Gli aggregati sintrofici di thiodictyon syntrophicum CAD16 e desulfocapsa thiozymogenes CAD626 del lago di Cadagno

Autor(en): **Vecchietti, Nicolas / Storelli, Nicola / Peduzzi, Sandro**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bollettino della Società ticinese di scienze naturali**

Band (Jahr): **100 (2012)**

PDF erstellt am: **19.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-1003024

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Gli aggregati sintrofici di *Thiodictyon syntrophicum* CAD16 e *Desulfocapsa thiozymogenes* CAD626 del lago di Cadagno

Nicholas Vecchietti[1,2], Nicola Storelli[1,3], Sandro Peduzzi[4], Paola Barbieri[2], Caterina Strambio De Castillia[5], Mauro Tonolla[1,3,4]

[1] Istituto Cantonale di Microbiologia, CH-6500 Bellinzona
[2] Università degli Studi dell'Insubria, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, I-21100 Varese
[3] Université de Genève, Unité de Microbiologie, CH-1211 Ginevra
[4]Centro di Biologia Alpina (CBA), CH-6777 Quinto
[5] Université de Genève, Département de Microbiologie et Médecine Moléculaire, CH-1211 Ginevra

nicholas.vecchietti@ti.ch

Riassunto: Il lago di Cadagno e i laghi permanentemente stratificati in generale rappresentano dei modelli ideali per poter studiare i microorganismi acquatici. Il lago di Cadagno è particolarmente interessante per la presenza di popolazioni di batteri fotosintetici sulfurei e batteri solfato riduttori. In questi anni si è visto che i batteri fotosintetici rossi sulfurei appartenenti alla specie candidatus Thiodictyon syntropicum Cad16 e i batteri solfato riduttori della specie Desulfocapsa thiozymogenes Cad626 sono in grado di associarsi in strutture denominate aggregati. Fino ad ora uno studio dettaglio su come potesse avvenire l'aggregazione non era realizzabile a causa dell'impossibilità di riprodurre in laboratorio la struttura dell'aggregato. Con questo lavoro, per la prima volta, siamo riusciti ad individuare le condizioni ideali che consentono la riproduzione in laboratorio dell'aggregato batterico.

Study of the aggregation between *Thiodictyon syntrophicum* strain CAD16 and *Desulfocapsa thiozymogenes* strain CAD626 of lake Cadagno

Abstract: Lake Cadagno and the permanently stratified lakes, in general, represent optimal models for studying aquatic microbial populations. The lake Cadagno is particularly interesting for the presence of phototrophic sulfur bacteria and sulfate reducing bacteria populations. In recent years we have seen that the phototrophic sulfur bacteria candidatus *Thiodictyon syntropicum* Cad16 and the sulfate reducing bacteria *Desulfocapsa thiozymogenes* Cad626 are able to associate into specie-specific structures called aggregates. Until now a detailed study on the aggregate has been hampered by the lack of techniques that allowed to reproduce specific aggregation under controlled environmental and laboratory conditions. With this work, for the first time, we developed methods that would allow generating an experimental model for aggregation as starting point to determine the ecological and metabolic reasons and mechanisms at the basis of aggregation.

Keywords: *Thiodictyon syntrophicum* strain CAD16, *Desulfocapsa thiozymogenes* strain CAD626, lake Cadagno, aggregate.

INTRODUZIONE

I laghi permanentemente stratificati rappresentano dei sistemi modello ottimali per lo studio dei microrganismi acquatici poiché con i loro gradienti chimico-fisici stabili permettono lo sviluppo di diverse specie di microrganismi consentendone l'organizzazione in specifiche nicchie ecologiche (Peduzzi *et al.* 2003).

Un esempio di questo tipo di corpo d'acqua è rappresentato dal Lago di Cadagno situato nella val Piora, nel sud della regione alpina svizzera (36° 33' N, 8° 43' E) (Tonolla *et al.* 1999, Tonolla & Peduzzi 2006). Questo lago meromittico crenogenico è caratterizzato da un chemoclinio in cui è presente un'elevata concentrazione di batteri (Tonolla *et al.* 1999, Tonolla & Peduzzi 2006). I microrganismi presenti nel chemoclinio svolgono un ruolo importante per questo ecosistema in quanto rappresentano i principali costituenti della biomassa trovata nel lago. Gli studi compiuti nel corso degli ultimi anni hanno dimostrato che la comunità microbica è composta principalmente da batteri fotosintetici sulfurei rossi (PSB) e verdi (GSB) e da batteri solfato-riduttori (SRB), che trovano condizioni fisico-chimiche favorevoli di crescita nel chemoclinio ed interagiscono tra di loro (Tonolla *et al.* 1999, Tonolla *et al.* 2000, Tonolla *et al.* 2005, Decristophoris *et al.* 2009). In particolare le specie candidatus *Thiodictyon syntrophicum* Cad16 (PSB), e *Desulfocapsa thiozymogenes* Cad626 (SRB) sono in grado di associarsi in strutture denominate aggregati (Peduzzi *et al.* 2003, Peduzzi *et al.* 2012).

Fino ad ora, uno studio mirato alla comprensione dell'eco-fisiologia e dei meccanismi aggregativi di associazione

di questi batteri era ostacolato dalla mancanza di tecniche che consentivano la ricostituzione degli aggregati in laboratorio. L'obiettivo di questo lavoro era quindi quello di sviluppare un metodo per riprodurre in modo controllato questa struttura (Vecchietti 2011).
Ricerche preliminari (Tonolla *et al.* 1999, Tonolla *et al.* 2000, Tonolla *et al.* 2005, Peduzzi 2003, Peduzzi *et al.* 2003) avevano mostrato l'adeguatezza dell'utilizzo delle tecniche di ibridazione cellulare *in situ* con oligonucleotidi specifici marcati con fluorocromi (FISH, *Fluorescent In Situ Hybriditazion*) seguite dall'osservazione tramite microscopia. Si è perciò optato per questo tipo di metodologia usando sia il microscopio ad epifluorescenza sia il microscopio a scansione laser confocale (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*).
Nella prima fase del lavoro ci siamo concentrati sullo studio e l'osservazione della morfologia degli aggregati in campioni raccolti a differenti profondità del lago, successivamente abbiamo allestito tramite l'uso di sacchi per la dialisi un sistema per osservare nel tempo la formazione degli aggregati nel lago e infine acquisite queste informazioni abbiamo cercato di riprodurre la formazione degli aggregati in laboratorio.

