

1. INTRODUZIONE

Da un punto di vista geografico e climatico, l'Antartide è un ambiente isolato dal resto delle terre emerse e la scarsa o assente influenza antropogenica contribuisce a rendere questo continente unico rispetto agli altri presenti sul nostro pianeta. Esso è caratterizzato da condizioni ambientali estreme, come temperature medie annuali di -50°C con punte invernali fino a -90°C , la mancanza d'acqua allo stato liquido su scala continentale e l'assenza pressochè totale di vegetazione [1].

L'estesa calotta glaciale, che ne ricopre la quasi totalità della superficie, si ritiene che iniziò a formarsi 20 milioni di anni fa ed ha uno spessore medio di 2500 m (con punte massime di oltre 4500 m). Il volume totale stimato di questa immensa riserva idrica è compreso tra i 25 e i 30 milioni di chilometri cubi di ghiaccio, pari al 90% del ghiaccio presente sulla Terra. Durante l'estate australe, solo il 2% del continente antartico risulta

libero dai ghiacci ed è in queste aree che si ritrovano alcuni degli ecosistemi terrestri più estremi. Nelle zone deglacciate costiere si trovano numerosi corpi idrici di diversa grandezza (principalmente laghi e pozze), che rimangono allo stato liquido solo durante un periodo limitato dell'anno. La quasi totalità dei laghi e delle pozze in Antartide è endoreica: rari sono gli ambienti con acque superficiali di alimentazione e ancor meno quelli che hanno emissari [2].

La salinità dei laghi costieri è influenzata dall'ambiente marino, sia attraverso l'ingresso superficiale di acqua marina sia tramite penetrazioni sublacustri che determinano, in molti casi, l'istaurarsi di stratificazioni crenogeniche [4]. La presenza di laghi salati meromittici nel continente antartico è tutt'altro che rara soprattutto nelle zone costiere ed in particolare nella penisola antartica. Nei laghi più interni la salinità è influenzata dalla geologia dell'ambiente circostante [4].

I laghi d'acqua dolce sono generalmente caratterizzati, nel periodo invernale, da un regime freddo monomittico al di sotto dello strato di ghiaccio e, quando in estate questo si scioglie, da un totale rimescolamento della colonna d'acqua. I laghi, riserva naturale di biodiversità, ospitano biotopi incontaminati adattati alle basse temperature (raramente superiori ai 6 – 10°C) e sono caratterizzati da bassi livelli medi di radiazioni fotosinteticamente attive (*Photosynthetically Active Radiation*, PAR), dovuti sia al periodo invernale buio, ma anche alla copertura di ghiaccio e neve che riduce grandemente la quantità di luce disponibile per i processi fotosintetici. Di conseguenza il fitoplancton ha sviluppato strategie adattative adeguando i sistemi fotosintetici a condizioni di scarsa luminosità, ma anche diventando pesantemente dipendente da meccanismi di mixotrofia [7].

I laghi antartici sono generalmente caratterizzati da basse concentrazioni di nutrienti inorganici (azoto e fosforo) e le loro caratteristiche biogeochimiche, comunque, riflettono quelle dell'ambiente che li circonda direttamente. Il loro stato trofico può variare da una situazione di ipo-oligotrofia ad una di mesotrofia e ad una certa eutrofia in alcune aree costiere [2], dove vi sia un apporto di nutrienti attraverso l'abbondante avifauna (skua, sterne polari, pinguini) o presenza di mammiferi marini [4].

A causa delle estreme condizioni climatiche antartiche, gli organismi che colonizzano gli ambienti lacustri sono meno soggetti ai fenomeni di desiccazione, alle brusche variazioni termiche e alle radiazioni solari rispetto a quelli che vivono in ambienti terrestri. Ciò comporta che la maggior parte della biomassa non marina in Antartide si ritrovi proprio nei laghi e nelle pozze. Queste comunità sono sottoposte ad un'elevata pressione selettiva derivante dalle condizioni ambientali e, per tale motivo, vi si possono riscontrare organismi appartenenti a *taxa* endogeni, probabilmente non ancora descritti, caratterizzati da nuovi adattamenti biochimici, tra cui proteine anti-gelo, enzimi adattati al funzionamento a bassa temperatura e tolleranza all'essiccamento o ad elevate concentrazioni saline. Proprio le condizioni ambientali estreme fanno sì che molte forme di vita riscontrate praticamente in ogni parte del mondo non si ritrovino nei laghi antartici, dove la maggior parte della biodiversità risulta ascrivibile ai microrganismi [4]. Batteri, alghe, protisti eterotrofi e talvolta metazoi possono essere trovati sia nell'ambiente planctonico che in quello bentonico, mentre i cianobatteri sono gli organismi più diffusi negli ecosistemi lacustri antartici bentonici, dove possono formare degli estesi biofilm e/o ammassi (*mats*) [4].

