

DR/86/28

1062332

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Biologia

XVI CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
METODOLOGIE DI BIOMONITORAGGIO DELL'ALTERAZIONE AMBIENTALE

BATTERI MARINI NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

DOTTORANDO

DR. BRUNO CATALETTO '59

es

COORDINATORE DEL COLLEGIO DOCENTI

CHIAR.MO PROF. ENRICO FEOLI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

RELATORE

CHIAR.MO PROF. SERENA FONDA UMANI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

CORRELATORE

CHIAR.MO PROF. FAROOQ AZAM

SCRIPPS INSTITUTION OF OCEANOGRAPHY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

XVI CICLO DEL

DOTTORATO DI RICERCA IN

METODOLOGIE DI BIOMONITORAGGIO DELL'ALTERAZIONE AMBIENTALE

BATTERI MARINI NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

DOTTORANDO

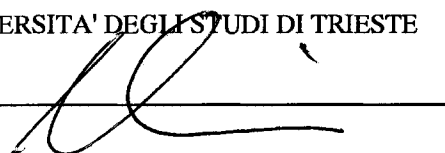
DR. BRUNO CATALETTO

COORDINATORE DEL COLLEGIO DEI DOCENTI

CHIAR.MO PROF. ENRICO FEOLI

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

FIRMA:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'E. Feoli', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

RELATORE

CHIAR.MO PROF. SERENA FONDA UMANI

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

CORRELATORE

CHIAR.MO PROF. FAROOQ AZAM

SCRIPPS INSTITUTION OF OCEANOGRAPHY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO

A Cris e a Francesco

FOLLOW THAT DREAM

If your heart is restless from waiting too long
When you're tired and weary, and you can't go on
Well if a distant dream is a callin' you
Then there's just one thing that you can do

Yeah, you gotta follow that dream wherever that dream
may lead you
You gotta follow that dream to find the love you need

Now baby, I walk in dreams
And I talk in dreams
I need someone with a love I can trust
And together we'll search for the things that come to us
In dreams, baby in dreams

And I'm gonna follow that dream wherever that dream
may lead me
I'm gonna follow that dream to find the love I need

Now every man has the right to live
The right to a chance to give what he has to give
The right to fight for the things he believes
For the things that come to him in dreams

Baby in dreams, I walk in dreams
I talk in dreams
I live in dreams

Bruce Springsteen

Indice

| | |
|---|---------|
| Introduzione | Pag. 1 |
| Capitolo 1 Analisi della comunità batterica presente nella colonna d'acqua e negli aggregati mucillaginosi | Pag. 17 |
| 1.1 Introduzione | Pag. 17 |
| 1.2 Materiali e metodi | Pag. 20 |
| 1.3 Discussione | Pag. 29 |
| | |
| Capitolo 2 Isolamento e caratterizzazione filogenetica di organismi batterici presenti negli aggregati mucillaginosi | Pag. 31 |
| 2.1 Introduzione | Pag. 31 |
| 2.2 Materiali e metodi | Pag. 33 |
| 2.3 Risultati | Pag. 41 |
| 2.4 Discussione | Pag. 46 |
| | |
| Capitolo 3 Analisi sperimentali di alcuni ceppi batterici isolati dagli aggregati mucillaginosi | Pag. 51 |
| 3.1 Introduzione | Pag. 51 |
| 3.2 Condizioni sperimentali | Pag. 52 |
| 3.3 Risultati | Pag. 53 |
| 3.4 Discussione | Pag. 54 |

| | | |
|-------------------|---|---------|
| Capitolo 4 | Analisi di un possibile meccanismo di Quorum Sensing in alcuni ceppi batterici isolati dagli aggregati mucilluginosi | Pag. 56 |
| 4.1 | Introduzione | Pag. 56 |
| 4.2 | Materiali e metodi | Pag. 59 |
| 4.3 | Risultati | Pag. 61 |
| 4.4 | Discussione | Pag. 62 |
| Capitolo 5 | Conclusioni | Pag. 64 |
| Capitolo 6 | Bibliografia | Pag. 66 |

Introduzione

Il Mare Adriatico, nonostante rappresenti soltanto il 5% dell'intera superficie del Mar Mediterraneo, riceve i più importanti apporti d'acqua dolce di tutto il bacino. Il solo contributo del fiume Po costituisce, infatti, l'11% dell'acqua dolce che viene sversata nel Mare Mediterraneo (UNESCO, 1978). La notevole quantità di acqua fluviale che affinisce al bacino Adriatico ne aumenta marcatamente la produttività rispetto alla condizione di oligotrofia tipica del Mar Mediterraneo (Pagnotta et al., 1999).

L'Alto Adriatico, in particolare, è stato spesso considerato un bacino ad elevata trofia. In realtà può essere considerata eutrofica la sola fascia costiera occidentale, area in cui resta confinata, per gran parte dell'anno, l'acqua dolce fluviale ed i nutrienti in essa contenuti (Fonda Umani et al., 1992; Fonda Umani, 1996). Soprattutto d'inverno, la formazione di uno stabile sistema frontale (Franco & Michelato, 1992) e l'instaurarsi contemporaneo di una circolazione ciclonica determinano la formazione di una corrente costiera che provoca l'esportazione d'acqua dolce alla parte centrale e meridionale del Mar Adriatico (Revelante & Gilmartin, 1977; Artegiani et al., 1993). In primavera, in estate e, in misura minore, in autunno, la circolazione a vortice ciclonico e la notevole stratificazione della colonna d'acqua (Artegiani et al., 1997) permettono che lingue d'acqua dolce (blob) si stacchino dalla zona frontale e scorrano in superficie verso il centro del bacino. Gli effetti fluviali interessano, in questo caso, buona parte dell'Adriatico settentrionale determinandone, una maggiore produttività (Harding et al., 1999).

La sostanza organica in mare è formata da un complesso insieme di composti del carbonio, dell'azoto e del fosforo distinti per dimensione e complessità in POM

(Particulate Organic Matter) e DOM (Dissolved Organic Matter). La distinzione tra porzione particellata e porzione disciolta è di tipo squisitamente operativa ed è in relazione alla porosità del filtro utilizzato per separare fisicamente le due fasi. I protocolli classici prevedono l'uso di membrane in fibra di vetro (Whatman GF/F) con porosità pari a 0.7-0.8 μm , ma recentemente vengono utilizzati filtri da 0.45 μm e 0.2 μm . Il POM è il materiale che viene trattenuto sul filtro, mentre il DOM è il materiale filtrato (Wells, 1998). Mediante microscopia elettronica, contatori di particelle, tecniche di colorazione istologica, metodiche di ultrafiltrazione, ecc. la sostanza organica è stata suddivisa in numerose classi dimensionali (Koike et al., 1990; Wells & Goldberg, 1991; Alldredge et al., 1993; Long & Azam, 1996; Chin et al., 1998) comprese tra il DOM in fase solubile (molecole a più basso peso molecolare) e il POM; di natura principalmente detritale, sono rimaste a lungo sconosciute per le loro piccole dimensioni, consistenza e trasparenza. Una visione più realistica, quindi, sostituisce alla tradizionale dicotomia tra DOM e POM il concetto di un continuum dimensionale di materia organica (Azam, 1998): monomeri, polimeri, colloidali, particelle submicrometriche, microaggregati, TEP (Transparent Exopolymeric Particles) e CSP (Coomassie Staining Particles) costituiscono una sorta di "materia grigia" marina: l'acqua di mare può essere descritta come una matrice polimerica avente le proprietà di un gel ("idrogel"): in questa rete molecolare restano intrappolate particelle, cellule fitoplanctoniche, neve marina (aggregati amorfi di materiale organico), detrito, ecc. e su questi micro "hot spots" suprapolimerici si formano grandi popolamenti batterici (Azam 1998; Azam et al., 1999) Fig. 1.

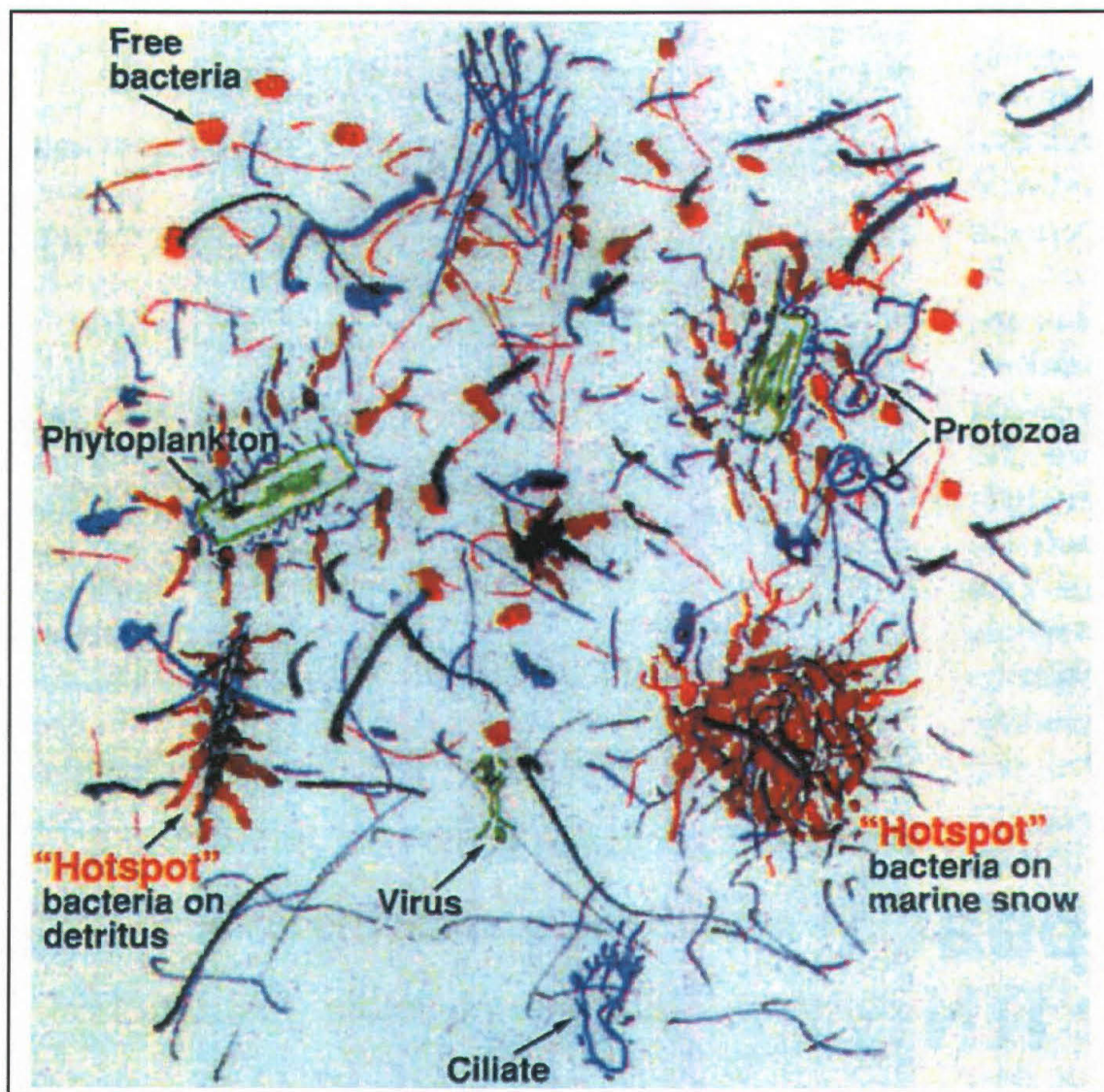


Fig 1 L'acqua di mare è una matrice polimerica con le proprietà di un gel (idrogel). I batteri (rosso) formano grandi popolamenti in corrispondenza di "hotspots": fitoplancton (verde), neve marina e detrito (nero) (Riprodotta da Azam, 1998).

L'elemento preponderante in tutte le frazioni dimensionali del DOM è rappresentato dal carbonio che costituisce più del 50% in peso dell'intera sostanza organica. Nell'ecosistema marino, attraverso intricate trame spazio-temporali, risultato dell'interazione dei biota con la complessa riserva di sostanza organica e inorganica, il carbonio fluisce lungo le reti trofiche, viene immagazzinato nei sedimenti o liberato

nell'atmosfera. Storicamente si riteneva che il carbonio organico in mare rimanesse soprattutto in fase particellata (Steele, 1974) (POC, Particulate Organic Carbon), di natura principalmente detritica, essendo costituita da organismi morti, gusci ed esoscheletri di specie planctoniche, fecal pellets, risospensione di sedimento, aggregati formati per flocculazione di DOC, ecc. e in minor misura da organismi viventi (fitoplancton, zooplancton, batteri, ecc.). Si pensava che soltanto una piccola parte del carbonio organico venisse liberato in forma disciolta (DOC, Dissolved Organic Carbon) per essudazione di microalghe (Williams, 1990; Alldredge et al., 1993), perdita di materiale cellulare durante i processi di predazione da parte dei consumatori carnivori ("sloppy feeding") (Eppley et al., 1981), lisi cellulare spontanea o mediata da infezione virale (Bratbak et al., 1992; Fuhrman & Suttle, 1993; Fuhrman & Noble, 1995), degradazione di organismi morti o fecal pellets (Honjio & Roman, 1978), processi di escrezione, ecc. In realtà la fase disciolta costituisce il 97% del carbonio organico totale nella colonna d'acqua oceanica ed è una delle tre maggiori riserve di carbonio organico presente sul nostro pianeta unitamente al carbonio immagazzinato nelle piante e nei suoli (Hedges, 1992). Il DOC, quindi, è un componente importante nel ciclo del carbonio e nella sua ripartizione tra atmosfera, idrosfera, litosfera e biosfera (Fig. 2).

Il DOC rappresenta il substrato ideale per lo sviluppo del popolamento batterico. I batteri, infatti, la cui abbondanza in mare è stata a lungo fortemente sottostimata (Steele, 1974), utilizzano direttamente le molecole inferiori a 600 Da e producono enzimi in grado di degradare le specie chimiche più complesse. La loro importanza nel ciclo del carbonio risulta pertanto notevole. In media, sembra utilizzino circa metà del carbonio organico

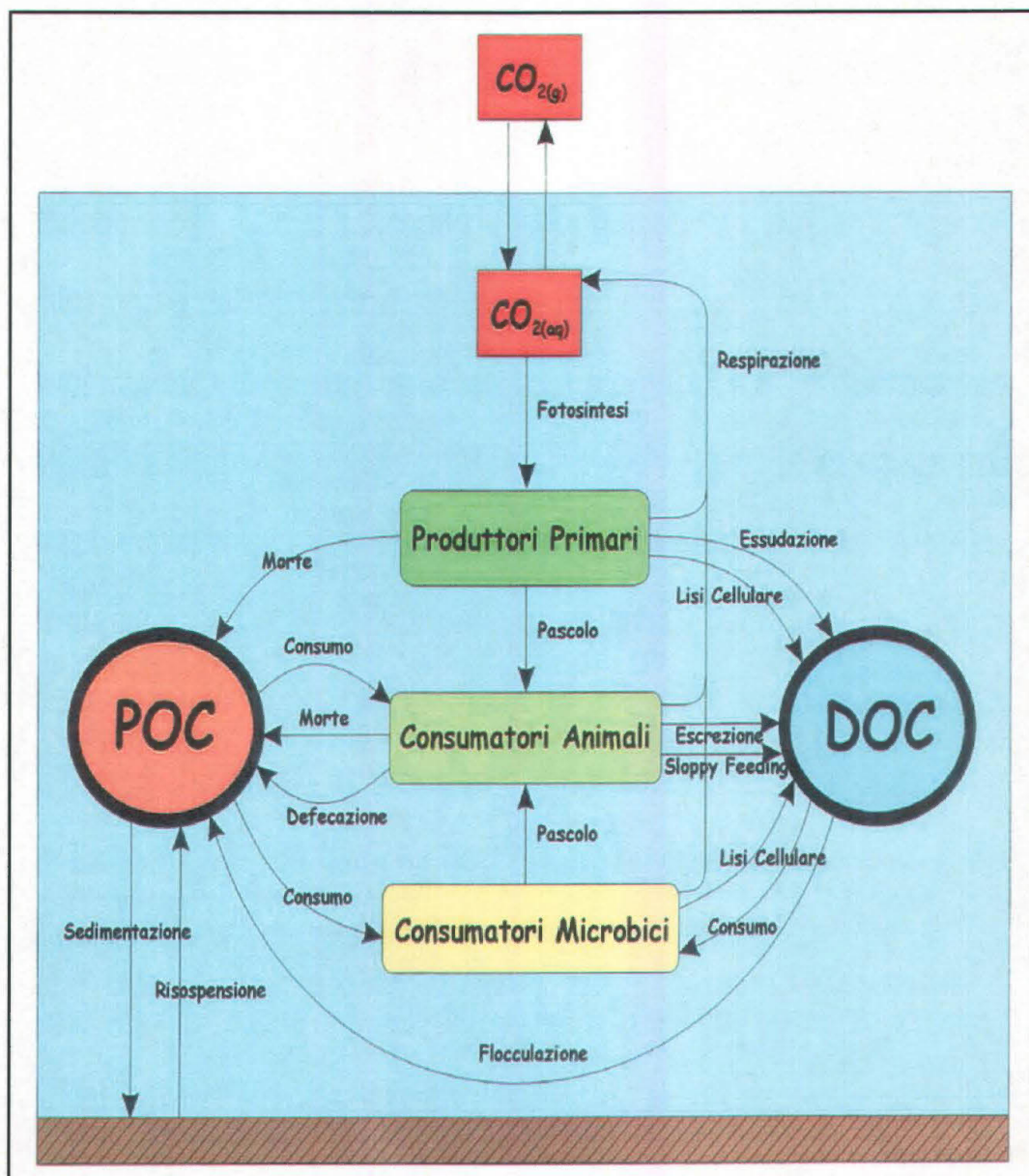


Fig. 2 Ciclo del carbonio nell'ecosistema marino.

durante i processi fotosintetici (Hagström et al., 1979; Fuhrman & Azam, 1982; Azam et al., 1983; Cole et al., 1988). Nella fitta rete trofica che caratterizza l'ecosistema marino è possibile identificare tre vie principali di trasferimento della sostanza organica: nella prima, definita "rete trofica microbica" (Rassoulzadegan, 1993), la sostanza organica

prodotta dagli organismi autotrofi più piccoli del plancton (picoplancton e nanoplancton) (Sieburth et al., 1978) viene utilizzata dai batteri eterotrofi nella forma disciolta e dal nanoplancton eterotrofo nella forma particellata attraverso la predazione del nanoplancton sul picoplancton sia autotrofo che eterotrofo. Gli organismi di taglia maggiore (microzooplancton), che si nutrono di picoplancton e nanoplancton, consentono la fase successiva del trasferimento. Alternativamente, il carbonio organico dal microfitoplancton viene trasferito al mesozooplancton e successivamente a livelli superiori lungo la “rete trofica classica”. L’anello di congiunzione tra i due sistemi è dato dal processo di predazione del mesozooplancton sul microzooplancton. Tutti gli organismi marini respirano, restituendo CO₂ all’ambiente e producono DOC, ma soltanto i batteri eterotrofi sono capaci di produrre propria biomassa utilizzando l’abbondante riserva di carbonio organico disciolto. Entrambe le reti trofiche descritte si fondano sul processo fotosintetico, ma all’interno della rete trofica microbica si sviluppa un “circuitto microbico” (Azam et al., 1983) nel quale la sostanza organica viene trasferita dalla fase disciolta al nanoplancton ed al microzooplancton attraverso i batteri eterotrofi. Il circuitto lavora a diverse velocità in relazione all’efficienza con cui i batteri eterotrofi sono in grado di utilizzare il DOC: maggiore è la loro capacità di metabolizzare la sostanza disciolta, più elevato è il dinamismo all’interno del circuitto e minori sono i ricambi del popolamento. L’energia che fluisce verso i livelli trofici più elevati potrebbe, pertanto, non aumentare, ma diminuirebbe invece considerevolmente il DOC. Una scarsa efficienza nell’utilizzo del DOC si traduce, quindi, in un accumulo dello stesso (Thingstad et al., 1997) e la diminuzione della velocità nel circuitto favorisce il flusso di energia lungo il percorso della rete trofica microbica e quindi verso la catena trofica classica. La rete trofica microbica, la

rete trofica classica ed il circuito microbico sono presenti contemporaneamente nell'ecosistema marino ed il complesso di questi tre sistemi viene definito dai biologi marini "catena trofica mistivora" (Fonda Umani, 2000) (Fig. 3).