MATERIALI E METODI

Campionamento ambientale e analisi chimico-fisiche

Per ciascun campione d'acqua sono stati filtrati 15 ml su dei filtri bianchi di policarbonato (0.22 µm diametro dei pori, 25 mm diametro del filtro, Millipore, Volketswil, Svizzera) (Glöckner *et al.* 1996). I batteri, intrappolati sui filtri, sono poi stati fissati immergendo i filtri in una soluzione di paraformaldeide al 4% e PBS (0.13 M NaCl, 7 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH2PO$_4$, pH 7.2) per 30 minuti a temperatura ambiente (Amann *et al.* 1990). I filtri lavati due volte con PBS sono stati trasferiti in sacchetti di plastica e risospesi in 600 µl di una soluzione etanolo e PBS 1:1 (ISO Organisation 1998). Le cellule batteriche così risospese sono state poi trasferite in tubi Epperndorf da 1.5 ml e conservate a -20°C (Amann *et al.* 1990; Tonolla *et al.* 1999).
La concentrazione di ossigeno disciolto (%), è stata misurata con la sonda 6000 YSI profiler (Yellow Springs Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Per la determinazione della concentrazione di solfato nei campioni ambientali e di laboratorio abbiamo effettuato delle analisi colorimetriche utilizzando il sistema Spectroquant® kit (Merck Svizzera) seguendo le istruzioni del produttore.

Ceppi batterici e terreni di coltura

Gli esperimenti sono stati condotti usando due ceppi batterici: candidatus *Thiodictyon syntrophicum* ceppo Cad16 appartenente al gruppo dei batteri rossi sulfurei fototrofi (PSB) (Peduzzi *et al.* 2011) e *Desulfocapsa thiozymogenes* ceppo Cad626 appartenente al gruppo dei batteri solfato-riduttori (SRB) (Peduzzi 2003) precedentemente isolati dal chemoclinio del Lago di Cadagno.
I terreni anaerobici sono stati preparati in bottiglie da 2 litri con un'atmosfera di N_2/CO_2 80%/20% (Widdel & Bak 1992). I PSB e gli SRB sono stati incubati a temperatura ambiente (20°-25°C) con un ciclo alternato di luce e buio di 12 ore. L'intensità della luce era compresa tra i 4 e gli 8 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ generati da una lampadina ad incandescenza da 60 W posta a 50 cm al di sopra delle bottiglie (Imhoff 2001).
La composizione dei terreni era la seguente:

a) terreno per le colture pure dei PSB (pH circa 7.0):
0.5 g/l KH_2PO_4, 0.34 g NH_4Cl, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.34 g/l KCl, 1.5 g/l $NaHCO_3$, 1.0 ml di soluzione di elementi in tracce SL10, 0.8 ml di soluzione vitamina B12 (Imhoff 2001), 1.10 mM $Na_2S \cdot 9H_2O$;

b) terreno per le colture pure di SRB (pH circa 7.0):
0.5 g/l KH_2PO_4, 0.34 g NH_4Cl, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.34 g/l KCl, 2.6 g/l $NaHCO_3$, 2.0 ml di soluzione di elementi in tracce SL10, 2.0 ml di soluzione vitamina B12, 2.0 ml di selenio-tungsteno, 2.0 ml di soluzione vitamina-8 mix, 2.0 ml di una soluzione di tiamina (Jansenn *et al.* 1996), 2.0 mM di $Na_2S \cdot 9H_2O$;

c) terreno per lo studio delle colture miste di PSB e SRB:
(pH circa 7.0): 0.5 g/l KH_2PO_4, 0.3 g NH_4Cl, 0.2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.34 g/l KCl, 2.6 g/l $NaHCO_3$, 2.0 ml di soluzione di elementi in tracce SL10, 2.0 ml di soluzione vitamina B12, 2.0 ml di soluzione selenio-tungsteno, 2.0 ml di soluzione vitamina-8 mix, 2.0 ml di una soluzione di tiamina, 0.5 mM di $Na_2S \cdot 9H_2O$.

Per testare l'influenza della microaerofilia e il ruolo del solfato sull'aggregazione, in alcuni terreni è stata aggiunta una miscela gassosa formata da O_2/CO_2 in rapporto 5.05%/10.10% e concentrazioni finali di $MgSO_4$ di 2.0 mM o 6.0 mM.

Crescita controllata dei ceppi batterici in condizioni ambientali

Per lo studio della crescita dei ceppi batterici in condizioni ambientali, si è proceduto ad incubazioni *in situ* utilizzando sacchetti di dialisi (Nadir®-dialysis tubing, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlshue, Germania). Ogni sacchetto aveva una lunghezza pari a 241 mm, per evitare l'apertura accidentale durante la permanenza nel lago, ogni sacchetto è stato chiuso utilizzando tre mollette attaccate alle due estremità del sacchetto. Prima dell'uso, i sacchetti di dialisi sono stati lavati con una soluzione $NaHCO_3$ al 2%, 1 mM EDTA a 60°C per 4 ore, e successivamente autoclavati a 120°C per 20 minuti.