I laghi continentali risultano dominati da plancton costituito da protozoi fotosintetici ed

eterotrofi, poche alghe ed infine da funghi, batteri e virus. Nei laghi costieri si può riscontrare la presenza di un singolo crostaceo, come il cladocero *Daphniopsis studeri* nei laghi d'acqua dolce, o un copepode in quelli salati, oltre a pochi rotiferi [7]. Nei laghi delle Dry Valleys, molto più estremi di quelli costieri, non si riscontrano generalmente crostacei, ma solo pochi rotiferi appartenenti al genere *Philodina* [8]. In molti laghi costieri di origine marina, formati a seguito di movimenti isostatici, la comunità marina originale eucariotica si è andata sempre più semplificando, riducendosi a pochi nanoflagellati dominanti e dinoflagellati, ciliati e diatomee [7]. L'abbondanza del batterioplancton nei laghi antartici, compresi quelli ultraoligotrofici, è generalmente compresa fra 10^4 e 10^6 cellule ml^{-1} e, soprattutto nei laghi continentali, tale biomassa può arrivare a costituire il 30-60% della biomassa totale [4].

Scopo del lavoro è quello di studiare da un punto di vista filogenetico le comunità batteriche di tre laghi antartici ubicati nella Terra Vittoria. Infatti lo studio delle diverse componenti biologiche dei laghi antartici risulta di fondamentale importanza al fine di conservare e proteggere dal crescente impatto antropico tali ecosistemi unici e peculiari (basti solo pensare al crescente sviluppo delle attività umane in Antartide per ricerca, turismo e sfruttamento delle risorse). Tali ricerche consentono inoltre di disporre di un quadro quanto più completo possibile sullo stato attuale e sull'evoluzione di questi ecosistemi, indispensabili per cercare di costruire modelli predittivi sulle variazioni globali dato il ruolo cardine dell'Antartide nella climatologia del pianeta Terra. Inoltre, un altro aspetto di interesse più applicativo potrà scaturire dall'isolamento di nuove molecole da specie batteriche con corredi genetici non ancora conosciuti.

2. AREA DI STUDIO

Durante l'Estate Australe 2004-05, campioni di acqua superficiale sono stati prelevati da tre laghi Antartici ubicati nella Terra Vittoria: Crater Cirque (CC), Inexpressible Island (INI-1) e Luther Peak (LH) (Figura 1). I tre laghi oggetto di questo lavoro, insieme ad altri della Victoria Land, sono studiati da molti anni da parte di varie Unità Operative (U.O.) del PNRA (Progetto Nazionale di Ricerche in Antartide) ed in particolare da parte della U.O. Bargagli dell'Università di Siena. Crater Cirque è un pittoresco laghetto sito nella caldera di un vulcano inattivo e, tra i tre studiati, è il più lontano dalla costa, mentre Inexpressible Island (Lago 1) si trova a soli 2 km dal mare. Il lago Luther Peak, infine, a soli 8 km dalla costa, è posto più in alto a 350 m s.l.m.

3. MATERIALI E METODI

I campioni sono stati pretrattati direttamente in Antartide e condizionati per la spedizione in Italia. L'abbondanza del batterioplancton totale (cellule/ml) è stata stimata mediante la procedura di Porter e Feig [14] che prevede conteggi diretti al microscopio ad epifluorescenza (Axioplan, Zeiss) dotato di un set di filtri specifico per DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole, concentrazione finale $10 \mu\text{g/ml}$ in acqua distillata filtrata su membrane di porosità $0,22 \mu\text{m}$) di opportune aliquote dei campioni fissati con formalina (2%). Il numero dei microrganismi coltivabili (CFU/ml) è stato determinato su piastre di R2A Agar (Difco) dopo 21 giorni di incubazione a 4°C . Le piastre adoperate per i conteggi vitali sono state utilizzate per isolare i ceppi batterici per le successive analisi filogenetiche. Le

colonie cresciute sono state prelevate in modo casuale e purificate utilizzando lo stesso terreno di coltura.