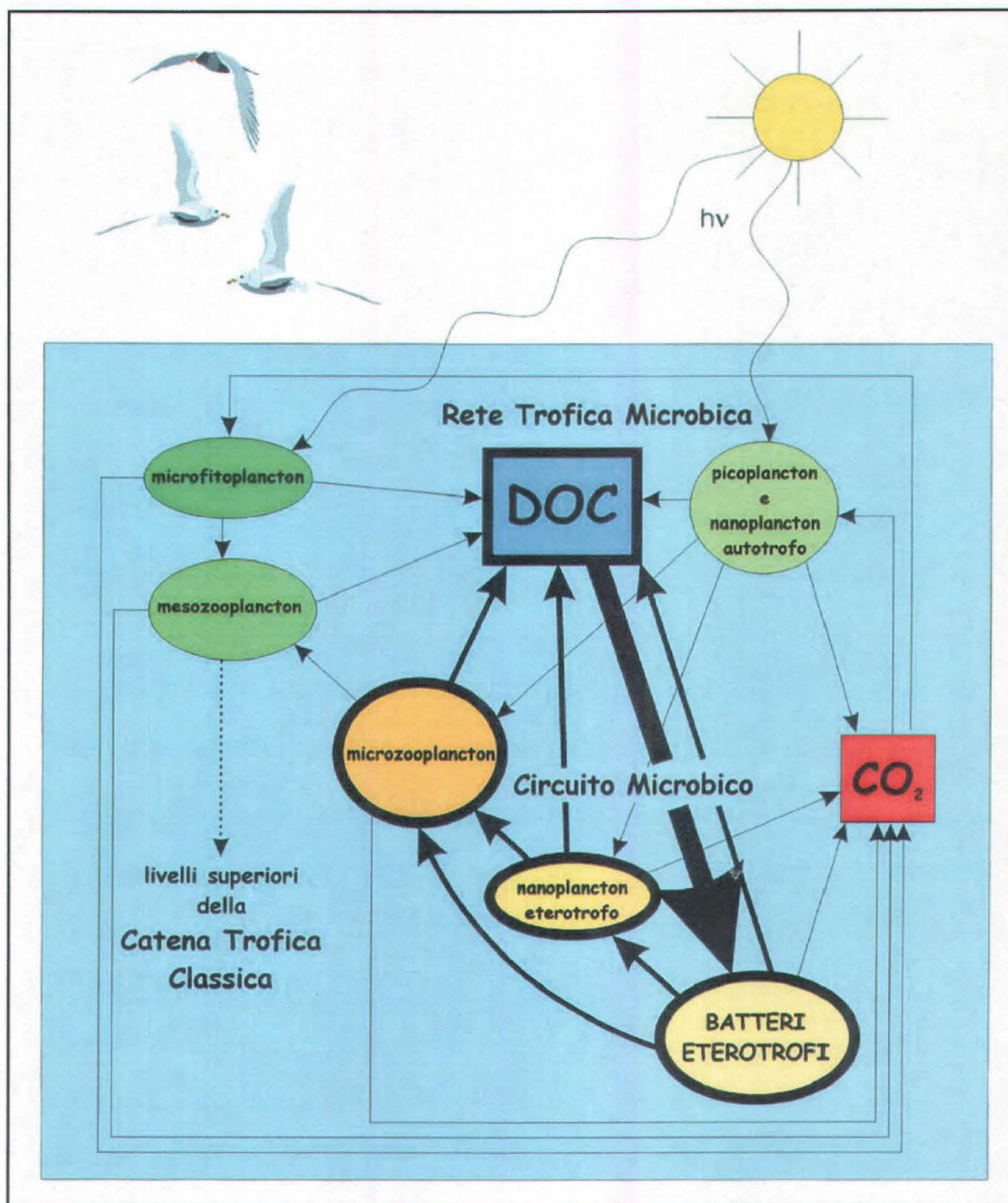


Fig. 3 Catena trofica mistivora

Il prevalere di una forma di trasferimento di energia sull'altra dipende dalle particolari condizioni chimiche, fisiche e biologiche che caratterizzano l'ambiente marino.

La formazione di mucillagini è nota, nel bacino Adriatico settentrionale, dal 1729 ed esistono segnalazioni documentate risalenti alla fine dell'Ottocento. Il fenomeno si è verificato numerose volte nei primi anni del ventesimo secolo (1903, 1905, 1920, 1930, 1949, 1951) (Fonda Umani et al., 1989) e, a partire dalla fine degli anni '80 (1988, 1989, 1991, 1997) si è ripresentato con un certa frequenza a scala di bacino (Degobbis et al., 1995, 1999; Cataletto et al., 1996; Long et al., 1998; Azam et al., 1999), causando rilevanti danni economici alle attività di pesca e di turismo rivierasco.

Gli aggregati filamentosi compaiono al livello del picnoclino e, sotto forma di strie o nuvole di dimensioni anche superiori a 3x7 m, tendono a flottare verticalmente lungo la colonna d'acqua (Fig. 4).



Fig 4. Aggregati mucilluginosi

Questo moto verticale consente alla massa mucillaginosa, caratterizzata da una notevole adesività, di inglobare organismi planctonici, bentonici e detrito. Poiché il periodo estivo è caratterizzato da una circolazione a vortice ciclonico, le mucillagini restano segregate all'interno del bacino settentrionale e questo determina una loro progressiva crescita con un conseguente invecchiamento (Degobbis et al., 1995). La disaggregazione per effetto meccanico del moto ondoso ed il trasporto ad opera dei venti e delle correnti determinano la loro presenza in aree costiere ove tendono ad addensare in superficie, da cui il termine "mare sporco". La recessione del fenomeno avviene generalmente alla fine dell'estate quando la diminuzione della stratificazione termica e l'aumento dei venti del quadrante settentrionale comporta un mescolamento della colonna d'acqua che contribuisce alla disaggregazione degli ammassi mucosi ed al loro trasferimento negli strati più profondi. La corrente discendente determina inoltre un allontanamento del materiale dal bacino settentrionale.

La presenza massiccia di macroaggregazioni mucillaginose ha caratterizzato anche le estati del 2000 e del 2002, mentre nel 2001 il fenomeno si è presentato con minore intensità sia a livello spaziale che temporale. Anche se la formazione di aggregati mucilluginosi rappresenta un evento naturale che si verifica in molte regioni mediterranee (Rinaldi et al., 1995), l'intensità, la durata e l'estensione del fenomeno risultano particolarmente marcate nel Nord Adriatico. Un complesso intreccio di fattori idrologici, oceanografici, meteorologici e biologici, caratteristici del bacino settentrionale, sembrano favorire la comparsa e la permanenza di aggregati di dimensioni notevoli. Tutte le ipotesi che tentano di dare una spiegazione all'invasione massiva di centinaia di chilometri quadrati di superficie marina da parte di enormi masse mucillaginose, esplicitamente o

implicitamente, ritengono necessaria per l'aggregazione la presenza in mare di materiale organico.

Poiché l'analisi chimica aveva evidenziato una prevalenza di galattosio e glucosio nella matrice mucosa (Marchetti et al., 1989; De Angelis et al., 1993), monosaccaride che caratterizza gli essudati algali, le microalghe furono inizialmente ritenute le uniche responsabili del fenomeno. La liberazione extracellulare di prodotti organici è da considerarsi un processo fisiologico normale, entro certi limiti, per le cellule fitoplanctoniche: il meccanismo di "overflow" ha luogo quando fotoassimilazione, crescita e divisione sono sbilanciate (Fogg, 1983; Smith & Underwood, 2000). In condizioni ambientali particolari, tuttavia, questo rilascio viene stimolato. Secondo le prime ipotesi, la formazione di aggregati era dovuta, infatti, a fioriture anomale di diatomee bentoniche (Forti, 1906) e planctoniche (Degobbis et al., 1995; Monti et al., 1995; Malej & Mozetic, 1996; Mozetic et al., 1997), caratterizzate da iperproduzione di essudati a causa delle condizioni di fosforo limitazione del bacino (Schuster & Herndl, 1995). Dal 1985, infatti, probabilmente come conseguenza prima della riduzione del contenuto e poi dell'eliminazione totale dei polifosfati nei detersivi, si è osservata una drastica riduzione dell'apporto fluviale di ortofosfato (Degobbis et al., 1999) ed il rapporto tra l'azoto ed il fosforo inorganici disciolti nel bacino Nord Adriatico è, pertanto, aumentato, superando il valore stabilito dal rapporto stechiometrico N:P=16:1 di Redfield (1963) ritenuto l'optimum per la crescita del fitoplancton (Burba et al., 1994; Rinaldi et al., 1998; Degobbis et al., 1999). Uno squilibrio nel rapporto N:P costituisce un fattore limitante la produzione primaria e rappresenta un motivo di stress per le cellule algali: quelle che si trovano in fase stazionaria di crescita aumentano il rilascio di essudati, costituiti

principalmente da carbonio organico in forma di polisaccaridi (Mykkestad, 1977; Jensen, 1984). In condizioni ambientali favorevoli, come in presenza di uno scarso mescolamento orizzontale e verticale delle masse d'acqua, di un'elevata irradianza e d'una sufficiente disponibilità di sali nutritivi, la comunità fitoplanctonica organica notevoli quantità di carbonio aumentando la propria biomassa. Il processo richiede un notevole utilizzo di fosforo inorganico che viene così sottratto dalla già ridotta riserva presente in mare. Quando le cellule non riescono più ad accoppiare l'elevato tasso fotosintetico con l'aumento della propria biomassa per la mancanza di un composto essenziale nella sintesi di acidi nucleici, come l'ortofosfato, essudano il materiale organico (Fogg, 1995).

L'ipotesi che il materiale che va incontro ai fenomeni di aggregazione derivi direttamente dalle microalghe ha focalizzato l'attenzione dei ricercatori sulla composizione e l'abbondanza delle comunità microfitoplanctoniche, sulla fisiologia di alcune diatomee che si ritenevano maggiormente coinvolte nel processo come *Cylindrotheca closterium* e *Pseudonitzschia delicatissima* (Welker & Monti, 1994; Monti et al., 1995) e sui possibili effetti della fosforo limitazione sui processi di essudazione. Le conoscenze acquisite suggeriscono, però, che non è più necessaria un'iperproduzione di essudati da parte delle diatomee per dare una spiegazione al fenomeno mucillaginoso: soltanto la metà del carbonio organico presente costantemente in mare in forma disciolta (circa 30 gC/m²) sarebbe sufficiente a ricoprire l'intero Adriatico con uno strato di mucillagine di 5 cm (Azam et al., 1999).

All'ipotesi quantitativa si sostituisce, quindi, quella qualitativa, che ipotizza una modificazione nella composizione molecolare della sostanza organica che porta alla formazione di polimeri rigidi e complessi con una più elevata capacità di aggregazione.

Poiché i batteri rappresentano i principali organismi in grado di utilizzare e rielaborare la sostanza organica, il loro ruolo nel processo di produzione e aggregazione del materiale organico disciolto è stato studiato con attenzione (Azam et al., 1999). I batteri, infatti, sembrano fortemente coinvolti nella formazione di polisaccaridi a lunga vita sia attraverso modifiche strutturali delle molecole presenti nell'ambiente, sia attraverso la produzione e liberazione di proprie molecole complesse.

La capacità dei batteri di utilizzare la sostanza organica presente in mare dipende dalle sue caratteristiche chimiche. Le specie chimiche a basso peso molecolare (inferiore a 600 Da) (Arnosti, 1994) come monosaccaridi, amminoacidi, nucleotidi, ecc. vengono immediatamente assorbite dai batteri attraverso la superficie cellulare mediante specifiche permeasi di membrana (Nissen et al., 1984; Munster & Chróst, 1990; Hoppe, 1991). Tuttavia, una considerevole frazione del DOC negli ambienti acquatici naturali è costituita da sostanze polimeriche, come polisaccaridi, proteine, acidi nucleici e lipidi, non utilizzabili direttamente dai batteri. I composti a più elevato peso molecolare ed i colloidi devono sottostare ad una preventiva idrolisi operata da enzimi prodotti dai batteri stessi (Chróst, 1990; Hoppe et al., 1988) e liberati all'esterno della cellula. La sintesi e la liberazione degli enzimi è accoppiata ad un sistema di trasporto attivo che recupera i prodotti dell'idrolisi extracellulare, nonché ad un sistema enzimatico in grado di catabolizzarli (del Giorgio & Cole, 2000). Non tutte le molecole del DOC, tuttavia, sono prontamente utilizzabili dai batteri che operano una selezione non solo dimensionale, ma anche qualitativa sull'intera porzione disciolta: alla frazione biologicamente labile (Amon & Benner, 1996) si contrappone una frazione più resistente alla degradazione batterica e quindi biologicamente refrattaria (Søndergaard & Middelboe, 1995). Il DOC labile

rappresenta un quinto del totale e quindi soltanto una piccola parte di carbonio organico è rapidamente disponibile per la crescita batterica. Negli strati fotici la percentuale di DOC refrattario ammonta, invece, a circa il 70-80% del totale (Thingstad et al., 1997). Quest'ultima porzione tende ad accumularsi nella zona eufotica costituendo una importante riserva di carbonio organico nell'ecosistema marino. Le molecole che formano il DOC, infatti, tendono spontaneamente ad aggregare. Chin et al. (1998) hanno dimostrato, infatti, come in acqua di mare filtrata $0,22 \mu\text{m}$ i polimeri si assemblino spontaneamente a formare un gel. La forza motrice per l'aggregazione sembra sia il formarsi di interazioni ioniche tra molecole mediate da cationi bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}). La capacità di aggregazione aumenta con l'aumentare delle dimensioni del polimero, ma è anche funzione della composizione chimica del DOC e delle caratteristiche idrodinamiche e fisico-chimiche dell'ambiente marino (Kepkay, 1994). La porzione colloidale è quella capace di flocculare più rapidamente (McCarthy et al., 1996). La flocculazione spontanea può portare alla formazione di particelle e quindi al trasferimento del carbonio dalla fase disciolta alla fase particellata (Azam et al., 1999). Le particelle di maggiori dimensioni (TEP e CSP) possono, a loro volta, aggregare formando neve marina che per flocculazione ulteriore e sedimentazione ridistribuisce il carbonio organico al di sotto della zona fotica (Chin et al., 1998). E' quindi possibile immaginare il DOC e il POC in equilibrio dinamico: da un lato la formazione del POC avviene per aggregazione spontanea di DOC, dall'altro la degradazione del POC in DOC avviene per attività microbica. L'alterazione di questo equilibrio dinamico potrebbe essere la principale causa scatenante il fenomeno mucillagini.

Durante l'inverno il Nord Adriatico subisce un completo ricambio d'acqua e il DOC prodotto dal fitoplancton dalla primavera all'autunno non si accumula nel bacino. Il

Golfo di Trieste rappresenta la parte più settentrionale e orientale dell'Adriatico; ha, tuttavia, un ruolo fondamentale per l'idrologia dell'intero bacino, perché è la zona di formazione dell'acqua fredda e densa invernale che fluendo verso sud va a costituire l'acqua di fondo adriatica (Artegiani et al., 1997). In determinate condizioni meteorologiche sembra che questo ricambio d'acqua non avvenga o sia parziale (Hopkins, 1999). Inoltre una parte dell'acqua che esce dal sottobacino fluendo lungo la costa italiana rientra nell'Alto Adriatico mescolata alla LIW (Levantine Intermediate Water) per effetto del vortice ciclonico che si forma a livello di Medio Adriatico. Questi due fenomeni comportano sia il permanere che il rifluire di una parte del DOC prodotto dalla primavera all'autunno che si andrà a sommare a quello prodotto l'anno seguente. Questo riflusso incrementa la quantità totale di DOC, ma soprattutto ne aumenta l'età rendendolo sempre meno "digeribile" per i popolamenti batterici (Azam et al., 1999). L'elevata quantità ed il prolungato tempo di residenza del DOC refrattario lungo tutta la colonna d'acqua sopra il picnoclino ne favorisce la flocculazione. Quando il DOC colloidale raggiunge la concentrazione critica si ha una transizione di fase istantanea e su larga scala dalla forma dispersa alla forma di gel con formazione di macroaggregati (Zutic & Svetlicic, 2000).

Gli aggregati mucilluginosi sono densamente popolati da microrganismi che hanno una funzione chiave nella loro formazione e degradazione. La composizione dei macroaggregati, in termini di biomassa, riflette lo spettro compositivo della colonna d'acqua circostante. Sono presenti virus, batteri, microalghe, protozoi e zooplancton. Come ipotizzato da Fogg (1995), gli organismi inglobati nella massa mucilluginosa diventano progressivamente meno dipendenti dai processi che avvengono nella massa d'acqua circostante e la comunità del muco si autosostiene risultando capace di resistere alle

sollecitazioni esterne (Decho & Herndl, 1995). Il ruolo dei batteri eterotrofi è estremamente importante anche per la solubilizzazione degli aggregati, mediata dalle intense attività idrolitiche extracellulari che trasformano composti organici polimerici in monomeri facilmente assimilabili. Indagini sperimentali sull'attività esplicata dai batteri che vivono negli aggregati (Smith et al., 1992) hanno messo in evidenza come, a fronte di attività idrolitiche molto elevate, l'incremento di biomassa batterica fosse piuttosto ridotta. Da cui la conclusione che gran parte dei prodotti dell'idrolisi andassero ad alimentare l'attività dei batteri che vivono liberi nell'acqua che circonda gli aggregati.

L'aggregato risulta essere pertanto un microambiente all'interno del quale si manifestano attività biologiche che operano con velocità variabili, in relazione alla qualità della sostanza organica di cui sono costituiti e dell'età rispetto al momento della formazione (Grossart & Plough, 2001).

Poco si sa sulla composizione biologica degli aggregati, in termini qualitativi, relativamente alla componente batterica. Nel corso dell'ultimo decennio l'approccio all'analisi della composizione delle comunità microbiche negli ambienti marini è cambiato considerevolmente. Le tecniche microbiologiche classiche come la coltivazione e la descrizione microscopica, pur essendo essenziali in ecologia microbica, non sono tuttavia sufficienti a valutare la diversità delle comunità batteriche negli ambienti naturali e possono condurre ad una visione distorta della composizione specifica.

Nel presente lavoro abbiamo applicato tecniche di biologia molecolare per studiare le comunità batteriche associate agli aggregati mucilluginosi. Questo approccio molecolare ci ha consentito di ottenere informazioni sulla struttura e sulla diversità del

popolamento batterico al fine di scoprire le strategie impiegate da questi organismi nei processi sopra descritti.

Capitolo 1: Analisi della comunità batterica presente nella colonna d'acqua e negli aggregati mucilluginosi

1.1 Introduzione

I batteri sono organismi sempre presenti nelle comunità planctoniche marine e svolgono un ruolo molto importante nei cicli biogeochimici dei sistemi acquatici (Pomeroy, 1974; Azam et al., 1983; Fuhrman et al., 1992; Azam, 1998). Inoltre la loro biomassa è spesso comparabile a quella fitoplanctonica, anche nella zona eufotica (Fuhrman et al., 1993; Cho & Azam, 1990; Simon et al., 1992).

Nonostante la loro importanza nella biogeochimica marina, esistono notevoli difficoltà nel distinguere le diverse specie che costituiscono una data comunità. Queste difficoltà derivano dal fatto che soltanto poco più dell'1% del popolamento naturale risulta coltivabile e quindi disponibile per un'identificazione su base morfologica (DeLong, 1997; Fuhrman et al., 1998; Kaeberlein et al., 2002).

Per poter meglio comprendere la diversità specifica delle comunità batteriche ed essere quindi in grado di scoprire le strategie impiegate da questi organismi per l'utilizzo della materia organica si è reso necessario l'utilizzo di alcune tecniche di biologia molecolare. In particolare, l'introduzione del sequenziamento di una porzione del gene codificante per l'rRNA 16S della subunità ribosomiale minore (Woese, 1987) e l'applicazione di questa metodologia a comunità batteriche marine (Giovannoni et al., 1990; DeLong et al., 1993; Fuhrman et al., 1993; Mullins et al., 1995; Pinhassi et al., 1997;

Rath et al., 1998) ha reso possibile una migliore comprensione della biodiversità microbica.

Si è inoltre osservato che la composizione delle comunità batteriche non è costante, ma varia con la profondità (Giovannoni et al., 1996), le stagioni (Rehnstam et al., 1993) e in diversi macro- (Murray et al., 1996) e micro-ambienti (DeLong et al., 1993, Bidle & Fletcher, 1995). Cambiamenti nella struttura della comunità batterica possono avere un notevole impatto sui flussi del carbonio e dei nutrienti. L'utilizzo della materia organica da parte dei batteri dipende in parte dall'attività di enzimi ectoidrolitici e Martinez et al. (1996) hanno osservato che i profili e le attività enzimatiche ectoidrolitiche erano molto variabili fra i diversi isolati batterici. Questi risultati suggeriscono che i processi enzimatici della materia organica possono variare in relazione ai cambiamenti delle specie batteriche dominanti.