Conteggio delle cellule con microscopio a epifluorescenza

All'interno dell'imbuto di filtrazione 100 µl di terreno sono stati diluiti con 2 ml di acqua distillata e dopo l'aggiunta di 20 µl di una soluzione di DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) al 0.01% (w/v) la soluzione è stata lasciata al buio e a temperatura ambiente per 7 minuti. I campioni sono stati filtrati su dei filtri neri di policarbonato (0.22 µm diametro dei pori, 13 mm diametro dei filtri, Millipore, Volketswil, Svizzera) e successivamente lavati, filtrando 2 ml di acqua distillata.

I filtri sono stati collocati su dei vetrini da microscopio e montati con una soluzione di olio da immersione Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., Londra, UK).
I microrganismi sono stati contati con un microscopio a epifluorescenza (PORTER & FEIG 1980) usando un obiettivo a 100× in 30 campi (superficie complessiva coperta, 63.6172 mm^2), illuminati da una lampada UV e utilizzando un set di filtri F31 (AHF Analysentechnik, Tubinga, Germania; D360/40, 400DCLP, D460/50).
Il numero delle cellule, espresso come media delle cellule/ml ± errore standard, è stato calcolato con la formula seguente: $N=n*F/V$
Dove N è il numero totale delle cellule per millilitro, n il numero di cellule contate sul campione, F il fattore campo e V il volume filtrato.

Ibridazione in situ fluorescente

La tecnica dell'ibridazione *in situ* (FISH) è già stata utilizzata in precedenza per analizzare la struttura delle comunità batteriche in diversi ambienti acquatici (WAGNER *et al.* 1994b; ALFREIDER *et al.* 1996; ZARDA *et al.* 1997 modificato; TONOLLA *et al.* 1999), sedimenti (RAMSING *et al.* 1993; SPRING *et al.* 1993), e suoli (HAHN *et al.* 1992; FISCHER *et al.* 1995a).
Per il presente lavoro 10 µl di campione fissati in etanolo-PBS sono stati depositati su dei vetrini trattati con della gelatina [0.1% gelatina, 0.01% $KCR(SO_4)_2$]. I campioni sono stati disidratati immergendo i vetrini per 3 minuti in etanolo in soluzioni di etanolo al 50, al 70 e al 96%. L'etanolo è stato fatto evaporare riponendo i vetrini a 46°C per 10 min e successivamente si è proceduto all'ibridazione con la deposizione di 10 µl di una soluzione costituita da 9 µl di tampone di ibridazione (0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, 0.01% SDS, pH 7.2), una concentrazione variabile di formammide variante tra il 30 e il 40% a dipendenza della sonda utilizzata (tab. 1), e 1 µl di sonda marcata con il fluorocromo Cy3 (25 µl/ng), seguita da una incubazione 46°C per 90 min (ZARDA *et al.* 1997 modificato).
Dopo l'ibridazione, i vetrini sono stati lavati per 20 minuti a 48 °C con una soluzione tampone contenente 20 mM Tris/HCl, pH 7.2, 10 mM EDTA, 0.01% SDS e una concentrazione variabile di NaCl (112, 80 o 56 mM) in base alla concentrazione di formammide utilizzata durante l'ibridazione (rispettivamente 30, 35, e 40%). I vetrini sono stati poi sciacquati con acqua distillata, ed essiccati a 46°C per 10 minuti (ZARDA *et al.* 1997).
Dopo la fase di lavaggio, le cellule sono state colorate con una soluzione 0.001% DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) in PBS ed incubate a temperatura ambiente al buio per 5-7 minuti. I vetrini sono stati risciacquati con acqua distillata ed essiccati a 46°C per 10 min (AMANN *et al.* 1990).

I vetrini sono stati poi montati con Vectashield® (Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA). Le cellule batteriche ibridate sono state analizzate mediante microscopio a epifluorescenza con il set di filtri F31 (AHF Analysentechnik, Tubinga, Germania; D360/40, 400DCLP, D460/50 per DAPI) e F41 (AHF Analysentechnik, HQ535/50, Q565LP, HQ610/75 per Cy3) con un obiettivo 100× 1.3 NA Zeiss Planar Neofluar ad immersione ad olio.

Acquisizione delle immagini, identificazione e quantificazione delle cellule

Le immagini sono state acquisite con una camera Axiocam collegata ad un microscopio wide-field Axiolab Zeiss utilizzando il programma AxioVision versione 4.6 (tutti i prodotti Axio della Zeiss, Oberkochen, Germania). Le immagini tridimensionali sono state ottenute tramite un microscopio Leica DMI 6000 CS dotato di un sistema di microscopia confocale SP5 TCS a scansione laser rovesciato con un obiettivo 63× 1.4 NA Leica HCX Planapochromat ad immersione ad olio. La gestione delle immagini è stata eseguita utilizzando le versioni 4.2.0, 4.2.2 e 4.3.1 del software OMERO (SWEDLOW *et al.* 2009) (http://www.openmicroscopy.org/site/products/omero).
Per l'analisi delle immagini abbiamo utilizzato il software open-source CellProfiler ™. Il software si basa sul concetto della pipeline, che è una struttura costituita da una serie di moduli. Ciascun modulo esegue un compito specifico sull'immagine o sugli oggetti individuati. Una pipeline tipica prevede il caricamento delle immagini, la regolazione dell'illuminazione, e l'identificazione degli oggetti. Questi moduli disposti in ordine sequenziale possono essere facilmente aggiunti, rimossi o riordinati all'interno di una pipeline (LAMPRECHT *et al.* 2007).
Il programma in questo progetto è stato utilizzato per due azioni: (a) convertire le immagini in formato 8 bit in bianco e nero ad in immagini a colori in formato RGB, (b) contare con precisione e in breve tempo tutte le cellule presenti sulle immagini acquisite con il microscopio a epifluorescenza.