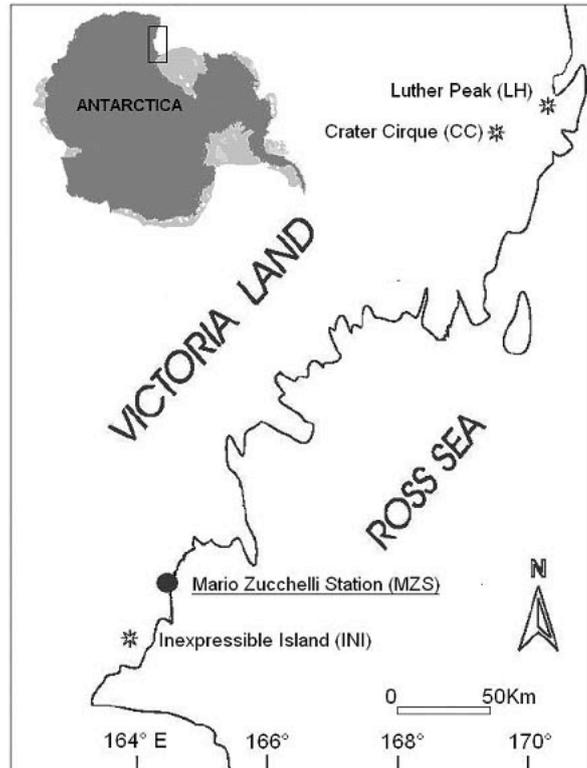


Figura 1: Siti di campionamento

La determinazione dell'abbondanza *in situ* dei differenti gruppi batterici è stata determinata mediante *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) come descritto da Glöckner et al. [6]. A questo scopo, aliquote del campione originale sono state fissate in paraformaldeide (4%, vol/vol) e conservate a 4°C. I campioni, filtrati su membrane in polycarbonato (Isopore, diametro 25 mm, porosità 0,22 μm), sono stati ibridati con sonde oligonucleotidiche marcate con il fluorocromo Cy3 sintetizzate da MWG-Biotech (Germania) (Tabella 1).

Tabella 1: Sonde utilizzate per l'analisi FISH.					
	Sonda e organismi target	Sequenza	FA%	Target site	Ref
EUB 338 I	Most but not all Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0	16S (338-355)	5
EUB 338 II	Planctomycetes	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0	16S (338-355)	5
EUB 338 III	Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0	16S (338-355)	5
ALF1b	Alfa-proteobacteria	CGT TCGYTCTGAGCCAG	20	16S (968-985)	5
BET 42a	Beta-proteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	35	23S (1027-1043)	5
GAM42a	Gamma-proteobacteria	GCCTTC CCACATCGTTT	35	23S (1027-1043)	5
CF319a	Cytophaga-Flavobacterium- Bacterioides	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	16S (319-336)	5
HGC69a	Actinobacteria (high G+C content - Gram-positive bacteria)	TATAGTTTACCACCGCCGT	25	23S (1901-1918)	15
Arch915	Archaea	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	20	16S (915-934)	16
LGC354a	Firmicutes (low G+C content - Gram-positive bacteria)	TGGAAGATTCCTACTGC	35	16S (354-371)	11
LGC354b	Firmicutes (low G+C content - Gram-positive bacteria)	CGGAAGATTCCTACTGC	35	16S (354-371)	11
LGC354c	Firmicutes (low G+C content - Gram-positive bacteria)	CCGAAGATTCCTACTGC	35	16S (354-371)	11

FA%: % di Formamide nel buffer di ibridizzazione.

Le sonde EUB 338I, 338II e 338III sono state unite in una unica miscela equimolare per aumentare il tasso di ibridazione. La miscela è stata definita EUB Mix.

Le sonde LGC354a, b e c sono state unite in una unica miscela equimolare per aumentare il tasso di ibridazione. La miscela è stata definita LGC Mix.

Le sezioni dei filtri sono state esaminate con un microscopio ad epifluorescenza (Axio-plan, Zeiss) dotato dei filtri specifici per il fluorocromo Cy3. Per ogni campione sono stati esaminati 10-20 campi.

Da ogni ceppo purificato una singola colonia è stata sottoposta a lisi termica (95°C per 10') e successivamente si è direttamente proceduto all'amplificazione mediante PCR del 16S rDNA, utilizzando una PCR ABI 9600 thermocycler (PE, Applied Biosystems), come descritto in precedenza [12]. I primer universali utilizzati sono stati il P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e il P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'). La mix di reazione, costantemente mantenuta a 0°C, conteneva 1-10 ng di DNA, buffer 1X, 1,5 mM MgCl₂, 150 ng di ognuno dei due primer, 250 μM dNTP, 0,5 unità di PolyTaq polymerase (Polymed, Italia) e acqua MilliQ sterile fino a volume di 20 μl. Il programma di PCR consisteva in 3' a 95°C seguiti da 30 cicli di 1' a 94°C, 1' a 50°C, 2' a 72°C ed uno step finale di 10' a 72°C. Il risultato della reazione è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8%, contenente 1 μg/ml di bromuro di etidio. I ceppi sono stati suddivisi in *Operational Taxonomic Units* (OTU), mediante analisi di restrizione ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) con l'enzima *AluI* (Fermentas, Italia)

e un rappresentante per ogni OTU è stato identificato filogeneticamente e caratterizzato fenotipicamente [9, 12].