La conoscenza quindi della composizione delle comunità batteriche e della loro variabilità spaziale e temporale risulta essere di fondamentale importanza per comprendere il ruolo dei batteri nella biogeochimica marina.

Poiché all'interno degli aggregati mucilluginosi i batteri risultano estremamente più abbondanti rispetto all'acqua circostante e la comunità sembra caratterizzata da un'elevata diversità (Rath et al., 1998), si è deciso di confrontare la struttura della comunità presente nella colonna d'acqua con quella presente nei macroaggregati.

L'approccio utilizzato per lo studio della comunità batterica si è basato sull'amplificazione attraverso la PCR (reazione a catena della polimerasi) di porzioni di geni batterici codificanti per l'rRNA 16S e la successiva separazione di frammenti

provenienti da taxa diversi attraverso un'elettroforesi su gel su gradiente denaturante (DGGE; Muyzer et al., 1993) (Fig. 1.1).

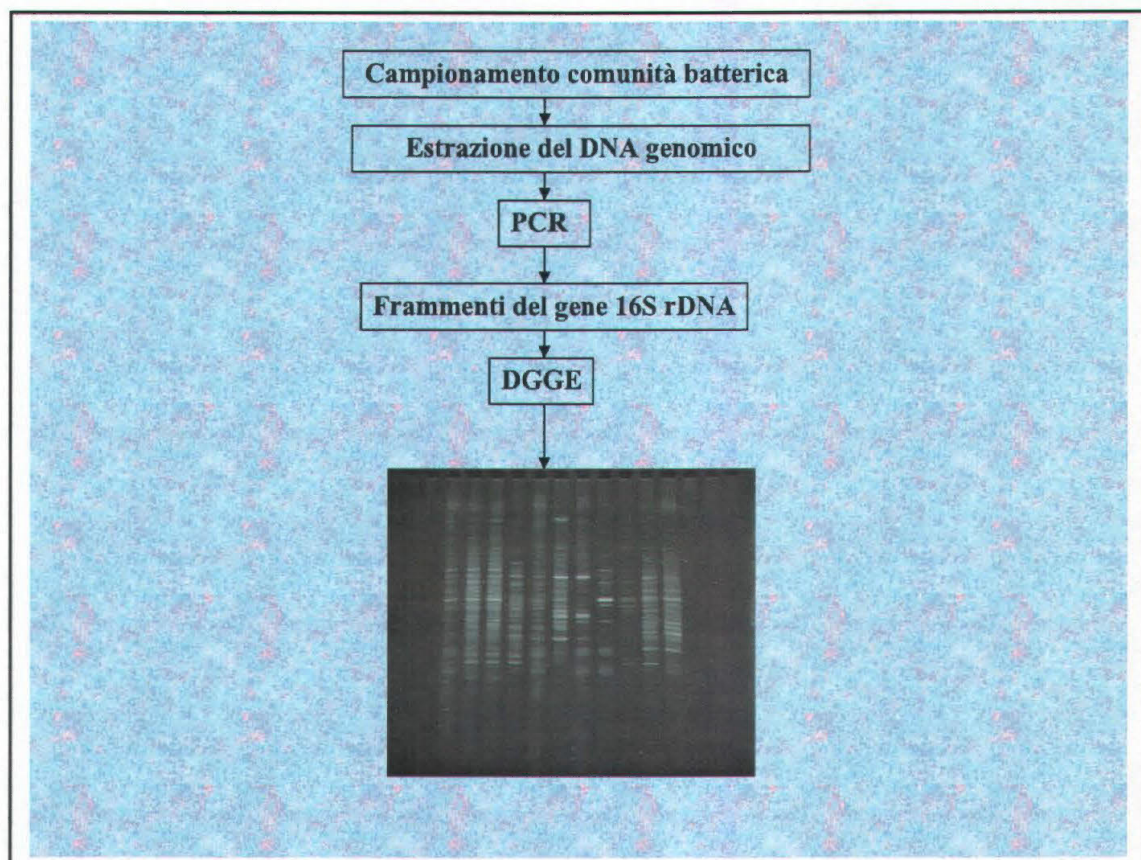


Fig. 1.1 Schema delle metodologie impiegate nell'analisi della comunità batterica

In questa tecnica miscele di frammenti di DNA appartenenti ad una piccola regione genomica delimitata da due sequenze specifiche e amplificati selettivamente attraverso una reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono trasportati elettroforeticamente attraverso un gradiente di denaturante in un gel di poliacrilamide. Il metodo si basa sulla riduzione della mobilità dei frammenti di DNA in un mezzo denso quando una parte della doppia elica si apre. La separazione dei due filamenti della doppia elica viene prodotta dall'aumento della concentrazione di sostanze chimiche quali la formamide o l'urea. Le

bande che si osservano sul gel e che rappresentano sequenze diverse, danno una rappresentazione grafica della composizione della comunità batterica. Questo approccio consente un rapido confronto visivo delle comunità fra diversi campioni e gli organismi specifici della comunità possono successivamente essere identificati tagliando e sequenziando le bande di maggior interesse (Ferris & Ward, 1997; Kowalchuck et al., 1997; Øvreås et al., 1997).

Utilizzando queste tecniche abbiamo analizzato la composizione della comunità batterica del Golfo di Trieste raccogliendo, campioni a 4 diverse profondità (superficie, 5m, 10m e fondo) nella stazione C1 nei mesi di maggio, giugno, luglio e agosto del 2000, corrispondenti anche ai periodi di comparsa delle mucillagini. Le stesse analisi sono state effettuate anche su campioni di aggregati mucilluginosi comparsi nel Golfo di Trieste nell'estate del 2000 e negli anni precedenti per poter confrontare le diverse comunità batteriche.

1.2 Materiali e metodi

1.2.1 Comunità batterica della colonna d'acqua

1.2.1.2 Raccolta dei campioni

I campioni di DNA genomico batterico (16) sono stati raccolti nei mesi di maggio, giugno, luglio e agosto del 2000 nella stazione C1 (Fig. 1.2) nel Golfo di Trieste. In giugno il campionamento è stato eseguito il giorno 19.

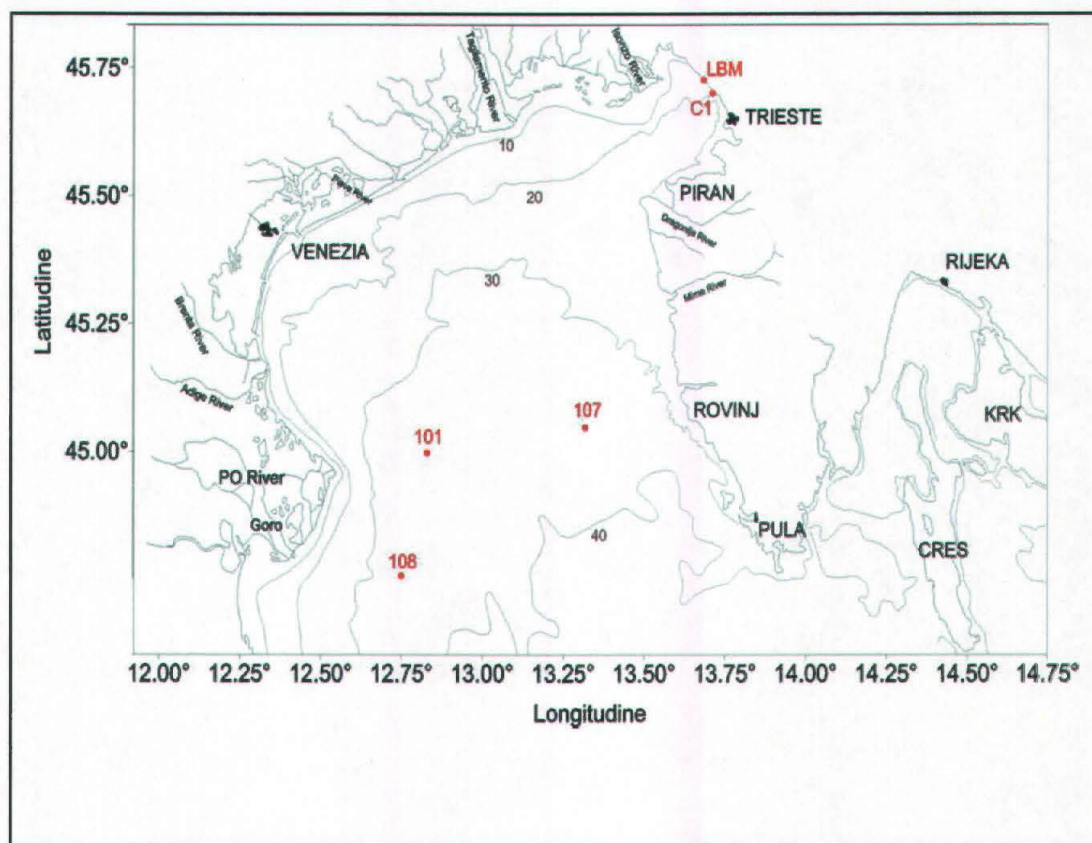


Fig. 1.2 Stazioni di campionamento

10 litri d'acqua marina sono stati raccolti con una bottiglia Niskin a 4 diverse profondità (superficie, 5 m, 10 m e fondo). I campioni sono stati prefiltrati attraverso filtri 47 mm GF/C Whatman e successivamente filtrati attraverso capsule contenenti filtri Gelman 0.22 μm a una pressione di circa 1 bar. Le capsule sono state immediatamente congelate (-80°C) e mantenute in congelatore fino al momento dell'estrazione del DNA.

1.2.1.3 Estrazione del DNA

Il DNA batterico è stato estratto seguendo il metodo di Fuhrman et al. (1988) leggermente modificato. Le capsule con i filtri sono state scongelate e le cellule batteriche sono state lisate aggiungendo 20 ml di soluzione tampone STE (20% saccarosio, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 8) bollente contenente l'1% di SDS (sodio dodecilsolfato). Successivamente sono state incubate per un tempo variabile da 5 a 7 minuti in un bagno d'acqua bollente. Il lisato è stato raccolto in tubi da 50 ml e precipitato con ammonio acetato e etanolo al 100%. Il pellet è stato risospeso in 500 μ l di soluzione tampone TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH 8.0) ed in seguito si è proceduto all'estrazione del DNA con fenolo/cloroformio. Dopo un'ulteriore precipitazione con ammonio acetato e etanolo l'acido nucleico è stato risospeso in acqua MilliQ.

1.2.1.4 Quantificazione del DNA

Il DNA estratto è stato quantificato utilizzando il PicoGreen dsDNA[®] Quantitation Kit (Molecular Probes). 10 μ l della soluzione contenente il DNA estratto sono stati addizionati a 990 μ l di campione. Al campione è stata quindi aggiunta una soluzione contenente PicoGreen[®], composto fluorescente che si lega al dsDNA. Dopo un'incubazione di 5 min è stata misurata la fluorescenza del campione utilizzando uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50B ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissione}} = 523 \text{ nm}$). La curva di calibrazione è stata preparata utilizzando soluzioni a titolo noto di dsDNA di batteriofago lambda.

1.2.1.5 Amplificazione del DNA

L'amplificazione di una porzione del gene batterico codificante per l'rRNA 16S è stata effettuata utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction). Per la PCR sono indispensabili una coppia di oligonucleotidi (primer) che si legano in modo specifico ad una sequenza complementare di nucleotidi presenti su un filamento stampo di DNA. L'enzima termostabile Taq DNA-polimerasi, estratto dall'archeobatterio termofilo *Thermus aquaticus*, sintetizza, sul filamento stampo e partendo dagli inneschi oligonucleotidici, la nuova catena di DNA. La Taq DNA-polimerasi utilizza, come unità costruttive, le molecole dei quattro deossinucleotidi trifosfati (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) presenti in concentrazione equimolare nella miscela di reazione.

In questo caso è stato utilizzato un primer universale 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') e un primer batterico 341F con attaccate 40 basi GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; Muyzer et al., 1993). Le 40 basi GC sono state attaccate al primer batterico per prevenire la completa fusione degli ampliconi durante il DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Sheffield et al., 1989; Muyzer et al., 1993). I frammenti dei geni codificanti per l'rRNA 16S sono stati amplificati in reazioni di 50 µl con una denaturazione iniziale ottenuta a 94°C per 5 minuti, seguita dal seguente programma eseguito al thermocycler: denaturazione per 1 minuto a 94°C; accoppiamento del primer per 1 minuto ad una temperatura iniziale di 65°C, decrescente di 0.5°C ogni ciclo fino ad una temperatura finale di 50°C (Touchdown PCR; Don et al., 1991); estensione del primer per 3 minuti a 72°C. Sono stati eseguiti 35 cicli, seguiti da estensione finale di 7 minuti ad

una temperatura di 72°C. Al termine dei 35 cicli la miscela di reazione è stata portata ad una temperatura di 4°C. Per verificare il corretto funzionamento del termociclature e l'assenza di contaminazioni, sono stati usati un controllo positivo con 2 µl di DNA standard ed uno negativo con 2 µl di acqua sterile per PCR al posto del campione di DNA.

Allo scopo di verificare la dimensione dell'amplificato (circa 200 paia di basi), 5 µl del prodotto di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su un gel di agarosio all'1,5%; al gel è stato aggiunto in fine, etidio bromuro alla concentrazione finale di 0.5 µg/ml. Come marcatore è stato usato un DNA Ladder 1 Kb (Promega). Grazie alla fluorescenza emessa dall'agente intercalante etidio bromuro, quando eccitato con una radiazione elettromagnetica a lunghezza d'onda compresa nel campo dell'UV ($\lambda = 312$ nm), è stato possibile visualizzare le bande mediante un transilluminatore.

1.2.1.6 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Le dimensioni dei prodotti di reazione ottenuti con la PCR sono state controllate con un'elettroforesi su un gel d'agarosio. Successivamente 15 µl di ciascuno di questi prodotti (corrispondenti ai campioni raccolti) è stato caricato su un gel all'8% di poliacrilamide (contenente un gradiente denaturante di 30-70% dall'alto verso il basso (dove 100% è definito come urea 7M e 40% in volume di formamide). Per questo tipo di elettroforesi si è utilizzato una unità DGGE (CBS Scientific, Del Mar, California) riempita con una soluzione tampone TAE 0.5X (20 mM Tris-Cl, 10 mM acetato, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 8.2) a 60°C per 6 ore a 200 V. Infine il gel è stato immerso per 30 minuti in una soluzione contenente un colorante specifico per acidi nucleici (SYBR Green I;

diluizione 1:10000, Molecular Probes), Risciacquato in soluzione tampone TAE 0.5X e fotografato con un transilluminatore con lampade UV.

1.2.1.7 Risultati

Il profilo ottenuto attraverso il DGGE delle comunità batteriche nei 16 campioni esaminati (ciascuna colonna rappresenta l'intera comunità batterica ad una determinata profondità in un certo mese, mentre ciascuna banda rappresenta un organismo diverso) è evidenziato in Fig. 1.3.

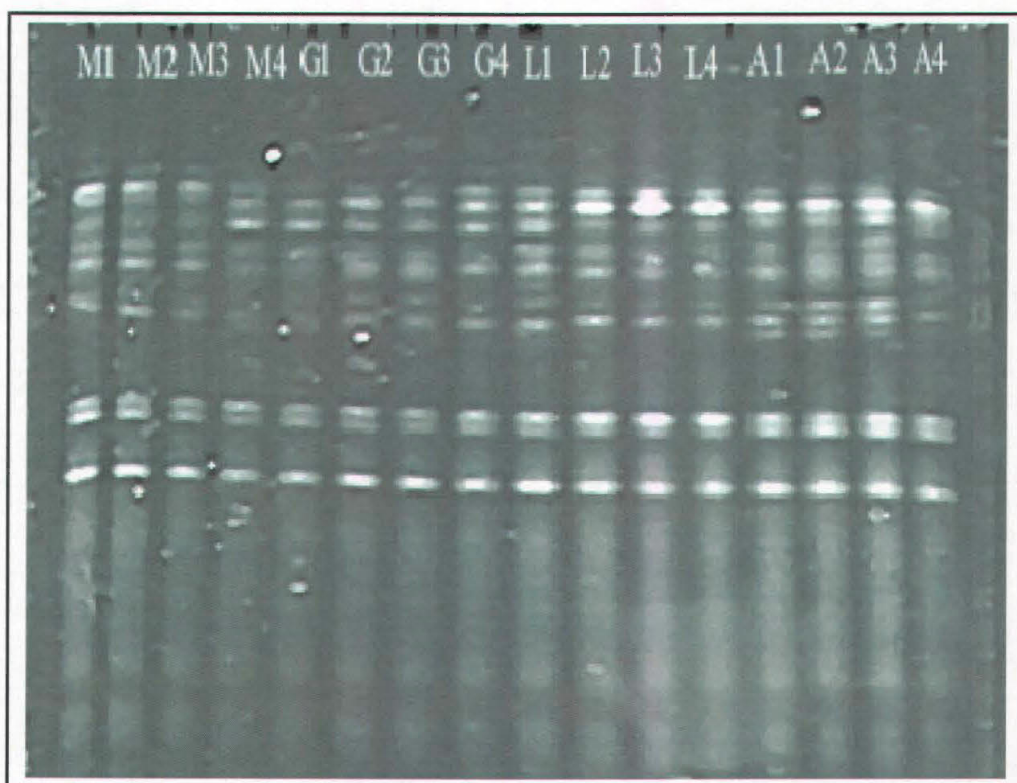


Fig 1.3 DGGE della comunità batterica presente nella colonna d'acqua. I campioni sono stati raccolti nella stazione C1. Le lettere M, G, L e A indicano rispettivamente i mesi di maggio, giugno, luglio e agosto. La numerazione da 1 a 4 indica le quote di campionamento: 1=superficie; 2=5 m; 3=10 m; 4=fondo

Ciascun campione è costituito da una decina di filotipi diversi tra loro, anche se questo profilo è molto simile in tutti e 16 i campioni esaminati. Questo risultato indica una certa omogeneità della struttura della comunità batterica presente nella colonna d'acqua nel periodo considerato, non evidenziando una rilevante variazione né temporale né spaziale.

1.2.2 Comunità batterica negli aggregati mucilluginosi

1.2.1 Raccolta dei campioni

Nel corso dell'estate del 2000 si è ripetuta nel Golfo di Trieste la comparsa degli aggregati mucilluginosi. Il fenomeno era già stato osservato in anni precedenti e si è pensato di determinare la struttura della comunità batterica presente nel muco per poterla in seguito confrontare con quella presente nella colonna d'acqua, oggetto del campionamento descritto nel precedente paragrafo. La raccolta è stata effettuata in immersione, nella stazione C1, a profondità comprese fra 1 e 15 metri attraverso l'utilizzo di siringhe sterili. Le dimensioni degli aggregati andavano da millimetri ad alcuni centimetri. Le siringhe sono state mantenute, in barca, al buio ed alla temperatura di campionamento, e una volta giunte in laboratorio sono state conservate a -80° fino al momento dell'analisi. In altre stazioni, al largo del Laboratorio di Biologia Marina (LBM) e al largo di Rovigno (Croazia) i campioni di aggregati sono stati raccolti in superficie.

Per le analisi delle due comunità sono stati utilizzati anche campioni di mucillagine raccolti con le stesse modalità descritte precedentemente in diverse stazioni nel Nord Adriatico (Fig. 1.2) durante la comparsa del fenomeno nel 1997, 2000 e 2001. Sono stati

presi in oggetto campioni di muco raccolti in varie zone del Golfo di Trieste e lungo la costa della Croazia (Tab. 1.1).

| | | |
|-----------|------|---------|
| luglio | 1997 | St. 101 |
| luglio | 1997 | St. 107 |
| luglio | 1997 | St. 108 |
| luglio | 1997 | LBM |
| luglio | 1997 | C1 |
| 6 giugno | 2000 | LBM |
| 9 giugno | 2000 | LBM |
| 9 giugno | 2000 | Rovigno |
| 19 giugno | 2000 | C1 |
| 23 giugno | 2000 | LBM |
| 27 giugno | 2000 | LBM |
| 6 luglio | 2000 | LBM |
| 19 giugno | 2000 | AA1 |
| 5 luglio | 2001 | C1 |
| 5 luglio | 2001 | C1 |

Tab. 1.1 Elenco dei campioni di aggregati mucilluginosi

1.2.2 Estrazione del DNA, amplificazione, DGGE

Per l'estrazione del DNA batterico dagli aggregati mucilluginosi è stato utilizzato un kit (UltraClean Soil DNA Kit); successivamente per l'amplificazione del DNA estratto e per il DGGE sono state utilizzate le stesse metodologie impiegate per lo studio della comunità batterica presente nella colonna d'acqua.