Tab. 1 - Sonde oligonucleotidiche utilizzate per l'ibridazione in situ (FISH). PSB = batteri fototrofi solfurei rossi. Quando le tre sonde sono state utilizzate insieme, si è scelta una concentrazione intermedia di formammide al 35%.

Sonda	Target	Sequenza (5' =>3') (% formammide nel buffer d'ibridazione)	Bibliografia
Batteri fototrofi solfurei rossi (PSB)			
S453F	candidatus *Thiodictyon syntrophicum* Cad16, pos. 453-479	CCCTCATGGGTATTARCCACAAGGCG (40%)	(TONOLLA *et al.* 1999)
Desulfocapsa sp.			
DSC441	*Desulfocapsa* 441-459		(TONOLLA *et al.* 2000)
DSC213	*Desulfocapsa thiozymogenes* 213-230	CCTCCCTGTACGATAGCT (30%)	(TONOLLA *et al.* 2000)

RISULTATI

Analisi degli aggregati batterici dall'acqua del Lago di Cadagno

Per studiare la funzione dell'aggregazione batterica, il primo passo è stato quello di osservare la morfologia degli aggregati presenti nei campioni provenienti dal chemoclinio del Lago di Cadagno. La fig. 1 mostra degli esempi tipici di aggregati trovati nei campioni prelevati nel settembre 2000 a diverse profondità nel lago (10.5 m, 11.5 m e 12.5 m). Le analisi effettuate rivelano che la dimensione degli aggregati è compresa tra i 60 e i 240 µm. Le immagini tridimensionali permettono di osservare come gli aggregati trovati nel lago si presentino come strutture compatte dove le cellule di Cad16 sembrerebbero costituire la struttura centrale attorno alla quale Cad626 può crescere. È interessante notare come nonostante alcuni Cad626 crescano sulla superficie degli aggregati, la maggior parte si presenta tuttavia all'interno di "nicchie" che si creano in mezzo alle grandi cellule di Cad16, indicando una crescita concomitante con Cad16 e quindi una stretta associazione tra le due specie batteriche.

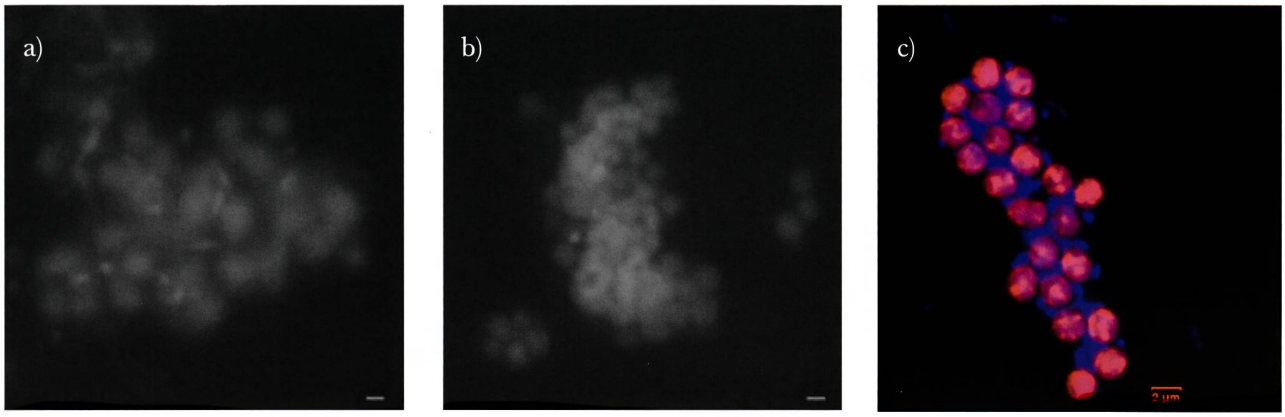

Fig. 1 - L'associazione tra Cad16 e Cad626 da luogo a compatte strutture tridimensionali. (**a-c**) Immagini di aggregati presenti nel Lago di Cadagno a diverse profondità. Le immagini dei campioni a 10.5 m (**a**) e 12.5 m (**b**) sono realizzate con microscopio a epifluorescenza. (**c**) Ricostruzione tridimensionale effettuata tramite microscopio laser confocale di un aggregato presente a 11.5 m. Le cellule di Candidatus *T. syntropicum* Cad16 sono più grandi e di forma sferica, le cellule di *D. thiozymogenes* Cad626 sono più piccole e a forma di bastoncelli. (**a-c**) La scala è di 2 µm.

Analisi degli aggregati batterici cresciuti nei sacchetti di dialisi nel Lago di Cadagno

Per comprendere come possa avvenire la formazione degli aggregati nel lago, abbiamo inoculato nei sacchetti di dialisi le due popolazioni batteriche in diversi rapporti di concentrazione (1:1, 2:1, 1:2). La concentrazione iniziale delle cellule di Cad626 era di 4.00×10^4cellule/ml. Inoltre abbiamo inoculato alcuni sacchetti con le culture pure in funzione di controllo. I sacchetti sono stati immersi nel lago a 10.5 m, 11.5 m e 12.5 m per 21 giorni nel mese di settembre 2010. Lo scopo era quello di verificare la formazione degli aggregati a condizioni variabili di intensità luminosa, concentrazione di ossigeno e nutrimenti (fig. 2).

I risultati mostrano che i Cad16 sono cresciuti in coltura pura nel chemoclinio, mentre le cellule di Cad626 da sole alle stesse condizioni non hanno mostrato crescita.

Per quanto riguarda le co-colture, solo il campione in cui le cellule erano mischiate in proporzioni uguali ha mostrato la formazione di strutture simili agli aggregati batterici presenti nel chemoclinio.