4. RISULTATI

Caratteristiche fisiche e chimiche. I dati relativi alle caratteristiche fisiche e chimiche dei tre laghi in esame (Tabella 2) sono stati gentilmente forniti dal Prof. Bargagli e dalla Dott.ssa Borghini dell'Università di Siena.

Sito	Crater Cirque	Inexpressible Island (lago 1)	Luther Peak
Codice	CC	INI-1	LH
Coordinate	72° 66' S - 169° 35' E	74° 90' S - 163° 68' E	72° 37' S - 169° 89' E
¹ Alt. (m a.s.l.)	200	154	350
² d (km)	30	2	8
T (°C)	1,8	4,1	0,9
³ Cond	13	1995	321
pH	7,4	8,17	9,75
Cl ⁻	3,39	580,41	91,17
NO ₃ ⁻	0,59	0,98	0,07
SO ₄ ²⁻	1,04	200,53	6,22
Na ⁺	1,8	410,61	47,13
K ⁺	1,37	37,66	3,78
Mg ²⁺	0,41	25	7,41
Ca ²⁺	1,65	28,17	9,64
N tot	2,3	1,89	2,29
P tot	0,06	0,01	0,02
Si	nd	23,09	6,89

Note: 1) altezza sul livello del mare; 2) distanza dalla costa; 3) conducibilità (microSiemens/cm).
 Dati relativi al campionamento effettuato durante la XX Spedizione Italiana in Antartide da parte della U.O. Bargagli.

Abbondanza. I dati relativi all'abbondanza batterica totale (cellule/ml) e a quella della frazione coltivabile (CFU/ml) sono riportati nella Tabella 3.

Sito	Codice	Abbondanza batterioplancton (cell/ml)	Conteggi vitali (CFU/ml)	Coltivabilità (%)
Crater Cirque	CC	$3,87 \pm 1,10 \times 10^5$	$24 \pm 1,7 \times 10^2$	0,62
Inexpressible Island	INI-1	$2,82 \pm 0,95 \times 10^5$	$39 \pm 2,7 \times 10^2$	1,38
Luther Peak	LH	$4,51 \pm 1,59 \times 10^5$	$23 \pm 3,8 \times 10^2$	0,51

Confrontando i valori si può notare come i laghi CC e LH presentino una più elevata abbondanza cellulare rispetto a INI-1, ma che in quest'ultimo le CFU/ml e la percentuale di coltivabilità siano superiori.

Fluorescent In Situ Hybridization. L'analisi FISH ha messo in evidenza come nel lago INI-1 la percentuale di cellule ibridate con la EUB Mix (specificata per i Batteri) e quella relativa al gruppo dei CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*; sonda CF319a) fosse più elevata che negli altri due laghi (Tabella 4).

Tabella 4: Risultati dell'ibridazione *in situ* (FISH).

Sito	Codice	% cellule ibridate rispetto al DAPI							
		EUB338	ALF968	BET42a	GAM42a	CF319a	HGC69a	LGC354	ARCH 915
Crater Cirque	CC	48,36	4,8	5,4	3,8	9,7	1,2	0,5	3,1
Inexpressible Island	INI-1	68,94	2,5	2,8	1,7	25,1	2,6	2,6	2,7
Luther Peak	LH	41,43	2,2	3,0	1,6	10,8	3,5	1,7	4,8

Ambedue questi gruppi comunque costituivano la componente batterica dominante nei tre laghi. Tra i proteobatteri (α , β , γ), quelli appartenenti alla suddivisione β sono risultati sempre i più rappresentati all'interno dei tre laghi. Poche sono risultate le cellule ibridate con la sonda LGC (*Firmicutes*) nel lago LH ed ancor meno nel lago CC rispetto a INI-1. La percentuale di cellule ibridate con la sonda specifica per gli Archei è risultata comparabile nei laghi CC e INI-1 e più alta nel lago LH.

Analisi filogenetica dei ceppi coltivabili. In totale sono stati isolati 478 ceppi batterici: 197 da CC, 135 da INI-1 e 146 da LH. L'analisi dei profili di restrizione ARDRA, lago per lago, ha permesso di suddividere i ceppi isolati in 25 OTU da CC, 27 OTU da INI-1 e 26 OTU da LH. Considerando l'insieme dei tre laghi, omettendo le OTU ridondanti, i 478 ceppi sono stati suddivisi in 39 OTU e l'identificazione dei rappresentanti di ciascuna di queste ha condotto all'individuazione di 5 gruppi filogenetici differenti (Figura 2): γ -Proteobatteri (39%), Bacteroidetes (35%), β -Proteobatteri (8%), Attinobatteri (7%) e α -Proteobatteri (5%).