1.2.3 Risultati

Analizzando le immagini (Fig. 1.4) del DGGE possiamo notare come i profili delle comunità batteriche siano diversi fra gli 11 campioni esaminati.

Ciascuna comunità si differenzia dalle altre per numero di organismi (numero di bande visibili) e per tipo di organismo (bande a diverse altezze). È importante sottolineare la diversità dei profili corrispondenti a campioni provenienti dalla stessa stazione (C1), ma raccolti nell'acqua libera e all'interno degli aggregati mucillaginosi. Si nota inoltre come le

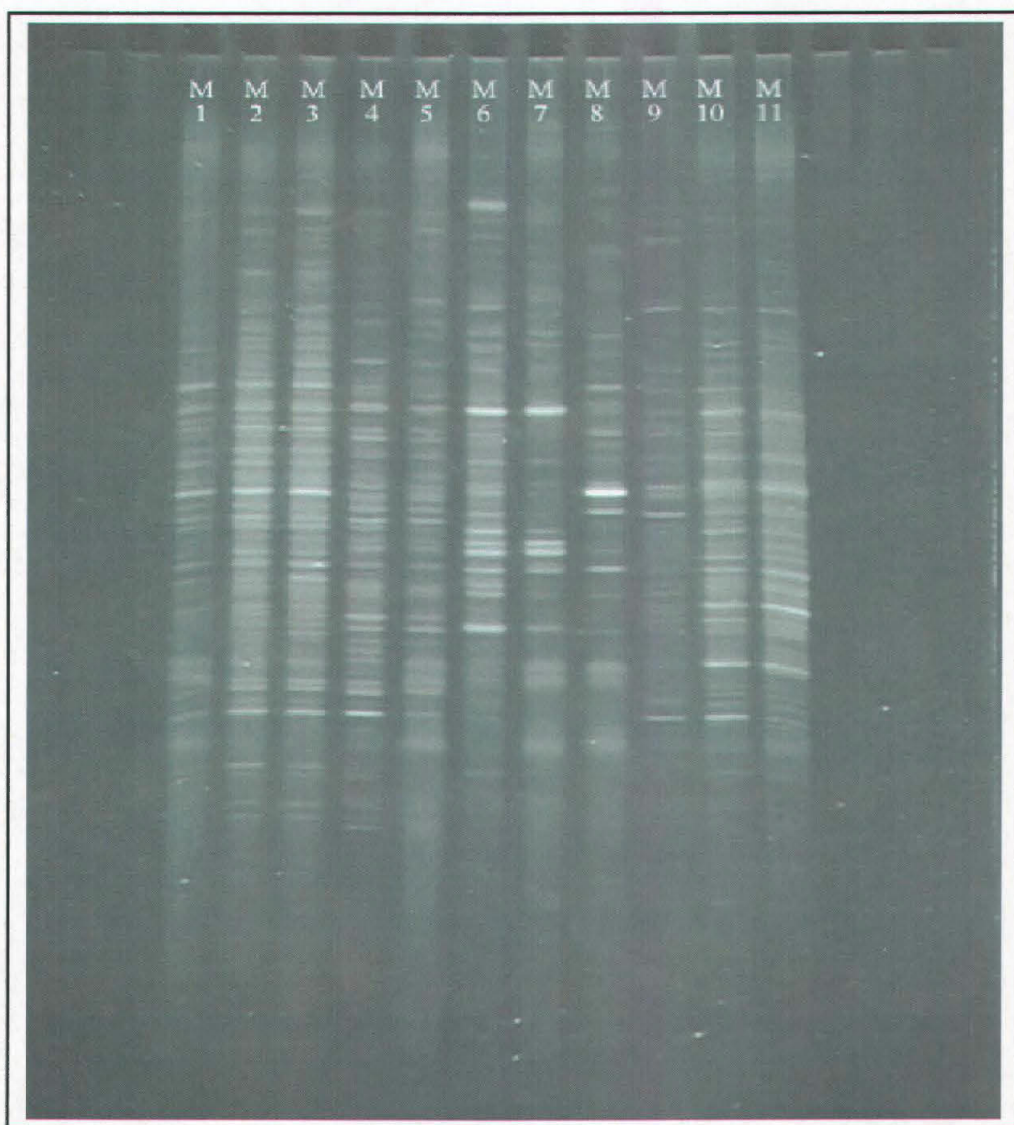


Fig. 1.4 DGGE della comunità batterica presente negli aggregati mucillaginosi. I campioni M1, M2, M3 sono stati raccolti nel luglio 1997 nelle stazioni 101, 107 e 108 al largo di Rovigno. M4 è stato raccolto nella stazione C1 nel luglio 1997. M5 e M6 sono stati raccolti il 9 giugno 2000 rispettivamente nelle stazioni LBM e Rovigno. M7 è stato raccolto il 19 giugno 2000 nella stazione C1 assieme ai campioni di acqua libera. M8 e M9 sono stati raccolti nella stazione LBM il 27 giugno e il 6 luglio del 2000. M10 e M11 sono due campioni raccolti nella stazione C1 il 5 luglio del 2001.

comunità batteriche presenti negli aggregati mucillaginosi hanno una composizione diversa in relazione allo spazio (stazione di campionamento) e al tempo (mese e anno di prelievo).

1.3 Discussione

Studi relativi alla variazione spaziale delle comunità batteriche marine (Murray et al., 1998; Riemann et al., 1999; Schauer et al. 2000; Bano & Hollibaugh, 2002; Riemann & Middelboe, 2002) suggeriscono cambiamenti piuttosto modesti nella composizione specifica del popolamento, mentre i profili verticali sono risultati maggiormente variabili, soprattutto ad elevate profondità (Acinas et al., 1997; Murray et al., 1998). Non essendo disponibili molti dati sulla variabilità temporale delle comunità batteriche marine, non è chiaro se questi cambiamenti sono frequenti sul campo, anche se in alcune situazioni, come durante i bloom fitoplanctonici, sono stati osservati cambiamenti significativi della struttura della comunità batterica (Fandino et al., 2001; Yager et al., 2001).

Ricerche effettuate, invece, su comunità batteriche presenti in ambienti simili agli aggregati mucillaginosi, quali la neve marina o il particolato sospeso, hanno evidenziato una elevata diversità specifica (DeLong et al., 1993; Rath et al., 1998; Moeseneder et al., 2001).

Confrontando i risultati ottenuti analizzando la struttura delle comunità batteriche presenti nello stesso giorno, nei due diversi ambienti esaminati, la colonna d'acqua e gli aggregati mucillaginosi, abbiamo avuto una prima conferma della diversità esistente fra le due comunità presenti durante la comparsa degli aggregati mucillaginosi. Stimolati anche

dall'evidente diversità specifica presente in campioni di mucillagine raccolti in stazioni e periodi diversi, abbiamo deciso di approfondire la nostra conoscenza di questi organismi al fine di poter comprendere meglio il loro ruolo all'interno degli aggregati stessi.

Capitolo 2: Isolamento e caratterizzazione filogenetica di organismi batterici presenti negli aggregati mucilluginosi

2.1 Introduzione

Nonostante l'importanza dei batteri eterotrofi nei processi di degradazione della materia organica negli oceani, i microbiologi sono giunti alla conclusione che la maggior parte dei batteri marini non sono coltivabili poiché soltanto una piccola frazione di quelli contati attraverso l'utilizzo della microscopia ad epifluorescenza sono in grado di formare colonie su terreni di coltura solidi (Hagström et al. 2000). I terreni usati per l'isolamento dei batteri marini sono estremamente selettivi: la mancanza di conoscenze sulle esigenze nutrizionali e sulle condizioni di coltura rappresenta un ostacolo rilevante alla coltivabilità dei batteri. Il loro stato fisiologico, inoltre, può fortemente influenzare il successo delle colture (Eilers et al., 2000). È stato valutato che soltanto l'1% delle specie batteriche presenti nell'ambiente cresce su terreni di coltura (DeLong, 1997; Fuhrman & Campbell, 1998; Kaeberlein et al., 2002), anche se studi recenti hanno dimostrato che i batteri in grado di crescere su terreni solidi sono un numero maggiore di quello ritenuto fino a poco tempo fa (Rehnstam et al. 1993, Pinhassi et al. 1997, Hagström et al. 2000). La mancanza di adeguate conoscenze sulla morfologia e le piccole dimensioni delle cellule batteriche non permettono l'identificazione microscopica della maggior parte dei batteri presenti nell'ambiente. L'introduzione necessaria in ecologia microbica di altri strumenti di indagine, quali tecniche di biologia molecolare, ha migliorato considerevolmente la percezione della diversità delle comunità microbiche.

Il presente studio rappresenta l'analisi della struttura filogenetica della comunità batterica coltivabile, presente negli aggregati mucillaginosi comparsi nel Nord Adriatico nel 1997, nel 2000 e nel 2001, utilizzando tre diversi terreni di coltura (Miletto, 2001). Si è cercato di isolare in colture pure, mediante l'utilizzo di specifici terreni, i batteri presenti in campioni di muco. Gli isolati sono quindi stati caratterizzati mediante l'identificazione della sequenza nucleotidica codificante per l'rRNA 16S della subunità minore dei ribosomi procariotici. La successiva analisi tra le sequenze geniche così ottenute, descrivendo le relazioni evolutive tra gli organismi (Woese, 1987), ha reso possibile l'identificazione tassonomica dei microrganismi in esame (Fig. 2.1).

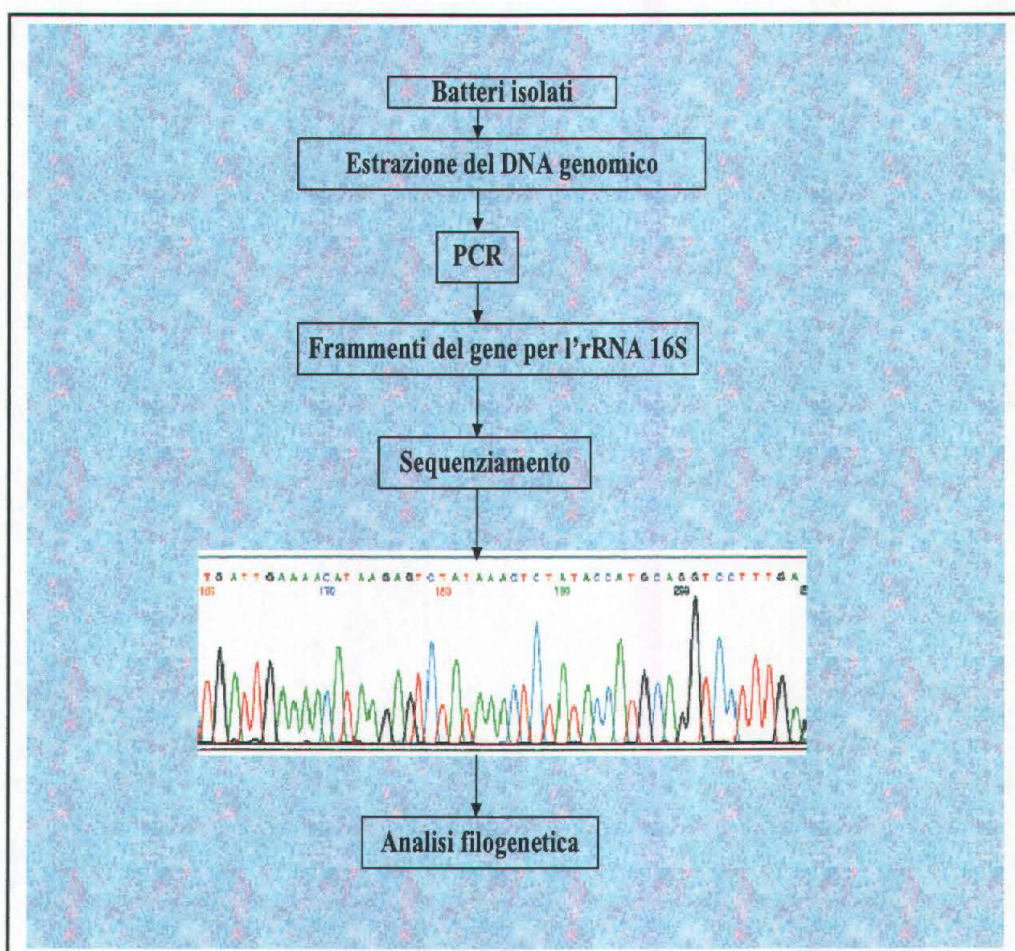


Fig. 2.1 Schema delle metodologie impiegate nella caratterizzazione genetica dei ceppi batterici isolati dagli aggregati mucillaginosi

2.2. Materiali e metodi

2.2.1 raccolta dei campioni

I campioni di mucillagine sono stati raccolti in diverse stazioni nel Nord Adriatico (Fig. 1.2) durante la comparsa del fenomeno nel 1997, 2000 e 2001 secondo le modalità descritte nel precedente capitolo. In laboratorio alcuni campioni sono stati immediatamente piastrati sul terreno di coltura ZoBell 2216, mentre i restanti campioni sono stati congelati a -80°C in attesa di essere piastrati.

2.2.2 Terreni di coltura

Per isolare e caratterizzare i batteri presenti nei campioni di mucillagine sono stati utilizzati tre terreni solidi (Tab. 2.1): MPG (Tanaka et al., 1985), Zobell 2216 (Zobell, 1934) e ZoBell 2216 arricchito. Il terreno solido MPG (Meat Peptone Glucose) è stato preparato utilizzando acqua bidistillata sterile a cui sono stati aggiunti estratto di carne (Sigma), peptone (Sigma) e glucosio (Sigma) secondo la ricetta di Tab. 2.1. Il pH finale è 7.0.

Il terreno ZoBell 2216 è stato preparato con acqua di mare che, subito dopo la raccolta, è stata filtrata su membrana di porosità pari a $0.22\ \mu\text{m}$ (Millipore) e successivamente autoclavata a 121°C per 30 min. All'acqua di mare è stato aggiunto peptone ed estratto di lievito (Sigma). Il pH finale è 8.0-8.2.

Il terreno ZoBell 2216 arricchito differisce dal precedente soltanto per un'aggiunta di estratto di carne. Il pH finale, in questo caso, è 7.5.

| | | | |
|--|---|---------|-----|
| MPG pH _{finale} =7.0 | estratto di carne | 1.5 g | |
| | peptone | 2.5 g | |
| | glucosio | 2.5 g | |
| | agar | 15 g | |
| | acqua bidistillata | 1 l | |
| ZoBell 2216 pH _{finale} =8.0-8.2 | peptone | 5 g | |
| | lievito | 1 g | |
| | agar | 15 g | |
| | acqua di mare autoclavata | 0.9 l | |
| | acqua bidistillata | 1 l | |
| ZoBell 2216 arricchito pH _{finale} =7.5 | peptone | 5 g | |
| | lievito | 1 g | |
| | estratto di carne | 1.5 g | |
| | agar | 15 g | |
| | acqua di mare autoclavata | 0.9 l | |
| | acqua bidistillata | 1 l | |
| GM pH _{finale} =7.5 | glucosio | 3 g | |
| | estratto di carne | 0.3 g | |
| | soluzione minerale * | 1 l | |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1000 mg | |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 100 mg | |
| | FeCl ₂ ·6H ₂ O | 0.5 mg | |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 7.5 mg | |
| | NaCl | 100 mg | |
| | KH ₂ PO ₄ | 527 mg | |
| | K ₂ HPO ₄ | 1070 mg | |
| | acqua bidistillata | 1 l | |
| | ZoBell 2216 broth pH _{finale} =8.0-8.2 | peptone | 5 g |
| | | lievito | 1 g |
| acqua di mare autoclavata | | 1 l | |
| ZoBell 2216 broth arricchito pH _{finale} =7.5 | peptone | 5 g | |
| | lievito | 1 g | |
| | estratto di carne | 1.5 g | |
| | acqua di mare autoclavata | 0.9 l | |
| | acqua bidistillata | 0.1 l | |

Tab. 2.1 Composizione dei terreni di coltura

Per la preparazione dei terreni è stato utilizzato agar (Difco) come agente solidificante.

Prima dell'inoculo i campioni di mucillagine sono stati riportati a temperatura ambiente. Da ogni campione sono state prelevate aliquote pari a 100 µl e diffuse su tre diversi terreni di coltura mediante spatolina in vetro bagnata in etanolo e flambata. L'incubazione è avvenuta alla luce e a temperatura ambiente (20°C) per una settimana. Al termine del periodo di incubazione le colonie cresciute e con morfologia sufficientemente definita sono state ripiastrate con ansa sterile sullo stesso terreno ed incubate alle medesime condizioni. Le piastre madri sono state conservate alla luce e a 10°C. I batteri sono stati isolati in colture pure mediante una serie di ripiastrature con le modalità descritte.

Le colonie, isolate sui terreni solidi e conservate a 10°C, sono state inoculate con ansa sterile in tre terreni liquidi corrispondenti ai terreni solidi d'isolamento (Tab. 2.1): GM (Tanaka et al., 1985), ZoBell broth 2216 (ZoBell, 1934) e ZoBell broth 2216 arricchito. Il terreno liquido GM (Glucose Meat), analogo al terreno MPG per alcuni componenti, viene preparato utilizzando acqua bidistillata sterile a cui vengono aggiunti sali minerali, estratto di carne e glucosio. Il pH finale è 7.0. I terreni ZoBell 2216 broth e ZoBell 2216 broth arricchito differiscono dai corrispondenti terreni solidi soltanto per l'assenza di agar.

I batteri inoculati nel brodo di coltura sono stati mantenuti in agitazione per una settimana in condizioni di luce e temperatura ambiente (20°C). Al termine dell'incubazione i campioni sono stati conservati alla luce e a 10°C.

2.2.3 Analisi microscopica

Alcuni ceppi batterici isolati sono stati osservati anche al microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 250 MK2. I batteri sono stati inoculati nel brodo di coltura e incubati a temperatura ambiente per una settimana. Aliquote pari a 5 ml di colonia sono state fissate in 0.8 ml di glutaraldeide al 25% in 4.2 ml di tampone cacodilato 0.2M (pH=7.4). L'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente per 30 min. Dopo centrifugazione (3000 rpm, 3 min) ed eliminazione del surnatante, il fondello è stato lavato per due volte in 5 ml di tampone cacodilato (8 min d'incubazione, centrifugazione per 1 min a 3000 rpm). La disidratazione dei campioni è stata condotta a temperatura ambiente con una serie di passaggi successivi in etanolo a concentrazione crescente (30% per 8 min, 70% per 8 min); l'eliminazione completa dell'acqua dalle cellule batteriche deve essere, infatti, graduale e lunga. Ad ogni passaggio i campioni sono stati centrifugati per 3 min a 3000 rpm. I batteri sono stati conservati in etanolo all'70% e a 4°C fino al momento dell'osservazione al SEM. Per l'analisi microscopica si è proceduto con un'ulteriore disidratazione con etanolo all'85% ed etanolo dry. L'essiccamento è stato condotto al punto critico dell'anidride carbonica mediante Critical Point Dryer (Balzers), metodo che permette di evitare la formazione di distorsioni sulla superficie del preparato. La metallizzazione dei campioni essiccati mediante sputter (Balzers SCD 030) è stata eseguita sotto vuoto con oro (Au) e palladio (Pd), previo montaggio dei campioni su appositi supporti (stubs).

2.2.4 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto mediante due diverse procedure: la prima da terreno liquido mediante il protocollo per l'estrazione di DNA genomico batterico con il DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen), la seconda da terreno solido mediante il protocollo per l'estrazione di DNA genomico con il Lyse-N-Go™ PCR Reagent (Pierce). La scelta del protocollo è dipesa dalla quantità di materiale batterico disponibile per l'estrazione.

2.2.4.1 Protocollo DNeasy™

Aliquote pari a 1.5 ml di colonia in terreno liquido sono stati centrifugati (7500 rpm, 10 min) e risospesi in 180 µl di tampone. Al fine di ottenere la completa lisi batterica sono stati aggiunti 20 µl dell'enzima proteolitico Proteinasi K (20 mg/ml) e la miscela è stata incubata a 55°C per circa 2 h. Dopo l'aggiunta di 200 µl di soluzione tampone si è proceduto con un'ulteriore incubazione di 10 min a 70 °C. Infine sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 96%. La successiva centrifugazione (8000 rpm, 1 min) ha permesso di raccogliere, su uno speciale filtro incluso nel kit, il DNA estratto, che è stato lavato con un primo tampone (centrifugazione a 8000 rpm, 1 min) e quindi con un secondo tampone (centrifugazione a 13000 rpm, 3 min). Il DNA è stato eluito dopo incubazione a temperatura ambiente per 1 min (centrifugazione a 8000 rpm 1 min). Terminata tale procedura il DNA era pronto per l'amplificazione.