Alle tre profondità, dopo aver rilevato una situazione iniziale comune in cui c'era una predominanza di cellule di Cad16 associate tra di loro in ammassi omospecifici, abbiamo notato una netta predominanza di ammassi nei campioni inoculati a 10.5 m di profondità

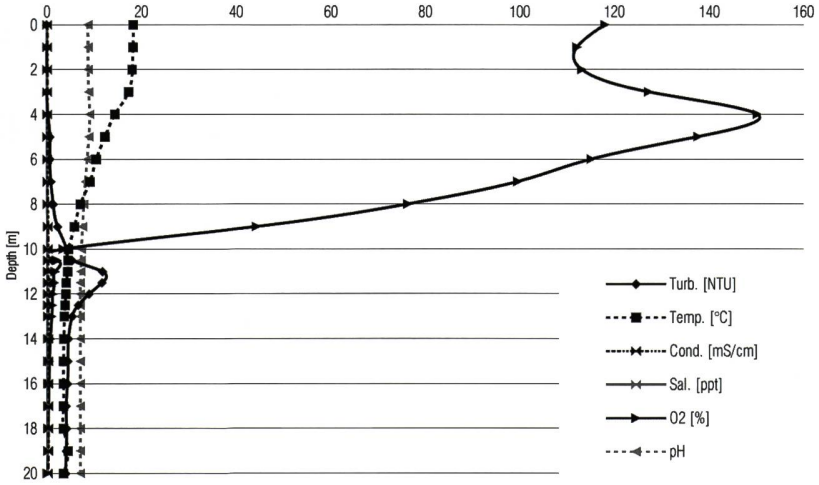

Fig. 2 - Profilo verticale del Lago di Cadagno. I dati acquisiti nel mese di luglio 2010 riportano la variazione dei parametri di torbidità, temperatura, conduttività, concentrazione salina, pH e concentrazione di ossigeno dalla superficie del lago sino al fondale.

Studio dell'aggregato batterico a 10.5 m

Le curve di crescita delle cellule nei sacchetti di dialisi posti a 10.5 m, sono illustrate nella fig. 4. Cad16 ha seguito una crescita esponenziale producendo consistenti ammassi di cellule (circa 50 cellule di Cad16 per ammasso) e il rapporto tra Cad16 e Cad626 arriva a raggiungere un massimo di 6:1 rilevato dopo 9 giorni dall'inoculo (fig. 4). Le cellule di Cad626 erano presenti in quantità inferiori confermando le precedenti osservazioni che indicavano come questa specie abbia una maggiore difficoltà nel replicarsi e suggerendo quindi una dipendenza verso Cad16 (Peduzzi 2003). Infatti, nelle fasi iniziali i Cad626 mostrano una marcata tendenza ad accumularsi intorno alle cellule di Cad16 dando luogo a delle strutture a "rosetta" (fig. 3).

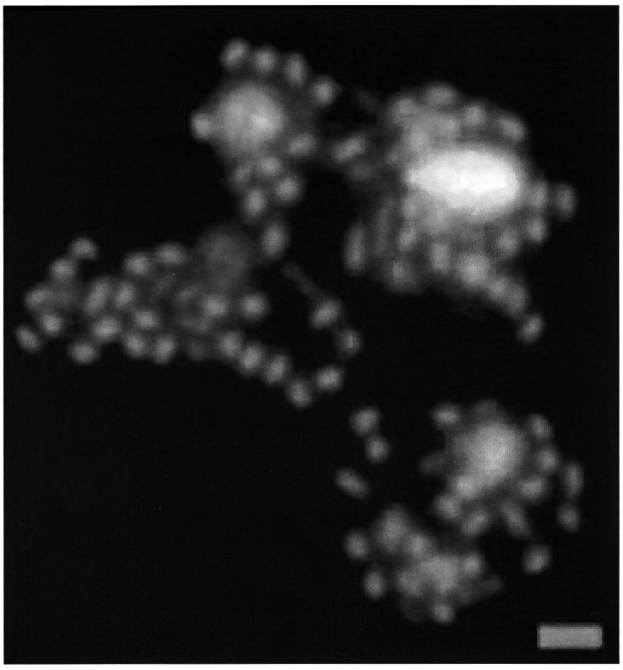

Fig. 3 – Dettaglio delle strutture a rosetta. Al centro è posizionata una cellula di Candidatus *T. syntropicum* Cad16 (forma rotonda), mentre intorno si trovano delle cellule di *D. thiozymogenes* Cad626 (blu forma a bastoncello)

A partire dal giorno 9, il grande ammasso di Cad16 ha iniziato a dividersi in ammassi più piccoli, le cui cellule incominciavano ad essere affiancate da cellule di Cad626. E' possibile ipotizzare che queste strutture, rappresentino il punto di partenza per la formazione degli aggregati. Confrontando la struttura e la dimensione tridimensionale di questi primi aggregati con quelle degli aggregati osservati nel lago, abbiamo notato che nei sacchetti di dialisi le strutture avevano dimensioni più grandi (400 µm contro 200 µm) e contenevano un numero preponderante di Cad16.

Dal giorno 13 l'ammasso iniziale di Cad16 è stato completamente sostituito da ammassi più piccoli. In questa fase, la popolazione di Cad626 ha prodotto una crescita rilevante, con una conseguente riduzione del divario nel rapporto tra le due specie, pur rimanendo Cad16 la specie dominante (fig. 4).

Due settimane dopo l'inoculo (giorno 16), si è osservato un marcato aumento della popolazione di Cad626 e i grandi ammassi iniziali di Cad16 sono stati completamente sostituiti da forme di aggregazione nelle quali i Cad626 sembrano proliferare all'interno degli spazi presenti tra le cellule di Cad16 (fig. 5).

Durante l'ultimo campionamento (giorno 21), qualsiasi forma di aggregazione omospecifica e di ammasso erano completamente scomparse dalla cultura. Questo fenomeno concorda con il comportamento delle cellule batteriche osservato nel lago in studi precedenti. Infatti solitamente, con il sopraggiungere dell'inverno, si osserva una drastica diminuzione della popolazione, soprattutto quando lo strato superficiale del lago ghiaccia diminuendo l'intensità luminosa nel chemoclinio (Tonolla & Peduzzi 2006).