I γ -Proteobatteri sono apparsi predominanti nel lago INI-1 (in particolare *Psychrobacter* e *Pseudoalteromonas*), mentre i ceppi isolati da LH e CC appartengono principalmente ai Bacteroidetes (con una forte dominanza di *Flavobacterium segetis* ceppo AT1048, Accession Number AY581115). Gli Attinobatteri sono stati isolati esclusivamente da CC (20 ceppi filogeneticamente vicini ad un non meglio definito *Antarctic bacterium* R-9112, Accession Number AJ441003), mentre gli α -Proteobatteri coltivabili, assenti nel lago LH, presentavano un'elevata omologia soprattutto con *Sphingomonas* sp. AJ968691 e *Rhodopseudomonas* sp. ORS 1416ri. Tra i β -Proteobatteri quelli maggiormente rappresentati sono risultati essere *Acidovorax temperans* (Accession Number DQ111771), *Simplicispira* sp. R-23033 (Accession Number AM236310) e *Polaromonas* sp. ceppo UMS-142 (Accession Number EF127651). Nel complesso il 6% dei ceppi isolati dai tre laghi non è risultato essere correlato a microrganismi precedentemente classificati. Alcune sequenze, infine, hanno mostrato una bassa similarità (94-95%) con quelle presenti in banca dati, suggerendo che possano appartenere a batteri non ancora descritti (Tabella 5).

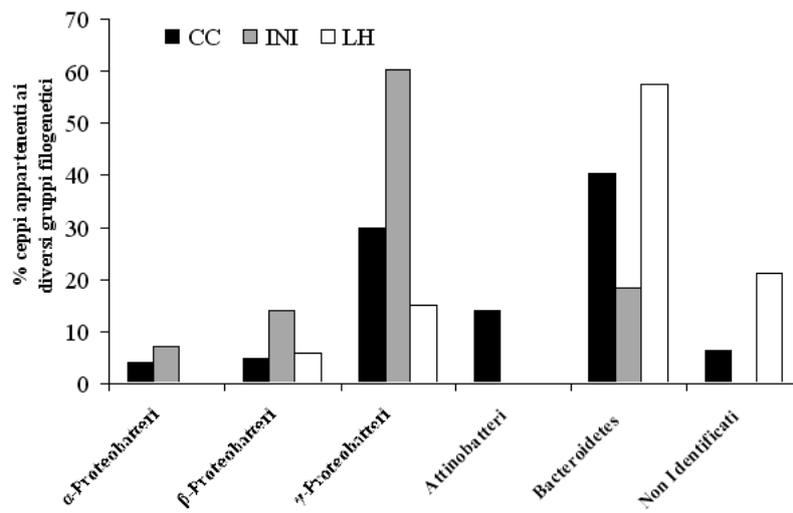


Figura 2: Percentuale di ceppi coltivabili appartenenti ai gruppi filogenetici riscontrati in ciascun lago.