2.2.4.2 Protocollo Lyse-N-Go™

La colonia su terreno solido è stata prelevata, con un'ansa sterile, e sospesa in 1.35 ml di soluzione ampone PBS (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 e KH₂PO₄ 0.24 g in 800

ml di acqua bidistillata, pH=7.4). Dopo centrifugazione (1400 rpm, 2 min) il surnatante è stato scartato e il fondello risospeso in 1 ml di tampone PBS: questo lavaggio in PBS ha permesso di eliminare dalla colonia eventuali residui di agar che possono interferire con il processo di amplificazione. Ad 1 μ l di sospensione di DNA sono stati addizionati 5 μ l di soluzione Lyse-N-Go™ per un volume complessivo di 6 μ l. Al fine di ottenere la lisi batterica il campione è stato sottoposto ad un ciclo termico (30 sec a 65°C, 30 sec a 8°C, 90 sec a 65°C, 3 min a 97°C, 1 min a 8°C, 3 min a 65°C, 1 min a 97°C, 1 min a 65°C) e quindi mantenuto a 80°C utilizzando un termociclatore (Perkin Elmer Gene Amp® PCR System 2400). Al termine di questo protocollo il DNA era pronto per l'amplificazione (Long & Azam, 2001).

2.2.5 Quantificazione del DNA

Il DNA estratto è stato quantificato utilizzando il PicoGreen dsDNA® Quantitation Kit (Molecular Probes). 10 μ l della soluzione contenente il DNA estratto sono stati addizionati a 990 μ l di campione. Al campione è stata quindi aggiunta una soluzione contenente PicoGreen®, composto fluorescente che si lega al dsDNA. Dopo un'incubazione di 5 min è stata misurata la fluorescenza del campione utilizzando uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50B ($\lambda_{eccitazione}$ = 480 nm, $\lambda_{emissione}$ = 523 nm). La curva di calibrazione è stata preparata utilizzando soluzioni a titolo noto di dsDNA di batteriofago lambda.

2.2.6 Amplificazione del DNA

L'amplificazione di una porzione del gene batterico codificante per l'rRNA 16S è stata effettuata utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction). Per la PCR sono indispensabili una coppia di oligonucleotidi (primer) che si legano in modo specifico ad una sequenza complementare di nucleotidi presenti su un filamento stampo di DNA. L'enzima termostabile Taq DNA-polimerasi, estratto dall'archeobatterio termofilo *Thermus aquaticus*, sintetizza, sul filamento stampo e partendo dagli inneschi oligonucleotidici, la nuova catena di DNA. La Taq DNA-polimerasi utilizza, come unità costruttive, le molecole dei quattro deossinucleotidi trifosfati (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) presenti in concentrazione equimolare nella miscela di reazione. Per questo studio sono stati utilizzati i primer oligonucleotidici universali batterici 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') secondo il sistema di numerazione di *E. coli* (Giovannoni, 1991; Weisburg et al., 1991).

Per il DNA estratto con il protocollo DNeasy™, l'amplificazione è stata portata a termine utilizzando volumi di 50 µl con una denaturazione iniziale ottenuta a 94°C per 5 minuti seguita dal seguente programma eseguito al thermocycler: denaturazione per 1 minuto a 94°C; accoppiamento del primer per 1 minuto ad una temperatura iniziale di 65°C, decrescente di 0.5°C ogni ciclo fino ad una temperatura finale di 50°C (Touchdown PCR; Don et al., 1991); estensione del primer per 3 minuti a 72°C. Sono stati eseguiti 35 cicli seguiti da estensione finale di 7 minuti ad una temperatura di 72°C.

Al termine dei 35 cicli la miscela di reazione è stata portata ad una temperatura di 4°C. Per verificare il corretto funzionamento del termociclatore e l'assenza di

contaminazioni, sono stati usati un controllo positivo con 2 μ l di DNA standard ed uno negativo con 2 μ l di acqua sterile per PCR al posto del campione di DNA.

Ai 6 μ l di campione di dsDNA da amplificare risultanti dall'estrazione con protocollo Lyse-N-Go™ sono stati aggiunti 44 μ l di una miscela (Promega PCR Master Mix) contenente Taq DNA-polimerasi, dNTPs, MgCl₂, tampone standard, 1 μ l di ciascun primer (27F e 1492R) e acqua sterile per portare la miscela di reazione al volume finale di 50 μ l. Il programma per l'amplificazione è identico a quello utilizzato con i campioni di DNA estratti con il protocollo DNeasy™ secondo le modalità prima descritte. Anche in questo caso sono stati utilizzati un controllo positivo e uno negativo per valutare la qualità della reazione di amplificazione.

Allo scopo di verificare la dimensione dell'amplificato (circa 21500 paia di basi), 5 μ l del prodotto di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su un gel di agarosio allo 0.8%; al gel è stato aggiunto infine, etidio bromuro alla concentrazione finale di 0.5 μ g/ml. Come marcatore è stato usato un DNA Ladder 1 Kb (Promega). Grazie alla fluorescenza emessa dall'agente intercalante etidio bromuro, quando eccitato con una radiazione elettromagnetica a lunghezza d'onda compresa nel campo dell'UV ($\lambda = 312$ nm), è stato possibile visualizzare le bande mediante un transilluminatore.

2.2.7 Purificazione del DNA amplificato

Il DNA amplificato è stato purificato con UltraClean™ PCR Clean-up Kit (Mobio). I 50 μ l di prodotto di PCR sono stati trattati con soluzioni a diversa composizione e sottoposti a cicli di centrifugazione ed eluizione attraverso uno speciale filtro incluso nel kit. Al termine di questo protocollo la soluzione contenente il DNA era priva di tutti i

componenti utilizzati per l'amplificazione (primer 27F e 1492R, dNTPs, Taq DNA-polimerasi, ecc.) e quindi il DNA era pronto per essere sequenziato.

2.2.8 Sequenziamento e analisi dei dati

A 2 μ l di amplificato purificato è stato aggiunto 1 μ l di soluzione 10 μ M di primer 27F secondo le indicazioni del servizio di sequenziamento di DNA del C.R.I.B.I. presso l'Università degli Studi di Padova. La sequenza dei nucleotidi della porzione amplificata del gene che codifica per l'rRNA 16S è stata determinata utilizzando la chimica del Big Dye terminator associata all'enzima Taq FS con un sequenziatore automatico ABI 3700 a 96 capillari; un DNA pGem è stato utilizzato come controllo. Il ciclo utilizzato per la reazione è 95 °C per 30 sec, 50 °C per 10 sec, 60 °C per 3 min e complessivamente sono stati eseguiti 25 cicli. Per la purificazione il campione è stato precipitato con etanolo e sodio acetato.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle disponibili nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) ha permesso di determinare le affiliazioni filogenetiche approssimate delle sequenze nucleotidiche in esame con quelle della banca dati.

2.3 Risultati

Tutti i ceppi batterici isolati sono stati identificati analizzando la sequenza nucleotidica dei frammenti del gene per l'rRNA 16S amplificati mediante la reazione a

catena della polimerasi (PCR). Confrontando, attraverso il programma BLAST, le sequenze ottenute con quelle presenti nella banca dati dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), è stato possibile ascrivere ogni ceppo batterico ad un gruppo tassonomico secondo la classificazione di Woese (1987).

La caratterizzazione genetica dei ceppi batterici isolati sui diversi terreni di coltura ha rivelato una considerevole diversità specifica tra gli isolati, con percentuali di identità di sequenza variabili fra l'89% e il 100% (Tab 2.2, Tab. 2.3, Tab. 2.4).

| Data campionamento | Isolati | Organismo affine | Somiglianza | Taxon |
|--------------------|---------|---------------------------------|-------------|----------------------|
| St. LBM 1997 | GM16 | Bacillus sp. FP1/2002 | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 1997 | GM36 | Bacillus sp. FP1/2002 | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. 101 1997 | GM8 | Bacillus subtilis strain KL-077 | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. 107 1997 | GM3 | Bacillus mycoides strain 10206 | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. 107 1997 | GM4 | Bacillus sp. FP1/2002 | 95% | Low GC Gram Positivi |
| St. 107 1997 | GM5 | Bacillus pumilus | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. 108 1997 | GM2 | Bacillus pumilus | 95% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 2000 | GM22 | Bacillus subtilis strain KL-077 | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 2000 | GM23 | Bacillus subtilis strain KL-077 | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2000 | GM24 | Bacillus sp. A24 | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2000 | GM25 | Bacillus cereus strain G8639 | 92% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM26 | Bacillus subtilis strain KL-077 | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM28 | Bacillus sp. Fa7 | 89% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM29 | Bacillus subtilis strain KL-077 | 94% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM30 | Bacillus sp. FP1/2002 | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM31 | Bacillus cereus strain G8639 | 94% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | GM32 | Bacillus sp. BacB11 | 95% | Low GC Gram Positivi |

Tab. 2.2 Lista degli isolati sul terreno GM broth

I batteri isolati sono risultati appartenere a 5 taxa: 3 taxa raggruppano batteri Gram- suddivisi in α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e CFB Group (Cytophaga-Flaviobacterium-Bacteroides Group). I rimanenti 2 taxa comprendono batteri Gram+

distinti in Low GC e High GC, i batteri appartenenti al gruppo denominato Low GC Gram+ possiedono nel DNA un contenuto in coppie GC inferiore al 50% del totale, mentre negli organismi appartenenti al gruppo High GC Gram+ la percentuale è superiore al 50%.

| Data campionamento | Isolati | Organismo affine | Somiglianza | Taxon |
|--------------------|---------|---------------------------------------|-------------|---------------------------|
| St. C1 1997 | Z7 | Bacillus sp. YY | 95% | Low GC Gram Positivi |
| St. 101 1997 | Z2 | Uncultured Cytophaga SCR2 | 89% | CFB group Bacteria |
| St. 107 1997 | Z1 | Bacillus pumilus | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2000 | Z9 | Pseudoalteromonas sp. | 97% | γ - Proteobacteria |
| St. C1 2000 | Z10 | Marine bacterium BB2AT2 | 97% | γ - Proteobacteria |
| St. C1 2000 | Z11 | Marine CFB-group bacterium SB9 | 98% | CFB group Bacteria |
| St. C1 2000 | Z12 | Marine CFB-group bacterium SB9 | 97% | CFB group Bacteria |
| St. LBM 2000 | Z13 | Bacillus pumilus | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | Z14 | Bacillus sp. BacB2 | 89% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 2000 * | Z15 | Pseudoalteromonas piscida | 100% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z16 | Oceanospirillum pusillum | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z17 | Uncultured γ - proteobacterium | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z18 | Pseudoalteromonas sp. | 99% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z19 | Pseudoalteromonas piscida | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z20 | Pseudoalteromonas piscida | 100% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z21 | Bacillus aquamarinus | 92% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 2000 * | Z22 | Vibrio orientalis | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z23 | Marine bacterium | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z24 | α - proteobacterium | 98% | α - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z25 | Alteromonas alvinellae | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z26 | α - proteobacterium | 98% | α - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z27 | Vibrio sp. | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z28 | Uncultured γ - proteobacterium | 93% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z29 | Pseudoalteromonas sp. | 97% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z30 | Vibrio tapetis | 95% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z31 | Vibrio splendidus | 92% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z32 | Pseudoalteromonas piscida | 98% | γ - Proteobacteria |
| St. LBM 2000 * | Z33 | Alteromonas macleodii | 96% | γ - Proteobacteria |

2.3 Lista degli isolati sul terreno ZoBell 2216 broth

Più della metà degli isolati sono Gram+ (32 su 57), la quasi totalità appartiene al gruppo Low GC (31), 1 è riconducibile al gruppo High GC. Tra i Gram- ben rappresentati

risultano i γ -Proteobacteria con 19 isolati su 25. Il gruppo degli α -Proteobacteria ed il CFB Group sono invece meno abbondanti, rappresentati soltanto da 2 e 4 isolati rispettivamente.

| Data campionamento | Isolati | Organismo affine | Somiglianza | Taxon |
|--------------------|---------|---------------------------------------|-------------|---------------------------|
| St. C1 1997 | ZME10 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 1997 | ZME11 | <i>Bacillus cereus</i> | 97% | Low GC Gram Positivi |
| St. LBM 1997 | ZME18 | Marine CFB-group bacterium SB9 | 95% | CFB group Bacteria |
| St. 101 1997 | ZME6 | <i>Dietzia maris</i> | 97% | High GC Gram Positivi |
| St. 101 1997 | ZME7 | <i>Bacillus cereus</i> | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. 101 1997 | ZME16 | <i>Bacillus megaterium</i> | 95% | Low GC Gram Positivi |
| St. 107 1997 | ZME3 | <i>Bacillus pumilus</i> | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. 107 1997 | ZME4 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 98% | Low GC Gram Positivi |
| St. 108 1997 | ZME1 | <i>Bacillus cereus</i> | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2000 | ZME12 | <i>Escherichia coli</i> genomic DNA | 97% | γ - Proteobacteria |
| St. C1 2001 | ZME13 | <i>Bacillus subtilis</i> | 96% | Low GC Gram Positivi |
| St. C1 2001 | ZME14 | <i>Bacillus pumilus</i> strain KL-052 | 98% | Low GC Gram Positivi |

Tab. 2.4 Lista degli isolati sul terreno ZoBell 2216 broth arricchito

Considerando separatamente i batteri isolati sui diversi terreni si evidenzia come i 17 ceppi cresciuti sul terreno MPG risultino appartenere tutti al gruppo dei Gram+ e in particolare a quello dei Low GC. Tutti i batteri Low GC Gram+ risultano affini al genere *Bacillus*.

I 28 batteri cresciuti sul terreno ZoBell 2216 risultano prevalentemente Gram- (82%), mentre i Gram+ costituiscono il 18% degli isolati. Il 64% dei ceppi batterici appartengono al gruppo dei γ -Proteobacteria, l'11% al CFB Group, il 7% al gruppo degli α -Proteobacteria (Fig. 2.2).

I Gram+ risultano appartenere tutti al gruppo dei Low GC. I γ -Proteobacteria Z9, Z15, Z18, Z19, Z20, Z29, Z32 sono affini al genere *Pseudoalteromonas*, Z25 e Z33 sono affini al genere *Alteromonas*, Z10, Z17, Z23 e Z28 somigliano a batteri marini non

identificabili a livello di genere, Z22, Z27, Z30 e Z31 appartengono al genere *Vibrio* e l'isolato Z21 è affine al genere *Oceanospirillum*. Gli isolati (Z24 e Z26) appartenenti al gruppo degli α -Proteobacteria sono affini a batteri marini non identificabili a livello di genere. Anche i 3 isolati (Z2, Z11 e Z12) appartenenti al CFB Group sono affini a batteri marini non identificabili a livello di genere. Infine gli isolati (Z1, Z7, Z13, Z14 e Z21) appartenenti al gruppo Gram+ low GC sono tutti affini al genere *Bacillus*.

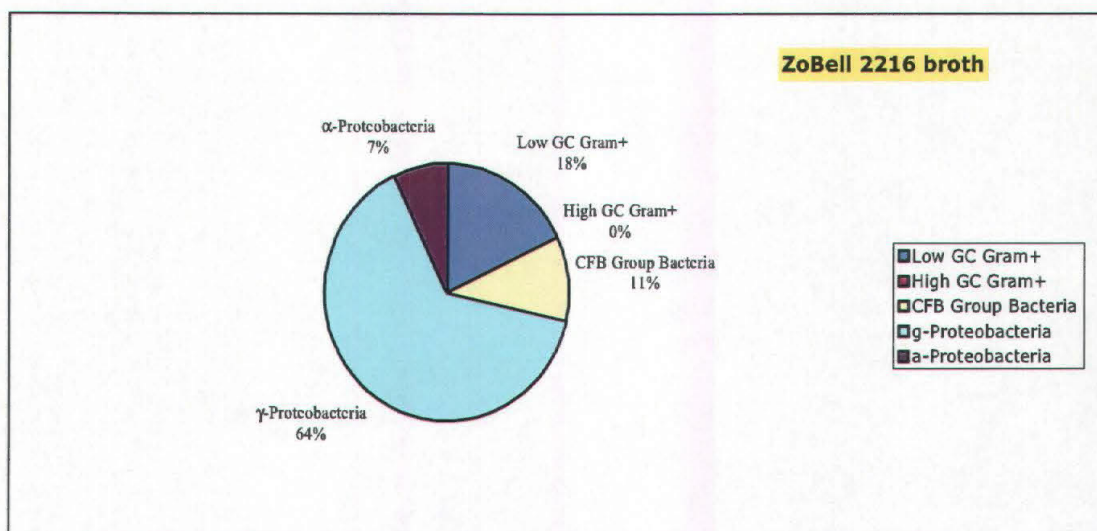


Fig. 2.2 Composizione percentuale dei diversi taxa di appartenenza dei ceppi batterici isolati sul terreno di coltura ZoBell 2216 broth.

Il terreno ZoBell 2216 arricchito con estratto di carne ha permesso l'isolamento preferenziale di ceppi Gram+ (83%); di questi l'8% appartiene al gruppo High GC con un'isolato (ZME6) affine al genere *Dietzia*, mentre il restante 75% appartiene al gruppo Low GC con gli isolati ZME1, ZME3, ZME4, ZME7, ZME10, ZME11, ZME13, ZME14 e ZME16 affini al genere *Bacillus*. Il 17% degli isolati su questo terreno appartiene al gruppo dei Gram- ; l'isolato ZME12 appartiene ai γ -Proteobacteria ed è affine al genere

Escherichia mentre, l'isolato ZME18 appartiene al CFB Group ed risulta affine a un batterio marino non identificabile a livello di genere (Fig. 2.3).

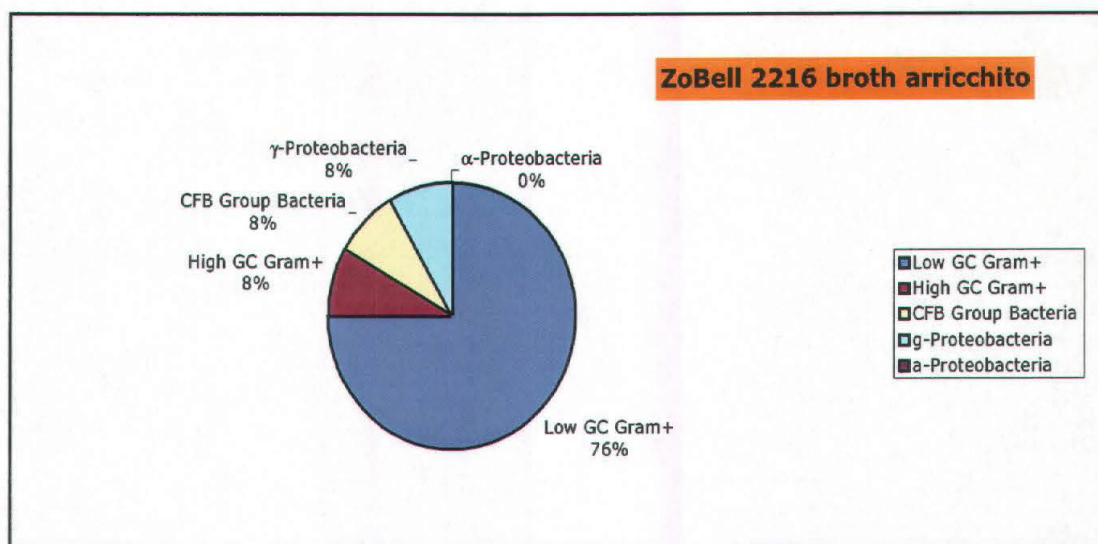


Fig. 2.3 Composizione percentuale dei diversi taxa di appartenenza dei ceppi batterici isolati sul terreno di coltura ZoBell 2216 broth arricchito.

La diversità specifica fra i vari isolati è stata messa in evidenza anche da alcune immagini effettuate al microscopio elettronico a scansione (Fig. 2.4).

2.4 Discussione

Mediante l'utilizzo di diversi terreni di coltura è stato possibile isolare ceppi batterici provenienti da campioni di aggregati mucilluginosi.