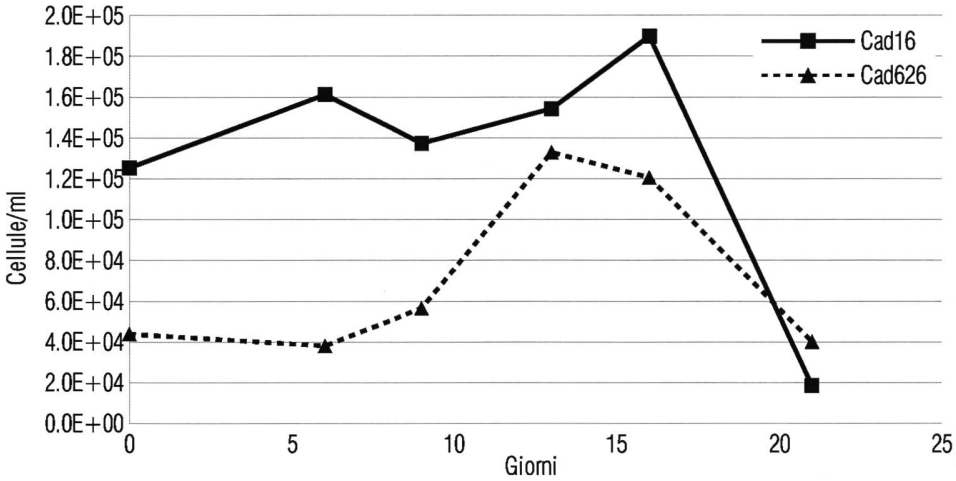

Fig. 4 - Curve di crescita delle cellule nei sacchi per la dialisi posti a 10.5 m. La linea continua rappresenta la crescita di candidatus *T. syntrophicum* Cad16, la linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626.

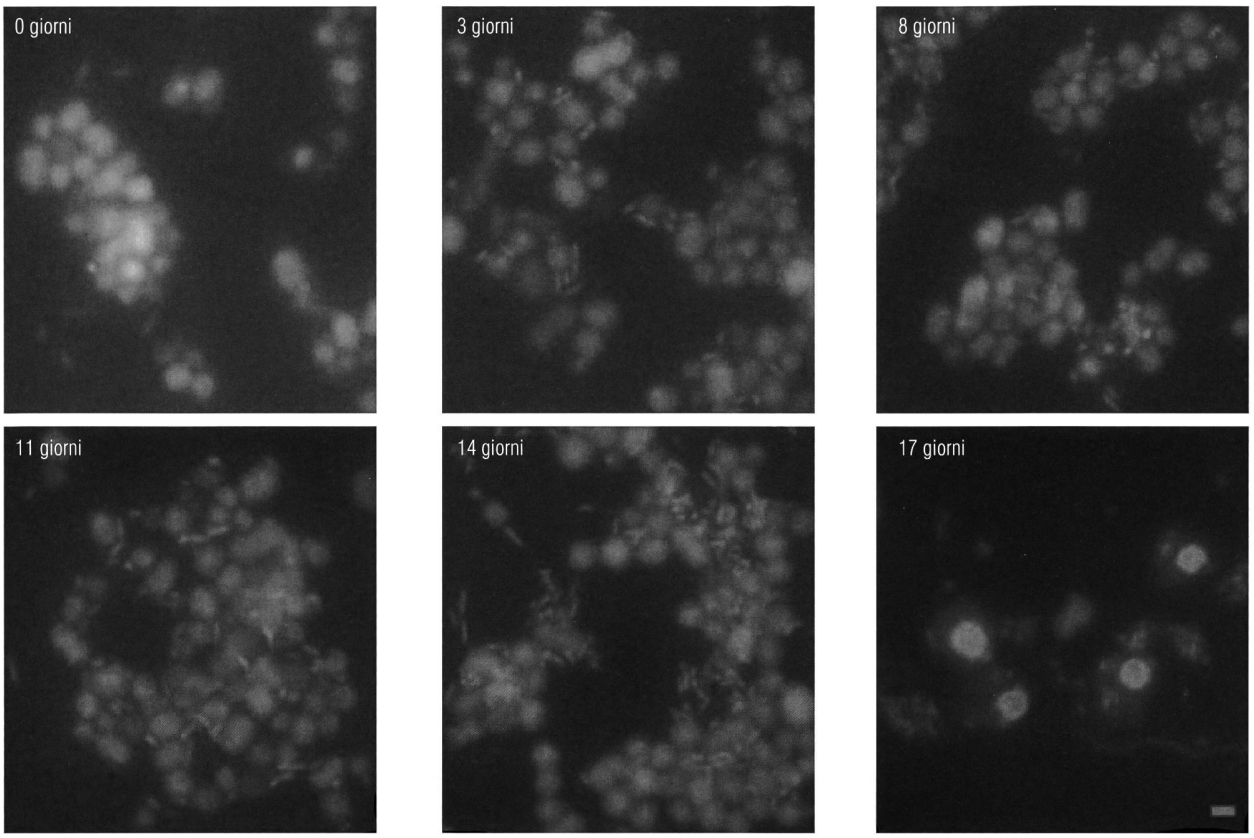

Fig. 5 - Le immagini di microscopia a epifluorescenza mostrano lo sviluppo della situazione nei sacchetti per la dialisi a 10.5 m nel mese di settembre 2010 nel lago di Cadagno. *D. thiozymogenes* Cad626 presenta una morfologia a bastoncello candidatus *T. syntrophicum* Cad16 presenta una morfologia sferica. La scala è di 2 µm.