Tabella 5: Affiliazione filogenetica dei rappresentanti le OTU.			
Phylum o classe	¹RI	²Next relative by GenBank alignment (³AN, organismo)	⁴(%)
α -Prot ⁵	INI89	DQ205302, <i>Sphingomonas</i> sp. HI-D4	98
	INI100	AB074601, Uncultured alpha proteobacterium	98
	CC 25	AF410895, <i>Mesorhizobium</i> sp. Lo5-9	99
	CC217	AJ968691, <i>Rhodopseudomonas</i> sp. ORS 1416ri	99
β -Prot ⁶	INI104	DQ011678, <i>Herminiimonas fonticola</i> strain S-99	99
	INI143	M084034, <i>Acidovorax</i> sp. R-25074	99
	INI16	DQ111771, <i>Acidovorax temperans</i>	99
	CC 174	EF127651, <i>Polaromonas</i> strain UMS-142	99
	CC 221	AM236310, <i>Simplicispira</i> sp. R-23033	98
	LH3	AJ964889, Beta proteobacterium LF4-65	98
	CC123	DQ535024, Beta proteobacterium LH10	99
	γ -Prot ⁷	LH17	EF101551, <i>Psychrobacter pulmonis</i> strain KOPRI24933
INI36		EF204289, <i>Psychrobacter faecalis</i> isolate H97	100
INI132		AM409198, <i>Psychrobacter</i> sp. 218(120zx)	99
CC 160		AM419022, <i>Psychrobacter</i> sp. Nj-79	99
LH89		AF184220, <i>Pseudomonas</i> sp. Ant5	100
CC 219		AM286272, <i>Pseudomonas</i> sp. isolate Ch5	99
INI14		AB126691, <i>Pseudomonas</i> sp. SG-2	100
INI95		AY689025, <i>Pseudomonas</i> sp. 3A_6	99
INI138		EF111112, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
CC 115		DQ207731, <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain CCM 2115	99
Att ⁸	CC 170	AJ441003, Antarctic bacterium R-9112	99
Bac ⁹	CC 61	AJ557888, <i>Flavobacterium micromati</i> strain LMG 21919	99
	LH83	AY581115, <i>Flavobacterium segetis</i> strain AT1048	100
	CC190	FSU85888, <i>Flavobacterium</i> sp. A265	98
	INI159	DQ889723, <i>Pedobacter</i> sp. DS-57	94
	CC212	DQ112353, <i>Pedobacter roseus</i> strain CL-GP80	98
	CC11	AY536547, <i>Chryseobacterium</i> sp. SW1.8	97
	LH135	AY145539, <i>Flavobacteriales</i> bacterium CF-1	97
	INI49	AF468434, Arctic sea ice bacterium ARK10287	99
	INI44	AJ441000, Antarctic bacterium R-9003	99
	INI164	AF468425, Arctic sea ice bacterium ARK10164	98
NI ¹⁰	INI31	EF111146, Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium	97
	LH1	AB240509, Uncultured bacterium clone SRRB35	98
	LH141	AJ786785, Unidentified bacterium, isolate R-20818	94
	LH128	DQ791390, Uncultured bacterium clone TBc-14	100
	CC 31	DQ521501, Uncultured bacterium clone ANTLV1_H10	95
	CC 187	DQ158116, Uncultured bacterium clone 561	98
	CC188	DQ521485, Uncultured bacterium clone ANTLV1_D07	99
1) Rappresentante Identificato		6) β -Proteobatteri	
2) Ceppo filogeneticamente più vicino		7) γ -Proteobatteri	
3) Accession Number		8) Attinobatteri	
4) Percentuale di omologia del 16S rDNA		9) <i>Bacteroidetes</i>	
5) α -Proteobatteri		10) Non Identificati	

Caratterizzazione fenotipica. Le indagini fenotipiche (Tabella 6) hanno messo in evidenza la predominanza di ceppi Gram-negativi, pigmentati (nei due laghi CC e LH) e di forma bastoncellare.

	Tabella 6: Caratterizzazione fenotipica.		
	% ceppi con risposte positive		
	CC	INI	LH
Gram -	86	97	100
Gram +	14	3	0
Motilità	38	57	6
Pigmento	66	28	79
Ossidasi	59	80	67
Catalasi	34	73	36
Idrolisi della chitina	2	1	9
Idrolisi dell'agar	24	30	3
Idrolisi dell'amido	21	70	0
Idrolisi del tween 80	29	55	27
Sensibilità alla penicillina	72	18	84
Sensibilità alla polimixina	68	100	90
Sensibilità all'O/129	61	5	74
Sensibilità all'acido nalidixico	79	76	100
Sensibilità alla tobramicina	100	93	100
Sensibilità alla tetraciclina	100	100	100
Sensibilità all'ampicillina	76	37	94
Sensibilità al cloramfenicolo	75	49	94
Crescita con NaCl 0%	93	96	100
Crescita con NaCl 0.5%	92	99	97
Crescita con NaCl 1%	91	100	42
Crescita con NaCl 2%	63	83	85
Crescita con NaCl 3%	62	79	18
Crescita con NaCl 4%	62	73	18
Crescita a pH 4	22	79	6
Crescita a pH 5	91	94	85
Crescita a pH 6	99	96	97
Crescita a pH 7	99	96	97
Crescita a pH 8	100	100	100
Crescita a pH 9	90	94	97
Crescita a 4°C	100	100	100
Crescita a 15°C	100	100	100
Crescita a 20°C	87	96	88
Crescita a 25°C	44	91	27
Crescita a 30°C	19	73	24
Crescita a 37°C	0	60	15