La caratterizzazione genetica, effettuata mediante l'analisi delle sequenze di frammenti del gene codificante per l'rRNA 16S, ha rivelato una considerevole diversità specifica fra i 57 ceppi batterici isolati. La percentuale d'identità delle sequenze esaminate

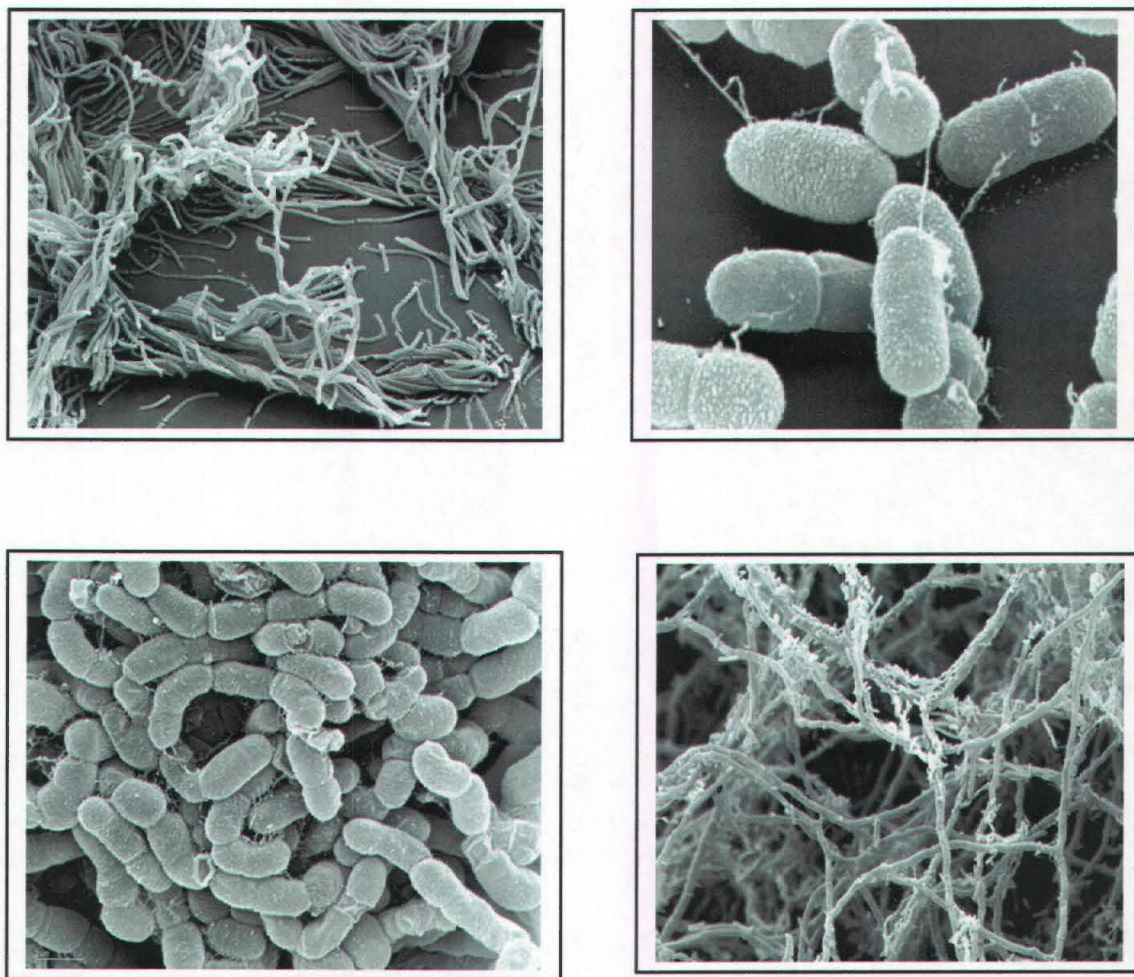


Fig. 2.4 Micrografie al microscopio elettronico a scansione di batteri isolati dagli aggregati mucilluginosi

nel presente studio con quelle disponibili in letteratura è risultata variabile fra l'89% e il 100%. La maggior parte degli isolati (α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Low GC Gram+ e High GC Gram+) mostra infatti un'elevata omologia (94-100%) con le sequenze di riferimento disponibili nella banca dati, mentre alcuni isolati presentano una bassa percentuale di somiglianza (89%). Un basso valore di somiglianza potrebbe essere indice di un nuovo genere (Devereux et al., 1990). Queste osservazioni concordano con altre recenti segnalazioni sulla prevalenza di nuovi generi batterici tra le specie cresciute in

coltura (Rehnstam et al., 1993; Bowman et al., 1997; Kalmbach et al., 1997; Pinhassi et al., 1997; Suzuki et al., 1997).

Più della metà degli isolati appartiene al gruppo dei Gram+ (31 Low GC e 1 High GC), mentre 19 isolati appartengono ai γ -Proteobacteria, 2 al taxon α -Proteobacteria e 4 al CFB Group. La notevole presenza di organismi affini al genere *Bacillus* (Low GC Gram+) potrebbe essere dovuta alla loro capacità di produrre spore resistenti alle basse temperature utilizzate per la conservazione dei campioni (Madigan et al., 2000; Balows et al., 1992; Holt et al., 1994). Quest'ipotesi viene confermata dal fatto che gli organismi batterici isolati dagli aggregati mucillaginosi immediatamente dopo la loro raccolta (i campioni indicati nella Tab. 2.3 con un asterisco) esprimono una maggiore diversità specifica e appartengono a generi tipicamente marini. Nel presente studio non sono stati trovati organismi dulciacquicoli del taxon β -Proteobacteria, analogamente a quanto risulta dai risultati di Rath et al. (1998) sui batteri presenti in campioni di neve marina raccolti nel Golfo di Trieste. I risultati ottenuti differiscono da quelli recentemente pubblicati relativi ad aggregati d'acqua dolce (Weiss et al., 1996): la maggior parte dei batteri risultavano appartenenti a questo taxon. Le principali differenze esistenti tra i sistemi d'acqua dolce e quelli marini possono spiegare la diversità tra le due comunità microbiche. La composizione e concentrazione dei nutrienti, la salinità, le variazioni di temperatura annuale, le specie fitoplanctoniche da cui in parte deriva il materiale organico sul quale la comunità microbica si sviluppa sono ben diversi nei due sistemi. Quindi non sorprende rilevare differenze nella composizione filogenetica delle comunità batteriche tra macroaggregati marini e di acque dolci (Rath et al., 1998).

Le comunità batteriche che si sviluppano negli aggregati si differenziano notevolmente anche dalle comunità batteriche che caratterizzano la colonna d'acqua, così come si evince anche dai lavori di DeLong et al. (1993) e Bidle & Fletcher (1995). Questa differenza relativa alla composizione specifica dei due popolamenti microbici risulta evidente anche dal confronto con i dati precedentemente raccolti su colonna nel Golfo di Trieste (Zuzic, 2001). Questi dati suggeriscono potenziali differenze nella capacità metabolica dei batteri adesi alle particelle e di quelli liberi.

I batteri isolati dal muco durante lo svolgimento della presente ricerca sono affini ad organismi che, in ambienti naturali, vivono in condizioni estremamente differenti. È evidente la maggiore selettività del terreno MPG: su di esso si sviluppano batteri non specificamente marini. Si tratta di organismi ubiquitari in natura: sono presenti, infatti, nelle acque dolci, in mare, ma soprattutto nelle acque di percolazione del suolo e nelle acque di trattamento (Balows et al., 1992; Holt et al., 1994; Vary, 1994; Barak & van Rijn, 2000; Greene et al., 2000; Madigan et al., 2000; Helgason et al., 2000). I terreni ZoBell 2216 e ZoBell 2216 arricchito, preparati con acqua di mare, rappresentano le condizioni più prossime a quelle dell'ambiente marino. Su di essi sono stati isolati, infatti, soprattutto batteri largamente diffusi nei diversi ecosistemi marini (*Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*) (Balows et al., 1992; Holt et al., 1994; Gonzalez & Moran, 1997; Madigan et al., 2000; Sigalevich et al., 2000). I terreni ZoBell 2216 e ZoBell 2216 arricchito differiscono per un'aggiunta di carne e la diversa composizione chimica ha determinato una selezione di organismi diversi. Un incremento nella concentrazione di substrato nel terreno può portare, infatti, ad un cambiamento nella composizione specifica degli isolati (Pinhassi et al., 1999).

Dai risultati ottenuti appare evidente come la composizione specifica della comunità batterica del muco sia molto complessa, costituita da specie provenienti da ambienti completamente diversi tra loro. L'estrema variabilità dei batteri del muco sembra sia legata ai loro diversi ruoli nei processi biogeochimici marini, in quanto alcuni gruppi sono specializzati, molto più di altri, nell'utilizzo di alcuni substrati la cui concentrazione varia nel tempo e nello spazio.

I 57 ceppi isolati appartengono a gruppi tassonomici distanti geneticamente. I batteri Gram+ del gruppo Low GC risultano ben lontani dai batteri Gram- ((α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e CFB Group). I batteri Gram+ del gruppo High GC risultano in posizione intermedia tra i due gruppi. La distanza filogenetica basata sull'analisi della sequenza del gene per l'rRNA si riflette in una diversa "abilità" degli isolati nel degradare la sostanza organica.

A questo punto abbiamo focalizzato la nostra attenzione su alcuni degli organismi batterici isolati dagli aggregati mucilluginosi al fine di approfondire le nostre conoscenze sul loro comportamento in un ambiente così particolarmente interessante.

Capitolo 3: Analisi sperimentali di alcuni ceppi batterici isolati dagli aggregati mucillaginosi

3.1 Introduzione

Considerando che la produzione di essudati polisaccaridici, i quali possono portare alla produzione di aggregati mucillaginosi, è comune ad organismi appartenenti a diverse categorie tassonomiche in quanto è stata evidenziata in batteri, cianobatteri, diatomee e dinoflagellati, abbiamo deciso di studiare il fenomeno *in vitro* utilizzando alcuni ceppi batterici isolati da alcuni campioni di muco raccolti durante gli anni 1997 e 2000 nel Nord Adriatico (Fig. 1.2) secondo le modalità precedentemente descritte.

L'isolamento degli organismi batterici e la loro caratterizzazione genetica sono stati effettuati seguendo i protocolli descritti nei precedenti capitoli e utilizzando i tre diversi terreni di coltura già elencati. I diversi isolati sono stati inoculati in mezzi liquidi e poi si è proceduto all'analisi degli organismi sottoponendoli a diverse condizioni di temperatura e salinità per saggiare la produzione di muco; da un punto di vista operativo il muco è stato classificato in base alla morfologia in tre categorie:

- a) a fiocchi (aggregati di piccole dimensioni, lunghi da 0.5 mm a circa 1 cm);
- b) a filamenti (aggregati di forma allungata che presentano dimensioni superiori a 2 cm);
- c) a matrice densa e compatta (strato di aggregati molto consistente).

3.2 Condizioni sperimentali

Per questo tipo di analisi abbiamo utilizzato 8 ceppi batterici isolati sui tre diversi terreni di coltura (ZoBell 2216 ZoBell 2216 arricchito e MPG) ed provenienti da vari campioni di aggregati mucilluginosi (Tab. 3.1).

| Data | Campione | Terreno | Isolato | Organismo |
|------|----------|------------------------|---------|-----------------------|
| 2000 | St.C1 | ZoBell 2216 arricchito | fm 004 | Bacillus sp. |
| 2000 | St. C1 | GM | fm 004 | Bacillus sp. |
| 1997 | St. 101 | GM | fm 002 | Bacillus cereus |
| 2000 | St. C1 | GM | fm 008 | Bacillus pumilus |
| 1997 | St. 107 | GM | fm 005 | Bacillus mycoides |
| 1997 | St. 107 | ZoBell 2216 arricchito | fm 003 | Pseudoalteromonas sp. |
| 1997 | St. C1 | ZoBell 2216 | fm 002 | Marine bacterium |
| 1997 | St. 101 | ZoBell 2216 | fm 001 | P. atlantica |

Tab. 3.1 Lista dei batteri isolati dagli aggregati mucilluginosi

Gli 8 ceppi sono stati caratterizzati geneticamente attraverso l'identificazione della sequenza nucleotidica codificante per l'rRNA 16S della subunità minore dei ribosomi procariotici seguendo le metodiche precedentemente descritte e sono risultati appartenere a due gruppi nettamente distinti in relazione alla diversa origine ambientale, in quanto le specie del genere *Bacillus* si ritrovano solitamente nei suoli agricoli o nell'acque di trattamento, mentre le specie del genere *Alteromonas* sono prettamente marine.

Gli otto isolati sono stati successivamente inoculati nei rispettivi mezzi di coltura liquidi (ZoBell 2216 broth, ZoBell 2216 broth arricchito e GM broth) in cui avevamo prodotto un gradiente di salinità aumentando progressivamente la percentuale dell'acqua dolce rispetto all'acqua di mare (acqua di mare tal quale; 1:1 ; 1:3 ; 1:9) per i terreni

ZoBell 2216 broth e ZoBell 2216 broth arricchito, mentre per il terreno GM la concentrazione iniziale di NaCl di 100 mg l⁻¹ aumentava a 1000 mg l⁻¹, 10 g l⁻¹ fino al valore di 20 g l⁻¹ prossimo all'acqua di mare.

3.3 Risultati

Dopo 48 ore di incubazione a 22°C e a 26°C tutti gli isolati producevano muco riconducibile alle tre tipologie differenti citate sopra (Tab. 3.2).

| | | | Tal quale | 1:1 | 1:3 | 1:9 |
|------------------------|--------|--------|-----------|---------|-----------|-----------|
| ZoBell 2216 | C1 | fm 002 | matrice | matrice | matrice | matrice |
| ZoBell 2216 | St.101 | fm 001 | matrice | matrice | filamenti | filamenti |
| ZoBell 2216 arricchito | 107 | fm 003 | flocchi | flocchi | flocchi | flocchi |
| ZoBell 2216 arricchito | C1 | fm 004 | matrice | matrice | matrice | matrice |

| | | | 100 mg/L | 1000 mg/L | 10 g/L | 20 g/L |
|----|--------|--------|----------|-----------|---------|---------|
| GM | 101 | fm 002 | flocchi | flocchi | flocchi | flocchi |
| GM | C1 | fm 004 | flocchi | flocchi | flocchi | flocchi |
| GM | C1 | fm 008 | matrice | matrice | matrice | matrice |
| GM | St.107 | fm 005 | flocchi | flocchi | flocchi | flocchi |

Tab 3.2 Tipologie di muco prodotto dagli isolati

Quantitativamente la produzione di muco era visibilmente maggiore nei tubi con il terreno naturale o lievemente modificato (GM = 1000 mg l⁻¹, mentre per ZoBell 2216 broth e ZoBell 2216 broth arricchito =1:1), e non si notavano sostanziali differenze dovute alle due diverse temperature utilizzate durante gli esperimenti .

Dal punto di vista qualitativo tutti i ceppi batterici cresciuti nel GM broth e appartenenti al gruppo dei Gram+ Low GC sono affini al genere *Bacillus* e hanno prodotto aggregati di piccole dimensioni (fiocchi) ad eccezione dell'isolato fm 008 che, lungo tutto il gradiente di salinità, ha prodotto una matrice mucillaginosa piuttosto densa e compatta.

I due organismi cresciuti nello ZoBell 2216 broth hanno mostrato comportamenti diversi: l'isolato fm 002 appartenente al gruppo dei γ -Proteobacteria ed affine a un batterio marino non identificabile a livello di genere, ha prodotto una matrice compatta lungo tutto il gradiente, mentre l'isolato fm 001 affine alla specie *Pseudoalteromonas atlantica* (γ -Proteobacteria) ha prodotto una matrice mucillaginosa compatta in condizioni di salinità più "marine", mentre ha prodotto fiocchi di piccole dimensioni in condizioni maggiormente "dulciacquicole".

Infine, l'isolato fm 003 cresciuto nello ZoBell 2216 arricchito e affine al genere *Pseudoalteromonas* (γ -Proteobacteria) ha prodotto fiocchi di piccole dimensioni lungo tutto il gradiente di salinità, mentre l'isolato fm 004, cresciuto nello stesso terreno, e affine al genere *Bacillus* (Gram+ Low GC) ha prodotto una matrice mucillaginosa densa e compatta.

3.4 Discussione

I risultati preliminari, che abbiamo ottenuto da questi semplici esperimenti *in vitro*, indicano che la variazione della temperatura non è un fattore che influenza, in queste particolari condizioni, la produzione del muco quantitativamente e nemmeno qualitativamente. Anche la salinità, che è un importante fattore di regolazione della crescita

batterica in certi ambienti, non ha avuto un'influenza determinante sulla produzione del materiale mucillaginoso, fatta eccezione per l'isolato fm 001 affine alla specie *Pseudoalteromonas atlantica* (γ -Proteobacteria) che ha prodotto una matrice mucillaginosa compatta in condizioni di salinità più "marine", mentre ha prodotto fiocchi di piccole dimensioni in condizioni maggiormente "dulciacquicole".

La produzione di diverse tipologie di aggregati mucilluginosi sembra, pertanto, essere maggiormente legata alla diversità specifica degli organismi batterici e alla diversa composizione chimica del materiale organico a disposizione. E in effetti l'isolato fm 004 affine al genere *Bacillus* cresciuto in due terreni diversi (ZoBell 2216 broth arricchito e GM broth) ha prodotto muco di due tipologie diverse (matrice densa e compatta e fiocchi di piccole dimensioni).

Queste considerazioni stimolano la ricerca, da un lato, verso una comprensione sempre più profonda della composizione specifica della comunità batterica degli aggregati mucilluginosi e dall'altra ad una caratterizzazione sempre più fine della componente organica degli aggregati stessi. Studi recenti, ad esempio, hanno evidenziato la preferenza di alcune specie batteriche per particolari nutrienti o substrati presenti in diversi ecosistemi marini (Pernthaler et al, 2001; Kisand et al., 2002; Pinhassi & Berman, 2003).

Risulta, quindi, di fondamentale importanza riuscire a isolare ed a identificare il maggior numero di specie batteriche presenti in microambienti particolari come gli aggregati mucilluginosi per essere in grado di studiarne a fondo la fisiologia e persino i loro sistemi di comunicazione al fine di comprendere i loro meccanismi d'azione.

Capitolo 4: Analisi di un possibile meccanismo di Quorum Sensing in alcuni ceppi batterici isoalti dagli aggregati mucilluginosi

4.1 Introduzione

La scoperta, avvenuta negli ultimi anni, della comunicazione che ha luogo fra batteri Gram negativi e che si traduce nell'espressione di alcuni geni in risposta a segnali provenienti dalla comunità batterica (Swift et al., 1993; Fuqua et al., 1996; Cha et al., 1998; Gram et al., 1999; Bassler, 2002) ha aperto nuovi orizzonti alla comprensione del comportamento di questi organismi. È stato evidenziato che la maggior parte dei batteri Gram negativi è in grado di rilasciare una piccola molecola che agisce da segnale chimico (feromone batterico) che in diversi batteri regola un certo numero di processi fisiologici quali la bioluminescenza, la produzione di antibiotici, il trasferimento di plasmidi. Alcune di queste molecole "comunicative", chiamate autoinduttori e provenienti da batteri Gram negativi sono state purificate ed è stata determinata la loro struttura scoprendo così che si tratta di N-acil omoserin lattoni (N-AHLs) (Fig. 4.1).

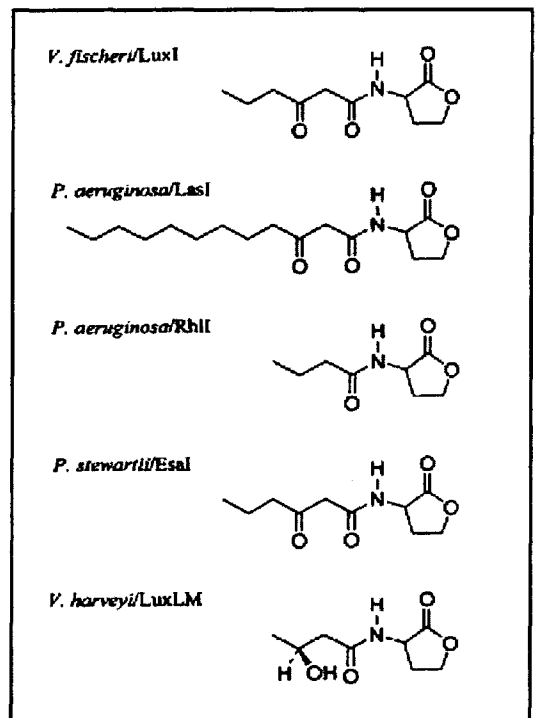


Fig. 4.1 Struttura degli AHLs

La strategia che lega la produzione di materiale extracellulare ad un aumento del numero di cellule batteriche è stata denominata “quorum sensing”. Aumentando di numero i batteri producono questo segnale e la capacità di percepire l’incremento della concentrazione degli N-AHLs consente loro di monitorare in maniera indiretta la loro concentrazione nell’ambiente. Quando le cellule batteriche raggiungono una certa densità l’autoinduttore è presente in una concentrazione sufficiente ad attivare il processo trascrizionale di uno specifico gene. A livello genetico il sistema del quorum sensing appare piuttosto semplice; solitamente in singolo gene è responsabile per la generazione del segnale e un secondo gene, un attivatore, innesca l’espressione di un gene specifico dopo che la proteina attivatore ha interagito con la molecola segnale e questo accade soltanto quando la concentrazione intracellulare della molecola segnale ha raggiunto una certa concentrazione (Fig. 4.2).