Studio dell'aggregato batterico a 11.5 e 12.5 m

A 11.5 m e 12.5 m la crescita si è presentata sostanzialmente diversa rispetto a quella osservata a 10.5 m. In particolare, la crescita esponenziale di Cad16 e Cad626 era ridotta e la fase di morte cellulare nella fase finale non è stata rilevata (fig. 6 e fig. 7).

Dal giorno 6 tutte le cellule di Cad16 mostravano la formazione di piccoli ammassi omospecifici (160 µm di diametro) con alcuni Cad626 inseriti al loro interno. A partire dal giorno 13, il numero di cellule di Cad16 è diminuita con un conseguente calo del rapporto PSB:SRB da 4:1, al giorno 6, a 2:1 (fig. 6), inoltre in alcuni ammassi le cellule si mostravano più slegate, dando l'impressione che Cad16 e Cad626 non fossero così strettamente a contatto l'uno all'altra. Al giorno 16 sono stati individuati alcuni ammassi con una predominanza di Cad626 all'interno della struttura, ma non abbiamo mai osservato un forte aumento complessivo di cellule di Cad626, come quello riscontrato a 10.5 m. Nel prelievo effettuato al giorno 21 al contrario di quanto osservato a 10.5 m, non si è verificato il crollo di concentrazione della cultura. Gli aggregati osservati al giorno 16 sono persistiti mostrando un corrispondente incremento del numero complessivo di cellule, ciò lascia supporre che il crollo della cultura possa essere ritardato dalle particolari condizioni ambientali degli strati più profondi del lago.

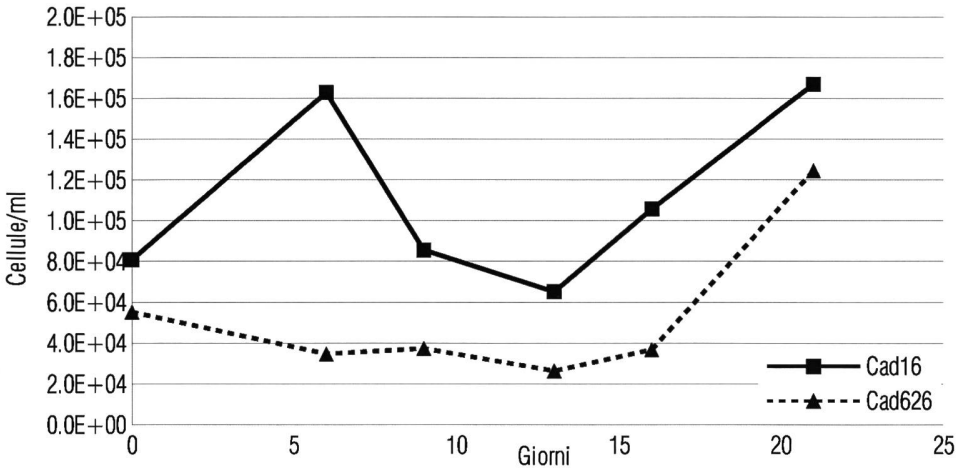

Fig. 6 - Curve di crescita delle cellule nei sacchi per la dialisi posti a 11.5 m. La linea continua rappresenta la crescita di candidatus *T. syntrophicum* Cad16, la linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626. Al giorno 21 non rileva alcun crollo della cultura anzi le cellule continuano a crescere.

A 12.5 m, analogamente a quanto osservato in precedenza, al giorno 0, i Cad16 nella cultura erano dominanti dando origine ad ammassi omospecifici (fig. 7). Nelle settimane successive, il numero di Cad16 e Cad626 è rimasto sostanzialmente stabile (2:1) (fig. 7).

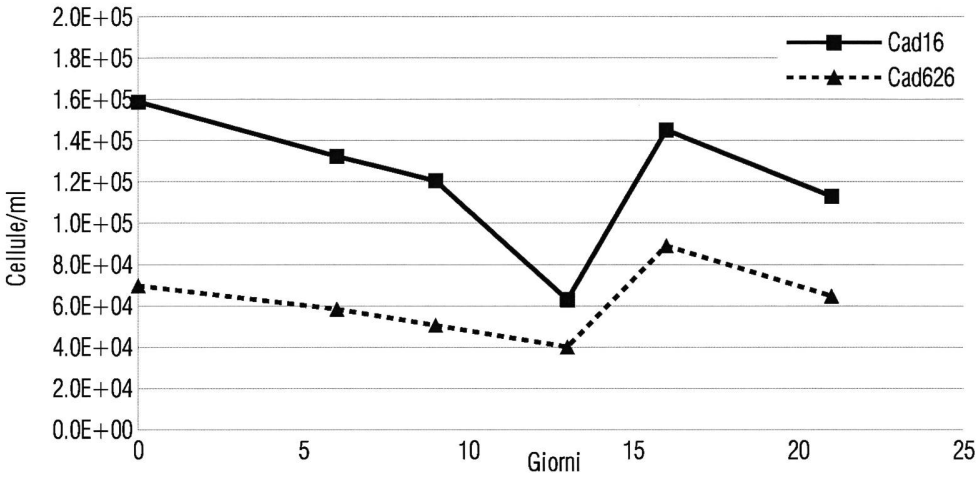

Fig. 7 - Curve di crescita delle cellule nei sacchi per la dialisi posti a 12.5 m. La linea continua rappresenta la crescita di candidatus *T. syntrophicum* Cad16, la linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626.

Analisi degli aggregati batterici in laboratorio

In parallelo all'esperimento condotto utilizzando i sacchetti di dialisi nel lago di Cadagno, in laboratorio abbiamo inoculato le stesse cellule in terreni liquidi specifici in anaerobiosi con una concentrazione iniziale di solfato pari a 10 mM in presenza e in assenza di mescolamento continuo. Anche in questi esperimenti il rapporto iniziale 1:1 tra i due ceppi in esame ha dato i risultati più interessanti.