Si tratta prevalentemente di organismi psicrotrofi (range ottimale di crescita 4° – 15°C); nessuno dei ceppi isolati dal lago CC si è dimostrato capace di crescere a 37°C. La maggior parte di essi è risultata ossidasi e catalasi positiva e in grado di crescere in un ampio range di pH e concentrazione salina: il 73% dei ceppi isolati da INI-1 è stato in grado di crescere con 4% di concentrazione di NaCl, contro solo il 18% dei ceppi di LH. Pochi i ceppi chitinolitici, agarolitici e amilolitici (tranne nel lago INI-1, dove questi ultimi hanno rappresentato il 70% dei ceppi isolati). Un'elevata percentuale (93-100%) degli isolati è risultata sensibile agli antibiotici tobramicina e tetraciclina.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I tre laghi presi in esame in questo studio sono apparsi significativamente differenti tra loro sia nelle caratteristiche fisico-chimiche che da un punto di vista microbiologico. Nel lago costiero INI-1, risultato il più salato, l'abbondanza totale di cellule batteriche è risultata leggermente inferiore rispetto a quella degli altri due, tuttavia i ceppi hanno mostrato una coltivabilità quasi doppia (1,38%), suggerendo che il batterioplancton fosse metabolicamente più attivo. Tale dato viene anche confermato dall'elevata percentuale di cellule ibridate con la sonda EUB Mix. È noto, infatti, che solo le cellule con un elevato contenuto ribosomiale, dunque metabolicamente attive, riescono ad essere visualizzate mediante la tecnica FISH [3]. Il buon stato fisiologico dei batteri del lago INI-1 può essere spiegato da apporti di nutrienti dalla vicina costa, ma anche dalla vasta colonia di pinguini Adelia presente nelle vicinanze. Se i dati di abbondanza totale sono comunque in linea con quanto riportato da Camacho [4], quelli della percentuale di ibridazione con la sonda EUB Mix, compresi fra il 68,9 di INI-1 e il 41,4 di LH, risultano comparabili con i valori riportati da Bouvier e del Giorgio [3]. Sempre gli stessi autori, esaminando i risultati di numerosi lavori, riportano che nella maggior parte dei laghi il gruppo filogenetico dominante è rappresentato dai β -Proteobatteri; solo in 6 laghi, sui 35 studiati, il gruppo dominante era, al contrario, quello dei CFB, come osservato nei tre laghi antartici presi in esame in questo lavoro. Anche Pearce et al. [13] hanno riscontrato un'abbondanza elevata di β -Proteobatteri, seguiti dai CFB, nel lago antartico costiero Sombre Lake. Nel lago INI-1 la percentuale di cellule ibridate con la sonda CF319a (per CFB) è stata molto elevata (25,1%) e ciò è da mettere in relazione con l'influenza dell'ambiente marino; Pearce et al. nel 2003 [13] riportano, infatti, che i CFB sono il gruppo più abbondante negli ecosistemi marini antartici. Infine, è da sottolineare come la percentuale di cellule ibridate con la sonda per gli Archei sia risultata in linea con i dati riportati da Bouvier e del Giorgio nel 2003 [3]. Analizzando la frazione coltivabile del batterioplancton si può notare come anche in questo caso i laghi CC e LH siano comparabili tra loro ma non con INI-1. In particolare, sono state identificate 39 differenti OTU, corrispondenti ad altrettante specie batteriche (principalmente γ -Proteobatteri e *Bacteroidetes*). Se il numero di OTU è risultato simile a quello riportato da Pearce et al. [13], i gruppi filogenetici dominanti sono apparsi diversi. I generi batterici più rappresentati, isolati nei tre laghi in esame, sono risultati *Psychrobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Flavobacterium* spp.: gli ultimi due sono stati anche individuati da Pearce et al. [13] in altri laghi antartici. Come riportato dagli stessi autori, i batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Flavobacterium* sono caratterizzati dalla possibilità di utilizzare un ampio range di composti organici, inclusi i polisaccaridi complessi, sono coinvolti nella

mineralizzazione della sostanza organica, non richiedono fattori specifici di crescita e sono aerobici o anaerobici facoltativi. La presenza di questi ceppi, fra i quali si ritrovano batteri del ciclo dell'azoto, può suggerire quindi che questi laghi, così come quello descritto da Pearce et al. [13], siano controllati dalla biodisponibilità di azoto e di fosforo.

La capacità dei ceppi isolati di crescere in ampi intervalli di temperatura, salinità e pH è indice di un adattamento alle estreme condizioni di vita che caratterizzano gli ambienti presi in esame. È da sottolineare anche l'importante presenza di ceppi pigmentati che potrebbero possedere una forte resistenza ai raggi UV, particolarmente intensi a queste latitudini. Nelle strategie adattative di questa comunità batterica risiede il suo elevato potenziale biotecnologico, inteso come capacità di produrre nuovi biometaboliti attivi (esopolisaccaridi, antibiotici e antitumorali) ed enzimi psicofili da inserire in processi industriali, specie in campo farmaceutico o alimentare. In questa ottica, i risultati ottenuti in questo studio, combinando tecniche sia dipendenti che indipendenti dalla coltivazione, forniscono nuove conoscenze sulla biodiversità della comunità batterioplanctonica dei laghi antartici.