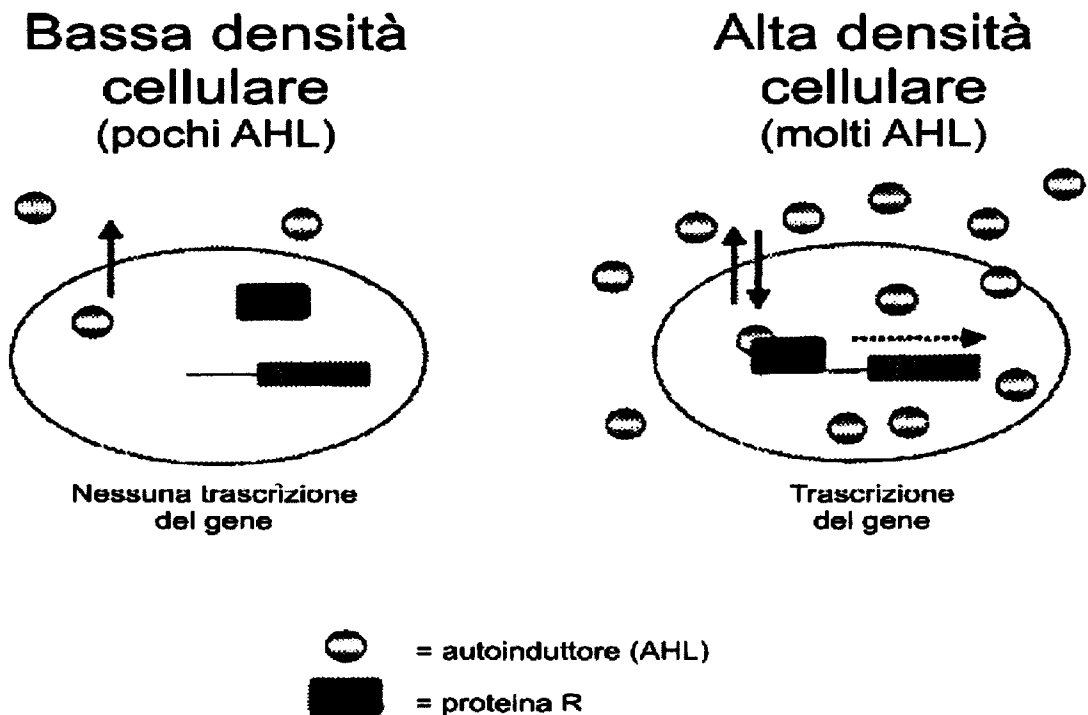


Fig. 4.2 Quorum sensing nei batteri Gram negativi

Gli autoinduttori N-AHL sono derivati dalla S-adenosyl metionina (SAM). La funzione fisiologica generale di questo sistema di comunicazione chimica sembra essere la regolazione di diversi processi metabolici in relazione alla densità cellulare. In una prospettiva evuzionistica, l'azione di questi autoinduttori può essere considerata un esempio di multicellularità nella popolazione batterica.

Poiché all'interno degli aggregati mucillaginosi i batteri risultano estremamente più abbondanti rispetto all'acqua circostante e la comunità, come abbiamo osservato, è caratterizzata da un'elevata diversità, e avendo, inoltre, già sottolineato come gli aggregati risultano essere un microambiente all'interno del quale i batteri sono metabolicamente più attivi di quelli presenti nella colonna d'acqua ed evidenziano una rilevante attività enzimatica potenziale (Karner & Herndl, 1992; Smith et al., 1992; Smith et al., 1995; Agis et al., 1998; Grossart & Simon, 1998; Worm & Sondergaard, 1998; Del Negro et al. 2000) abbiamo deciso di indagare se alcuni degli organismi isolati avessero la capacità di operare con un tale sistema di comunicazione. A tal fine siamo andati ad osservare se questi isolati erano in grado di produrre degli autoinduttori, le molecole necessarie per consentire al "quorum sensing" di funzionare.

Per poter dimostrare la produzione dell'autoinduttore (N-AHL) da parte di ceppi batterici viene utilizzato un sistema di monitoraggio batteriologico (Swift et al., 1993; Cha et al., 1998; Gram et al., 1999). Questo sistema consta di una risposta fenotipica (bioluminescenza, produzione di violacina o attività β -galattosidica) attivata attraverso una proteina-recettore di un autoinduttore. Ciascun recettore risponde a una diversa gamma di autoinduttori (McClellan et al., 1997; Cha et al., 1998; Winson et al., 1998).

In un test chiamato T-streak abbiamo utilizzato come biosensore il ceppo batterico A136 della specie *Agrobacterium tumefaciens* che produce un colore blu in presenza del 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galattopiranoside (X-Gal) in risposta all'autoinduttore. Il biosensore viene piastrato accanto al ceppo da analizzare e poiché l'autoinduttore (l'AHL) riesce a diffondersi, la sua presenza provoca un cambiamento di colore negli organismi considerati.

È inoltre importante, al fine di comprendere il meccanismo del quorum sensing, valutare i tipi di autoinduttori prodotti da un ceppo o da una popolazione batterica. Per analizzare la struttura dell'autoinduttore viene utilizzata la risonanza magnetica nucleare (NMR), ma attraverso l'utilizzo dei biosensori è possibile mettere a punto un metodo di identificazione più rapido e meno costoso. L'identificazione può essere basata sulla separazione delle sostanze estratte dai batteri attraverso una cromatografia su strato sottile (TLC, thin layer chromatography) e sul successivo sviluppo della lastra ricoperta da un biosensore, nel nostro caso il ceppo batterico A136 della specie *Agrobacterium tumefaciens* (McClellan et al., 1997; Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998).

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Ceppi batterici e condizioni di coltura

Abbiamo preso in esame due ceppi batterici isolati su due terreni di coltura diversi: l'isolato Z12 cresciuto su ZoBell 2216 e l'isolato ZME18 cresciuto su ZoBell 2216 arricchito. Entrambi i ceppi sono affini a batterini marini appartenenti al CFB Group non identificabili a livello di genere. I due ceppi considerati sono cresciuti nei rispettivi terreni

di coltura liquidi (ZoBell broth 2216 e ZoBell broth 2216 arricchito) alle stesse condizioni del precedente esperimento. Il biosensore *Agrobacterium tumefaciens* A136 è cresciuto in un mezzo di coltura denominato LB (Luria-Bertani) (1% peptone, 0.5% lievito, 0.5% NaCl) (Bertani, 1951) solidificato con l'1.2% di agar e contenente due antibiotici, la tetraciclina (4.5 µg/ml) e la spectinomicina (50 µg/ml), e l'X-Gal 40 µg/ml.

4.2.2 Rilevazione dell'autoinduttore

Ciascun ceppo batterico da analizzare (Z12 e ZME18) è stato piastrato su una piastra contenente dell'LB agar parallelamente al ceppo batterico biosensore. Le piastre sono state incubate per 24 h a 25°C prima dell'inoculo del biosensore *Agrobacterium tumefaciens* A136. Successivamente, le piastre sono state nuovamente incubate a 25°C per poter leggere l'eventuale risposta positiva determinata dalla comparsa del colore blu.

4.2.3 Estrazione del surnatante per la cromatografia su strato sottile (TLC)

5 ml di surnatante della coltura di ciascuno dei due ceppi presi in esame sono stati mescolati con un egual volume di etilacetato in presenza di acido acetico glaciale 0.1%. Dopo mescolamento, la fase di etilacetato è stata rimossa e l'estrazione è stata ripetuta due volte; il solvente è stato separato dal surnatante, fatto evaporare e l'estratto è stato risospeso in 1 ml di etilacetato, nuovamente fatto evaporare e risospeso definitivamente in 10 µl di etilacetato.

4.2.4 Cromatografia su strato sottile (TLC)

10 μ l di estratto dal surnatante della coltura di ciascuno dei due ceppi batterici considerati sono stati caricati su una lastra TLC-C₁₈ di alluminio ricoperta con una matrice a base di silice e con alcuni autoinduttori sintetici di riferimento (C4, C6, C8, C10 e C12-AHL). Successivamente la lastra TLC è stata sviluppata in 200 ml di una miscela costituita dal 60% di etanolo e dal 40% di acqua. Lo sviluppo della lastra è durato approssimativamente 4 ore. Dopo lo sviluppo la lastra è stata fatta asciugare ed è stata ricoperta da dell'agar LB fuso contenente il biosensore *Agrobacterium tumefaciens* A136.

4.3 Risultati

Entrambi i ceppi batterici (Z12 e ZME18) isolati dagli aggregati mucilluginosi hanno espresso un risultato positivo durante il test T-streak (Fig. 4.3).

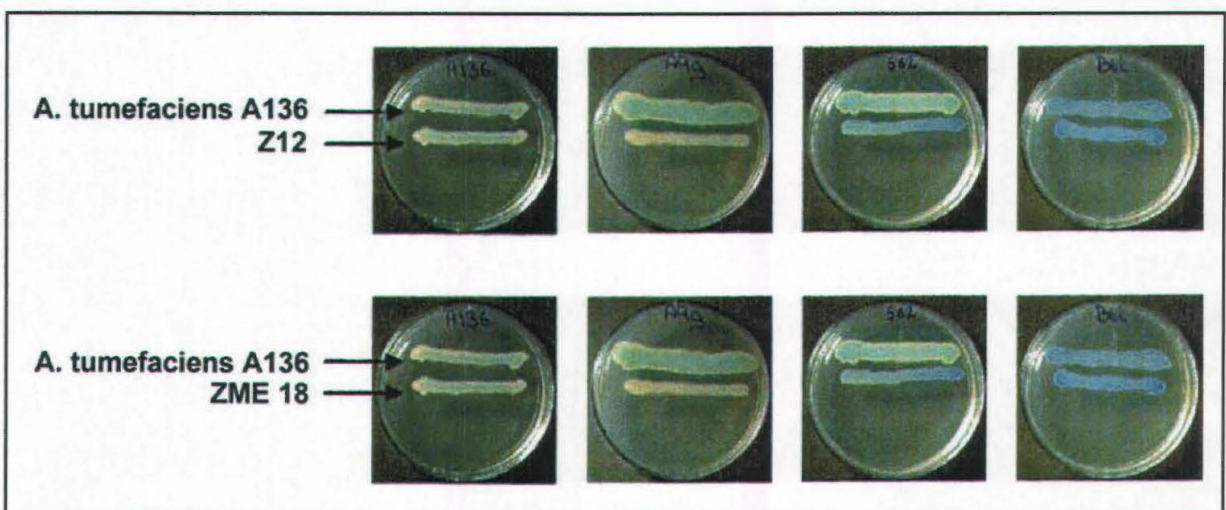


Fig. 4.3 Risultati dello T-streak sui due ceppi considerati

Questo risultato evidenzia la presenza dell'autoinduttore (AHL) nei due ceppi considerati e conferma quindi la possibilità di questi organismi batterici di servirsi del quorum sensing.

La fig. 4.4 mostra i risultati della cromatografia su strato sottile (TLC).

Risulta evidente una certa somiglianza fra gli autonduttori espressi dai due isolati e alcuni degli autoinduttori sintetici utilizzati come riferimento. È chiaro che il passo successivo dovrebbe portare ad una caratterizzazione completa dell'autoinduttore presente nei ceppi isolati al fine di poter conoscere la sua struttura e il suo ruolo nel processo di comunicazione.

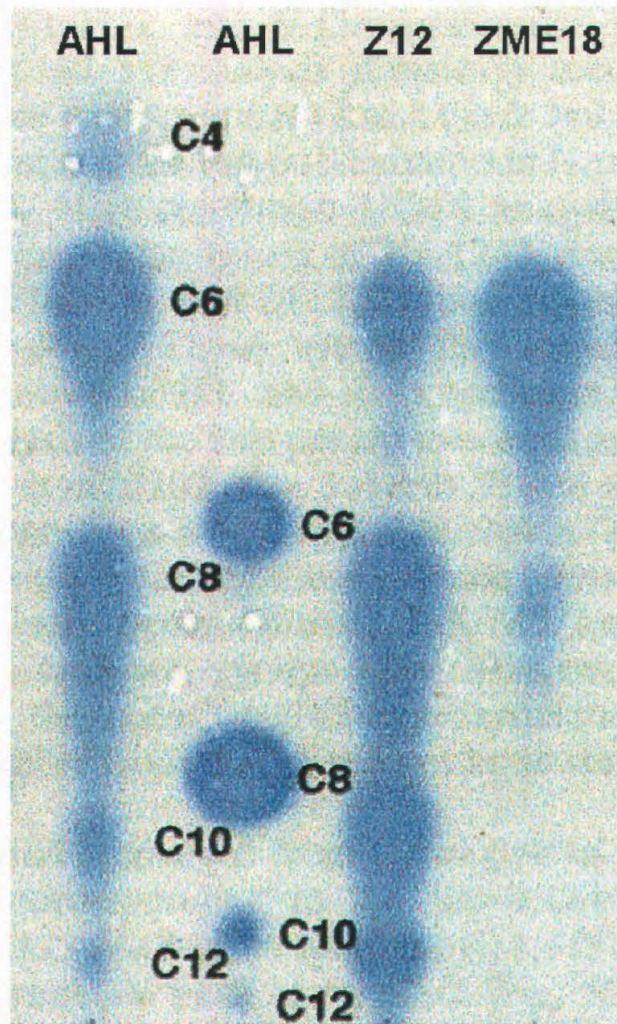


Fig. 4.4 TLC dei batteri isolati

4.4 Discussione

Abbiamo dimostrato che alcuni ceppi batterici isolati dagli aggregati mucilluginosi producono autoinduttori (AHL) che fungono da segnali chimici nel sistema di comunicazione denominato "quorum sensing". Questi risultati erano già stati ottenuti su

alcuni organismi batterici isolati, appartenenti al gruppo degli α -Proteobacteria, da aggregati di neve marina (Gram et al., 2002). I batteri presenti negli aggregati mucillaginosi raggiungono densità cellulari notevoli e, come abbiamo già sottolineato, sono caratterizzati da una rilevante attività enzimatica potenziale, il che potrebbe giustificare la capacità di utilizzare un sistema di comunicazione come il quorum sensing per ottimizzare il loro metabolismo all'interno degli aggregati. Poiché gli autoinduttori (AHLs) sono comunemente coinvolti nella produzione di antibiotici e di attività enzimatiche idrolitiche, è facile immaginare che questi AHLs consentano ai batteri presenti in questo ambiente particolare di esprimere particolari fenotipi. Questi risultati preliminari sono un'importante stimolo per proseguire la ricerca e la caratterizzazione degli autoinduttori nei batteri presenti negli aggregati al fine di confermare il ruolo del quorum sensing fra questi particolari organismi.

Capitolo 5: Conclusioni

Il presente lavoro costituisce un primo passo verso la comprensione della complessa struttura della comunità batterica all'interno degli aggregati mucillaginosi e del ruolo svolto dai batteri stessi.

L'utilizzo di tecniche di biologia molecolare, quali la PCR e il DGGE, ha consentito di osservare da vicino la diversità specifica della comunità presente negli aggregati e di confrontarla con quella presente nella colonna d'acqua circostante. I risultati hanno evidenziato che il muco, per la sua specifica composizione molecolare, rappresenta un sorta di "trappola" per specie batteriche appartenenti anche ad ambienti diversi da quello marino e questo rappresenta un ulteriore stimolo per approfondire lo studio di questa comunità batterica.

I diversi terreni di coltura impiegati e, nuovamente, l'utilizzo della biologia molecolare, ha permesso di ottenere conoscenze precise sulla composizione specifica della comunità batterica consentendo, oltre all'identificazione degli organismi, la loro coltura e, quindi, la disponibilità per il loro utilizzo in altri esperimenti al fine di poter comprendere meglio la loro fisiologia.

Gli esperimenti condotti *in vitro* al fine di valutare la produzione di diversi tipi di muco hanno consentito di evidenziare alcune differenze fra i diversi ceppi e l'opportunità di studiare nell'immediato futuro la composizione di questo materiale mucillaginoso per poterlo, in seguito, confrontare, con quello raccolto in mare aperto.

L'individuazione, infine, in alcuni ceppi batterici di particolari segnali chimici (gli autoinduttori) di comunicazione intercellulare (il "quorum sensing") ha consentito di

gettare uno sguardo sui possibili meccanismi di espressione fenotipica (produzione di esoenzimi) all'interno degli aggregati mucillaginosi.

Riteniamo, quindi, importante continuare nell'approfondimento dello studio della comunità batterica presente negli aggregati mucillaginosi per ottenere sempre maggiori informazioni necessarie per la completa comprensione del fenomeno.

Capitolo 6: Bibliografia

Acinas, S. G., F. Rodriguez-Valera, P.-A. Carlos. 1997. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:27-40.

Agis, M., M. Unanue, J. Irriberry, G. J. Herndl. 1998. Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles. Part II. Cleavage and uptake of carbohydrates. *Microb. Ecol.* **36**: 66-74.

Aldredge, A. L., U. Passow, B. E. Logan. 1993. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep Sea Res.* **40** (6):1131-1140.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.

Amon, R. M. W., R. Benner. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* **41** (1):41-51.

Arnosti, C., D. J. Repeta, N. V. Blough. 1994. Rapid bacterial degradation of polysaccharides in anoxic marine systems. *Geochimica et Cosmologica Acta* **58** (12): 2639-2652.

Artegiani, A., D. Bregant, E. Paschini, N. Pinardi, F. Raicich, A. Russo, P. 1997. The Adriatic Sea general circulation. Part II: baroclinic circulation structure. *J. Physic. Oceanogr.* **27**:1515-1532.

Arteghiani, A., M. Gacic, A. Michelato, V. Kovacevic, A. Russo, E. Paschini, P. Scarazzato, A. Smircic. 1993. The Adriatic Sea hydrography and circulation in spring and autumn (1985-1987). *Deep-Sea Res. II.* **40** (6):1143-1180.

Azam, F. 1998. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science* **280**:694-696.

Azam, F., S. Fonda Umani, E. Funari. 1999. Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **35** (3):411-419.

Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L.-A. Meyer-Reil, T. F. Thingstad. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**:257-263.

Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer. 1992. The Prokaryotes. Second Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Volume I-IV. Springer-Verlag, New York Inc.

Bano, N., J. T. Hollibaugh. 2002. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton Assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:505-518.

Barak, J., J. van Rijn. 2000. Relationship between Nitrite Reduction and Active Phosphate Uptake in the Phosphate-Accumulating Denitrifier *Pseudomonas* sp. Strain JR 12. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12):5236-5240.

Bassler, B. L. 2002. Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* **109**:421-424.

Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. *J. Bacteriol.* **62**:293-300.

Bidle, K. D., M. Fletcher. 1995. Comparison of Free-Living and Particle-Associated Bacterial Communities in the Chesapeake Bay by Stable Low-Molecular-Weight RNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:944-952.

Bowman, J. P., S. A. McCammon, M.V. Brown, D. S. Nichols, T. A. McMeekin. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **97**:3068-3078.

Bratbak, G., M. Heldal, T. F. Thingstad, B. Riemann, O. H. Haslund. 1992. Incorporation of viruses into the budget of microbial C-transfer. A first approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **83**:273-280.

Burba, N., M. Cabrini, P. Del Negro, S. Fonda Umani, L. Milani. 1994. Variazioni stagionali del rapporto N/P nel Golfo di Trieste. *Atti del 10° Congresso AIOL.* p. 333-344.

Cataletto, B., E. Feoli, S. Fonda Umani, M. Monti, I. Pecchiar. 1996. Analyses of relationships between mucous aggregates and phytoplankton communities in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea) by multivariate techniques. *Proceedings of 29th EMBS, PSZN.* *Mar. Ecol.* **17**:291-308.

Cha, C., P. Gao, Y.-C. Chen, P. D. Shaw, S. K. Farrand. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:1119-1129.

Chin, W. C., M. V. Orellana, P. Verdugo. 1998. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature.* **391**:568-572.

Cho, B. C., F. Azam. 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **63**:253-259.

Chróst R. J. 1990. Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: Overbeck J., Chróst R. J. (eds). Aquatic microbial ecology. Biochemical and molecular approaches. Springer-Verlag, Berlin. p. 47-78.

Cole, J. J., S. Findlay, M. L. Pace. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43**:1-10.

De Angelis, F., M. V. Barbarulo, M. Bruno, L. Volterra, R. Nicoletti. 1993. Chemical composition and biological origin of "dirty sea" mucilages. *Phytochemistry.* **34**:393-395.