I laghi antartici, veri laboratori a cielo aperto per lo studio dei processi evolutivi dei microrganismi, sono ecosistemi delicatissimi che rispondono rapidamente a perturbazioni climatiche locali e globali anche lievi [10]. In questo tipo di ambienti risulta meno problematico testare certe ipotesi come quelle del "tutto è dovunque, l'ambiente seleziona" grazie allo studio comparativo della filogenesi dei differenti organismi [7]. Questa sensibilità è dovuta al fatto che i principali processi biologici, ecologici e geomorfologici sono regolati da un susseguirsi di cicli di congelamento-scioglimento. Nella parte continentale dell'Antartide, dove l'impatto umano "diretto" è praticamente nullo, i laghi sono considerati come il migliore e più sicuro indicatore dei mutamenti climatici ed ambientali dovuti al riscaldamento globale [2], [10].

6. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Prof. Bargagli e la Dott.ssa Borghini dell'Università di Siena per aver fornito i dati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche dei laghi e la Dott.ssa Agnorelli per aver condiviso il mezzo aereo per effettuare i campionamenti. Si ringrazia, inoltre, tutto il personale tecnico-logistico della Base Italiana "Mario Zucchelli", ed in particolare i validissimi piloti, per l'assistenza durante i campionamenti. Questo lavoro è stato finanziato dal Programma Nazionale di Ricerche in Antartide progetto PNRA 2004/1.6.

Riferimenti bibliografici

- [1] C. Baroni, *Antartide, terra di scienza e riserva naturale* (Ed. Terra Antartica Publication, 2001).
- [2] F. Borghini and R. Bargagli, "A preliminary survey on the biogeochemical cycle of C,N and S in lakes of northern Victoria Land", *Polarnet Tech. Rep.*, **1**, 1-5, 2005.
- [3] T. Bouvier and A. del Giorgio, "Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**, 3-15, 2003.
- [4] A. Camacho, "Planktonic microbial assemblages and the potential effect of metazooplankton predation on the food web of lakes from the maritime Antarctica and sub-Antarctic islands", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **5**, 176-185, 2006.
- [5] K. Egli, F. Bosshard, C. Werlen, P. Lais, H. Siegrist, A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer, "Microbial composition and structure of rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon", *Microb. Ecol.*, **45**, 419-432, 2003.

- [6] F. O. Glockner, B. M. Fuchs, and R. Amann "Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on Fluorescence In Situ Hybridization", *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3721-3726, 1999.
- [7] J. Laybourn-Parry and D. A. Pearce "The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models of evolution", *Phil. Trans. R. Soc. B*, **362**, 1-17, 2007.
- [8] J. Laybourn-Parry, M. R. James, D. M. McKnight, J. Prisco, S. Spaulding, and R. Sheil "The microbial plankton of Lake Fryxell, Southern Victoria Land, Antarctica during the summers of 1992 and 1994", *Polar Biol.*, **17**, 5461, 1997.
- [9] A. Lo Giudice, L. Michaud, D. De Pascale, M. De Domenico, G. Di Prisco, R. Fani, and V. Bruni "Lipolytic activity of antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea)", *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 103-1048, 2006.
- [10] W. B. Lyons, J. Laybourn-Parry, and K. A. Welch, "Antarctic lake systems and climate change" in *In Trends in Antarctic terrestrial and limnetic systems* (Ed. Heidelberg, Germany, Springer, 2007), Vol. 13, pp. 273-295.
- [11] H. Meier, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content", *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 186-196, 1999.
- [12] L. Michaud, F. Di Cello, M. Brillì, R. Fani, A. Lo Giudice, and V. Bruni, "Biodiversity of cultivable Antarctic psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea)", *FEMS Microbiol. Lett.*, **230**, 63-71, 2004.
- [13] D. A. Pearce, C. J. van der Gast, B. Lawley, and J. C. Ellis-Evans, "Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**, 59-70, 2003.
- [14] K. G. Porter and Y. S. Feig, "The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora", *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948, 1980.
- [15] C. Roller, M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA- targeted oligonucleotides", *Microbiology*, **140**, 2849-2858, 1994.
- [16] D. A. Stahl and R. Amann, "Development and application of nucleic acid probes", in *In Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England., pp. 205-248, 1991

Luigi Michaud, Angelina Lo Giudice, Consolazione Caruso, Santina Mangano, Vivia Bruni
Università di Messina
Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina
Salita Sperone 31
98166 Messina, Italy

* **E-mail:** lmichaud@unime.it;

Presented: November 29, 2007
Published online: October 8, 2008