Decho, A. W., G. Herndl. 1995. Microbial activities and the transformation of organic matter within mucilaginous material. *Sci. Tot. Environ.* **165**:33-42.

Degobbis, D., A. Malej, S. Fonda Umani. 1999. The mucilage phenomenon in the Northern Adriatic - a critical review of the present scientific hypotheses. *Ann. Ist. Sup. Sanità.* **35** (3):373-381.

Degobbis, D., S. Fonda Umani, P. Franco, A. Malej, R. Precali, N. Smodlaka. 1995. Changes in the Northern Adriatic ecosystem and appearance of hypertrophic gelatinous aggregates. *Sci. Tot. Environ.* **165**:43-58.

Degobbis, D., R. Precali, I. Ivancic, N. Smodlaka, D. Fuks, S. Kveder. 1999. Long term changes in the northern Adriatic ecosystem related to antropogenic eutrophication. *Int. J. Environ. Poll.* **32**:817-825.

del Giorgio, P. A., J. J. Cole. 2000. Bacterial energetics and growth efficiency. In: Kirchman D. L. (ed). *Microbial ecology of the oceans.* p. 289-325.

Del Negro, P., R. A. Long, P. Ramani, C. Welker, A. Puddu, S. Fonda Umani, F. Azam. 2000. Efficienza del circuito microbico in presenza di mucillagine. *Biol. Mar. Medit.* **7** (1): 214-221.

DeLong E.F. 1997. Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. *Tibtech* **15**:203-207.

DeLong, E. F., D. G. Franks, A. L. Alldredge. 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38**:924-934.

Devereux, R., G. W. Mufson. 1994. A phylogenetic tree of 16S rRNA sequences from sulfate reducing bacteria in a sandy marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3437-3439.

Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, J. S. Mattick. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* **19**:4008.

Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glöckner, R. Amann. 2000. Culturability and in situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3044-3051.

Eppley, R. W., S. G. Horrigan, J. A. Fuhrman, E. R. Brooks, C. C. Price, K. Sellner. 1981. Origins of dissolved organic matter in the Southern California waters. Experiments on the role of zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **6**:149-159.

Fandino, L. B., L. Riemann, G. F. Steward, R. A. Long, F. Azam. 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**:119-130.

Ferris, M.J., D. M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1375-1381.

Fogg, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* **26**:3-14.

Fogg, G. E. 1995. Some speculations on the nature of the pelagic mucilage of the northern Adriatic Sea. *Sci. Tot. Environ.* **165**:59-63.

Fonda Umani, S. 1996. Pelagic biomass and production in the Adriatic Sea. In: *The European Anchovy and its Environment*. Palomera J., Rubies P. (eds). *Sci. Mar.* **60** (Suppl.):65-77.

Fonda Umani, S. 2000. Dalla soluzione salina all'idrogel. *Biol. Mar. Medit.* **7** (1):140-154.

Fonda Umani, S., E. Ghirardelli, M. Specchi. 1989. Gli episodi di "mare sporco" nell'Adriatico dal 1729 ai giorni nostri. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia. Direzione Regionale dell'Ambiente (ed). P. 178.

Fonda Umani, S., P. Franco, E. Ghirardelli, A. Malej. 1992. Outline of oceanography and the plankton of the Adriatic Sea. In: *Marine Eutrophication and Population Dynamics. Proceedings of the 25th EMBS*. Colombo G., Ferrari L., Ceccherelli V. U., Rossi R. (eds). p. 347-365.

Forti, A. 1906. Alcune osservazioni sul "mare sporco" ed in particolare sul fenomeno avvenuto nel 1905. *Nuovo Giornale Botanico Italiano (NS)*. **13** (4):1-56.

Franco, P., A. Michelato. 1992. Northern Adriatic Sea: oceanography of the basin proper and of the western coastal zone. In: Marine Coastal Eutrophication. Vollenweider R.A., Marchetti R., Viviani R. (eds). Elsevier, New York. P. 36-52.

Fuhrman, J. A. 1992. Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web. In: Falkowski P.G., Woodhead A.D. (Eds.) Primary productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea. Plenum Press, New York, 361-383.

Fuhrman, J. A., C. A. Suttle. 1993. Viruses in marine planktonic system. *Oceanography*. 6:51-63.

Fuhrman, J. A., R. T. Noble. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.* 40 (7):1236-1242.

Fuhrman, J. A., and L. Campbell. 1998. Microbial microdiversity. *Nature* 393:410-411.

Fuhrman, J. A., K. McCallum, A. A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1294-1302.

Fuhrman, J. A., D. E. Comeau, Å. Hagström, A. M. Chan. 1988. Extraction from Natural Planktonic Microorganisms of DNA Suitable for Molecular Biological Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1426-1429.

Fuhrman, J. A., T. D. Sleeter, C. A. Carlson, L. M. Proctor. 1989. Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57:207-217.

Fuqua, W. C., S. C. Winans, E. P. Greenberg. 1994. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.

Fuqua, W. C., S. C. Winans, E. P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:727-751.

Giovannoni, S. J. 1991. The polymerase chain reaction. In: Sequencing and hybridization. Techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. p. 177-201.

Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**:60-63.

Giovannoni, S. J., M. S. Rappé, K. L. Vergin, N. L. Adair. 1996. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the green non-sulfur bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:7979-7984.

Gonzalez, J. M., M. A. Moran. 1997. Numerical Dominance of a Group of Marine Bacteria in the α -Subclass of the Class Proteobacteria in Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4237-4242.

Gram, L., A. B. Christiansen, L. Ravn, S. Moli, M. Givskov. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the *Enterobacteriaceae* isolated from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3458-3463.

Gram, L., H.-P. Grossart, A. Schlingloff, T. Kjørboe. 2002. Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by *Roseobacter* Strains Isolated from Marine Snow. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4111-4116.

- Greene, E. A., J. G. Kay, K. Jaber, L. G. Steimer, G. Voordow.** 2000. Composition of Soil Microbial Communities Enriched on a mixture of Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12):5282-5289.
- Grossart, H.-P., H. Plough.** 2001. Microbial degradation of organic and nitrogen on diatom aggregates. *Limnol. Oceanogr.* **46**:267-277.
- Grossart, H.-P., M. Simon.** 1998. Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquat. Microb. Ecol.* **15**:127-140.
- Hagström, Å., U. Larsson, P. Hörstedt, S. Normark.** 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to determination of bacterial growth in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:805-812.
- Hagström, Å., J. Pinhassi, U. L. Zweifel.** 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**:231-244.
- Harding, L. W., D. Degobbis, R. Precali.** 1999. Production and fate of phytoplankton: annual cycles and interannual variability. In: *Ecosystem at the Land-Sea Margin: Drainage Basin to Coastal Sea. Coastal and Estuarine Studies.* Malone T., Malej A., Harding L. W., Smolaka N., Turner R. E. (eds). **55**:131-172.
- Hedges, J. I.** 1992. Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Mar. Chem.* **39**:63-96.
- Helgason, E., O. A. Økstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, A. B. Kolsto.** 2000. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – One species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (6): 2627-2630.

- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Williams & Wilkins. p. 787.
- Honjio, S., M. R. Roman.** 1978. Marine copepod fecal pellets: production, preservation and sedimentation. *J. Mar. Res.* **36**:45-57.
- Hopkins, T. S.** 1999. Physical Control of the Eutrophic Response in the Northern Adriatic Illustrated by Nitrogen Budget from Elna Data. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **35** (3):355-363.
- Hoppe, H.G.** 1991. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: *Microbial enzymes in aquatic environments*. Chróst R. J. (ed). Springer-Verlag, New York. p. 60-95.
- Hoppe, H.G., S. J. Kim, K. Gocke.** 1988. Microbial decomposition in aquatic environments: combined processes of extracellular enzyme activity and substrate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:784-790.
- Jensen, A.** 1984. Excretion of Organic Carbon as Function of Nutrient Stress. In: *Marine Phytoplankton and Productivity*. Holm-Hansen O., Bolis L., Giles R. (eds). Springer-Verlag. p. 61-72.
- Kaeberlein, T., K. Lewis, S. S. Epstein.** 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* **296**:1127-1129.
- Kalmbach, S., W. Manz, U. Szewzyk.** 1997. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4164-4170.

Karner, M., G. Herndl. 1992. Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine snow associated bacteria. *Mar. Biol.* **113**: 341-347.

Kepkay, P. E. 1994. Particle aggregation and the biological reactivity of colloids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **109**:293-304.

Kisand, V., R. Cuadros, J. Wikner. 2002. Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic matter in the northern Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:379-388.

Koike, L., H. Shigemitsu, T. Kazuki, K. Kogure. 1990. Role of submicrometer particles in the ocean. *Nature.* **345**:242-244.

Kowalchuck, G. A., J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley, J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1489-1497.

Long, R. A., F. Azam. 1996. Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **10**:213-221.

Long, R. A., F. Azam. 2001. Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. *Aquatic Microbial Ecology* **26**:103-113.

Long, R. A., L. B. Fandino, G. F. Steward, P. Del Negro, P. Ramani, B. Cataletto, C. Welker, A. Puddu, S. Fonda Umani, E. Funari, F. Azam. 1998. Microbial response to mucilage in the Gulf of Trieste. *EOS, Transactions, American Geophysical Union.* **99** (1):63-64.

Madigan, M.T., J. M. Martinko, J. Parker. 2000. Brock Biology of Microorganisms. 9th Edition. International Edition. Prentice Hall International, Inc. p. 991.

Malej, A., P. Mozetic. 1996. Nutrient conditions, phytoplankton activity and production of extracellular substances in the coastal sea (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). In: Chemical Speciation in the Marine Environment, 14th International Symposium of Chemistry of the Mediterranean, Primosten, Croatia. p. 37-38.

Marchetti, R., A. Provini, G. Crosa. 1989. Nutrient load carried by the river Po into the Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. **20** (4): 168-172.

Martinez, J., D. C. Smith, G. F. Steward, F. Azam. 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. Aquat. Microb. Ecol. **10**:223-230.

McCarthy, M., J. Hedges, R. Benner. 1996. Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. Mar. Chem. **55**:281-297.

McClellan, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. A. B. Williams. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. Microbiol. **143**:3703-3711.

Miletto, M. 2001. Caratterizzazione di batteri isolati dagli aggregati mucilluginosi dell'estate 2000 nel Golfo di Trieste. Tesi di Laurea in Scienze Naturali. Università di Trieste. p. 111.

Monti, M., C. Welker, G. Dellavalle, L. Casaretto, S. Fonda Umani. 1995. Mucous aggregates under natural and laboratory conditions. Sci. Tot. Environ. **165**:145-154.

Moeseneder, M. M., C. Winter, 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. *Limnol. Oceanogr.* **46**:95-107.

Mozetic, P., V. Turk, A. Malej, S. Terzic, M. Ahel, G. Cauwet. 1997. Coastal plankton response to nutrient enrichment: an experimental system. In: *Water Pollution IV Modelling, Measuring and Prediction*. Rajar R. Brebbia B. A. (eds). Computational Mechanics Publication, Southampton. P. 151-160.

Mullins, T. D., T. B. Britschgi, R. L. Krest, S. J. Giovannoni. 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* **41**:148-158.

Münster, U., R. J. Chróst. 1990. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter. In: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*. Overbeck J., Chróst R. J. (eds). Springer-Verlag, New York. **190**:8-46.

Murray, A. E., J. T. Hollibaugh, C. Orrego. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2676-2680.

Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu, E. F. DeLong. 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2585-2595.

Muyzer, G., E. C. De Waal, A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.

Mykkestad, S. 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratios, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. Willei (Gran.) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **29**: 161-179.

Nissen, H., P. Nissen, F. Azam. 1984. Multiphasic uptake of D-glucose by an oligotrophic marine bacterium. Mar. Ecol. Prog. Ser. **16**:155-160.

Øvreås, L., L. Forney, F. L. Daae F.L., V. Torsvik. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3367-3373.

Pagnotta, R., M. Pettine, A. Puddu. 1999. General Features of the Adriatic Sea: the key role of carbon cycling. Ann. Ist. Super. Sanità. **35**(3):365-372.

Pernthaler, A., J. Pernthaler, H. Eilers, R. Amann. 2001. Growth patterns of two marine isolates: adaptations to substrate patchiness. Appl. Environ. Microbiol. **67**:4077-4083.

Pinhassi, J., T. Berman. 2003. Differential growth response of colony-forming α - and γ -Proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. Appl. Environ. Microbiol. **63**:199-211.

Pinhassi, J., U. L. Zweifel, Å. Hagström. 1997. Dominant Marine Bacterioplankton Species found among Colony-Forming Bacteria. Applied and Environmental Microbiology **63**:3359-3366.

Pinhassi, J., F. Azam, J. Hemphälä, R. A. Long, J. Martinez, U. L. Zweifel, Å. Hagström. 1999. Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquat. Microb. Ecol.* **17**:13-26.

Pomeroy, L. R. 1974. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *BioScience* **24**:499-504.

Rath, J., K. Y. Wu, G. J. Herndl, E. F. DeLong. 1998. High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**:261-269.

Rassoulzadegan, F. 1993. Protozoan patterns in the Azam-Ammerman's bacteria-phytoplankton mutualism. In: *Trends in Microbial Ecology*. Guerrero R., Pedros-Alio C: (eds). Spanish Society for Microbiology, Barcelona, p. 435-439.

Redfield, A. C., B. H. Ketchum, F. A. Richards. 1963. The influence of organisms on composition of the sea water. In: *The Sea*. Hill M. N. (ed). Wiley Interscience, New York. **2**:26-77.

Rehnstam, A.-S., S. Bäckman, D. C. Smith, F. Azam, Å. Hagström. 1993. Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microbiology Ecology*:161-166.

Revelante, N., M. Gilmartin. 1977. The effects of northern Italian rivers and Eastern Mediterranean ingressions on the phytoplankton of the Adriatic Sea. *Hydrobiology.* **56**:229-240.

Riemann, L., M. Middelboe. 2002. Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**:219-232.

Riemann, L. G. F. Steward, L. B. Fandino, L. Campbell, M. R. Landry, F. Azam. 1999. Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. *Deep-Sea Res.* **46**:1791-1811.

Rinaldi, A., R. A. Vollenweider, G. Montanari, C. R. Ferrari, A. Ghetti. 1995. Mucilages in Italian seas: the Adriatic and Tyrrhenian Seas, 1988-1991. *Sc. Tot. Environ.* **165**:165-183.

Rinaldi, A., G. Montanari, C. R. Ferrari, A. Ghetti, R. A. Vollenweider. 1998. Evoluzione dello stato trofico nelle acque costiere Emiliano Romagnole nel periodo 1982-1994. In: *Evoluzione dello stato trofico in Adriatico: analisi degli interventi attuali e future linee di intervento.* Regione Emilia Romagna, Bologna. p. 71-80.

Schauer, M., R. Massana, C. Pedròs-Aliò. 2000. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**:51-59.

Shaw, P. D., G. Ping, S. L. Daly, C. Cha, J. E. Cronan, K. L. Rinehart, S. K. Farrand. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:6026-6041.

Sheffield, V.C., D. R. Cox, L. S. Lerman, R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:232-236.

Schuster, S., G. J. Herndl. 1995. Formation and significance of transparent exopolymeric particles in the northern Adriatic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **124**:227-236.

Sieburth, J. M., V. Smetacek, J. Lenz. 1978. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* **23**:1256-1263.

Sigalevich, P., M. V. Baev, A. Teske, Y. Cohen. 2000. Sulfate Reduction and Possible Aerobic Metabolism of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in a Chemostat Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB under exposure to Increasing Oxygen Concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (11):5013-5018.

Simon, M., N. A. Welschmeyer, D. L., Kirchman. 1992. Bacterial production and the sinking flux of particulate organic matter in the subarctic Pacific. *Deep-Sea Res.* **39**:1997-2008.

Smith, D. C., M. Simon, A. L. Alldredge, F. Azam. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature.* **359**:139-142.

Smith, D. J., G. J. C. Underwood. 2000. The production of Extracellular Carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effect of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol.* **36**:321-333.

Søndergaard, M., M. Middelboe. 1995. A cross-system analysis of labile dissolved organic carbon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **118**:238-294.

Stachowitsch, M., N. Fanuko, M. Richter. 1990. Mucus aggregates in the Adriatic sea: an overview of stages and occurrences. *Mar. Biol.* **11**(4):327-350.

Steele, J. H. 1974. *The structure of Marine Ecosystems.* Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. p. 128.

Suzuki, M. T., M. S. Rappé, Z. W. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Ströbel, S. J. Giovannoni. 1997. Bacterial Diversity among Small-Subunit rRNA Gene Clones and Cellular Isolates from the Same Seawater Sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:983-989.

Swift, S., M. K. Winson, P. F. Chan, N. J. Bainton, M. Birdsall, P. J. Reeves, C. E. D. Rees, S. R. Chabra, P. J. Hill, J. P. Throup, B. W. Bycroft, G. P. C. Salmond, P. Williams, G. S. A. B. Stewart. 1993. A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**:511-520

Tanaka, H., N. Kurano, S. Ueda, Y. Miura. 1985. Model system of bulking and flocculation in mixed culture of *Sphaerotilus* sp. and *Pseudomonas* sp. For dissolved oxygen deficiency and high loading. *Water. Res.* **19**:563-571.

Thingstad, T. F., Å. Hagström, F. Rassoulzadegan. 1997. Accumulation of degradable DOC in surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnol. Oceanogr.* **42** (2):398-404.

UNESCO. 1978. Proceedings of the meeting of the National Committee for the International Hydrobiological Programme of Mediterranean Countries. Rome, 9-12 October, 1978. UNESCO, Parigi (IMP/MED/1).

Vary, P. S. 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiol.* **140**:1001-1003.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.

Weiss, P., B. Schweitzer, R. Amann, M. Simon. 1996. Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1998-2005.

Welker, C., M. Monti. 1994. Polysaccharide flocculation from the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (HER.) Reimann & Lewin under nutrient starvation. *Giornale Botanico Italiano.* **128** (6): 1078-1081.

Wells, M. L. 1998. A neglected dimension. *Nature.* **391**:530-531.

Wells, M. L., E. D. Goldberg. 1991. Occurrence of small colloids in seawater. *Nature* **353**:342-344.

Williams, P. J., B. Le. 1990. The importance of losses during microbial growth: Commentary on the physiology, measurements and ecology of the release of dissolved organic material. *Mar. Microb. Food Webs.* **4**:175-206.

Winson, M. K., S. Swift, L. Fish, J. P. throup, F. Jørgensen, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, P. Williams, G. S. A. B. Stewart. 1998. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:85-192.

Worm, J., M. Søndergaard. 1998. Alcian Blue-stained particles in a eutrophic lake. *J. Plankton Res.* **20**:179-186.

Woese, C. R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**:221-271.

Yager, P. L., T. L. Connelly, B. Mortazavi, K. E. Wommack, N. Bano, J. E. Bauer, S. Opsahl, and J. T. Hollibaugh. 2001. Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures. *Limnol. Oceanogr.* **46**:790-801.

ZoBell, C. 1934. Microbiological activities at low temperatures with particular reference to marine bacteria. *Q.Rev. Biol.* **9**:460-466.

Zutic, V., V. Svetlicic. 2000. Interfacial Processes. In: *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 5 Part D. Marine Chemistry.* Hutzionger (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 228.

Zuzic, T. 2001. Isolamento di batteri marini in terreni di coltura e valutazione delle attività degradative esocellulari. Tesi di Laurea in Scienze Naturali. Università di Trieste. p. 38.

Desidero ringraziare la Prof. Serena Fonda Umani per avermi offerto la possibilità di svolgere questo Dottorato di Ricerca, per i preziosi consigli ricevuti in oltre 13 anni di collaborazione e per l'infinita pazienza che ha sempre dimostrato nei confronti dei miei "tempi lunghi".

Ringrazio il Prof. Farooq Azam per avermi fatto da correlatore e per le lunghe ore trascorse a discutere di scienza seduti di fronte l'Oceano Pacifico.

Un grazie di cuore a tutto il lab del Prof. Azam alla Scripps Institution of Oceanography di San Diego, California, per l'aiuto offertomi durante i mesi trascorsi lì ed in particolare a Richard, Kay, Forest e Laura.

Grazie a tutto il Laboratorio di Biologia Marina di Trieste, dove ho svolto la mia ricerca, e in particolare a Marina "la rossa", "PDN" Paola Del Negro e ai "dottorandi" Andrea Bussani e Cinzia DeVittor.

Mille ringraziamenti ad Alessandro Bensi per l'aiuto grafico e morale e a Francesca "incubo" Malfatti per le furibonde, ma proficue discussioni.

And "last but not least" un grazie immenso a mia moglie Cris, a mio figlio Francesco e ai miei genitori.