Crescita senza mescolamento

In assenza di mescolamento, le cellule di Cad16 hanno formato le classiche strutture degli ammassi omospefici, e al loro interno sono state individuate delle cellule di Cad626. Con il proseguimento dell'esperimento la morfologia delle cellule di Cad16 si modificava molto dalla loro normale struttura circolare mostrando forme più grandi ovali e gonfie. Tra gli ammassi con molte cellule e quelli con poche cellule si è osservata una certa differenza strutturale: nei grandi ammassi le cellule sembravano poco unite tra loro, in quelli più piccoli le interazioni tra le cellule sembravano più marcate e più simili a quanto osservato nei campioni del lago. Per tutta la durata dell'esperimento i Cad16 hanno continuato a proliferare formando gli ammassi, mentre i Cad626 erano presenti in quantità al limite della soglia di rilevamento. I pochi Cad626 presenti erano in associazione con i Cad16 ma il fenomeno è apparso di natura stocastica piuttosto che frutto di una crescita cooperativa.

Crescita con mescolamento

Nei campioni cresciuti in mescolamento continuo invece, la morfologia delle singole cellule di Cad16 non ha subito grosse variazioni ed era molto più simile a quanto osservato nei campioni ambientali. Inoltre, al tempo zero c'era una predominanza di cellule singole di entrambe le specie batteriche e cellule di Cad16 che interagivano con una o due cellule di Cad626, situazione che negli altri campioni non è mai stata osservata e potrebbe essere uno dei primi passi nella formazione degli aggregati eterospecifici.

Dal giorno 6 in poi, si sono osservati ammassi di Cad16 con una ridotta presenza di cellule di Cad626 situate nelle zone periferiche. Infine l'ultimo giorno di campionamento, si è osservato un crollo della concentrazione di cellule nella cultura simile a quello osservato nei sacchetti di dialisi collocati a 10.5 m nel lago con anche evidenti segni di lisi e morte cellulare.

La crescita in micro-aerofilia

Gli aggregati osservati nel chemoclinio del lago di Cadagno tipicamente sono costituiti da 90-100 cellule e mostrano un compattamento ottimale delle cellule, con i Cad626 che sembrano proliferare negli spazi che si creano tra le cellule di Cad16.

Questa impressione iniziale è stata poi confermata quando abbiamo osservato l'evoluzione nel tempo degli aggregati nei sacchetti di dialisi collocati nello strato superiore del chemoclinio. Così, seguendo la crescita nei sacchetti di dialisi a 10.5 m il numero di cellule di *D. thiozymogenes* Cad626 cresciute nelle fessure degli ammassi di Cad16 ha raggiunto nei giorni 9 e 13 dei valori simili a quelli riscontrati per gli aggregati isolati dall'acqua del lago.

Sulla base di questi risultati, abbiamo dedotto che per riprodurre l'aggregazione in laboratorio fosse necessario imitare le condizioni chimico-fisiche presenti nel lago a 10.5 m. La differenza più significativa tra 10.5 m e le altre due profondità studiate è che a 10.5 m c'è ancora una concentrazione significativa di ossigeno disciolto (circa il 3%), mentre questa concentrazione si azzera negli strati più profondi. L'altro aspetto importante che abbiamo preso in esame è stata la concentrazione di solfato, inferiore a 10.5 m rispetto alle profondità maggiori.

Queste considerazioni ci hanno portato ad ipotizzare che l'ossigeno possa giocare un ruolo nell'aggregazione

delle due specie batteriche in esame e che anche la concentrazione di solfato potesse influenzarne la crescita.

A seguito di queste considerazioni sono state testate quattro condizioni diverse di crescita di colture miste di CAD16 e CAD 626:

1) 6.0 mM SO_4^{2-} con O_2 (5.05%).
2) 2.0 mM SO_4^{2-} con O_2 (5.05%).
3) 2.0 mM SO_4^{2-} in anaerobiosi O_2 (0%).
4) 6.0 mM SO_4^{2-} in anaerobiosi O_2 (0%).

I campioni sono stati prelevati dopo 0, 3, 8, 11, 14 e 17 giorni.

Condizione 1: 6.0 mM SO_4^{2-} in presenza di ossigeno
Nel primo esperimento, nei campioni prelevati al tempo zero e al giorno 3 erano presenti cellule libere mentre erano assenti gli ammassi omospecifici di Cad16 e le forme di aggregazione tra Cad16 e Cad626.
Dopo 8 giorni sono state individuate alcune forme di aggregazione, con un rapporto tra Cad16 e Cad626 di 2:1, e un incremento della concentrazione di solfato a 6.48 mM dovuto alla crescita dei Cad16 che passano da 3.00×10^4 del giorno a 4.09×10^4 cellule/ml). Al giorno 11 è stato individuato un considerevole numero di aggregati con struttura e dimensioni simili a quelli presenti nel lago (diametro degli aggregati: da 80 µm a 200 µm) e il livello di solfato probabilmente consumato dai Cad626 è sceso leggermente ad una concentrazione di 5.61 mM, mentre le cellule di Cad626 sono diventate la specie dominante all'interno della coltura.

Al giorno 14 la crescita di Cad16 e Cad626 è proseguita e si è potuta riscontrare la più alta concentrazione di aggregati (1'812 aggregati/ml) (fig. 8), con un rapporto fra Cad16 e Cad626 di 1 a 4, supportata anche da una diminuzione della concentrazione di solfato fino a 5.37 mM. La tendenza all'aumento di Cad626 rispetto a Cad16 è documentata nel grafico di crescita (fig. 9).
Nell'ultimo campione (giorno 17) è stata rilevata una diminuzione di cellule e un forte declino delle forme di aggregazione (fig. 8).

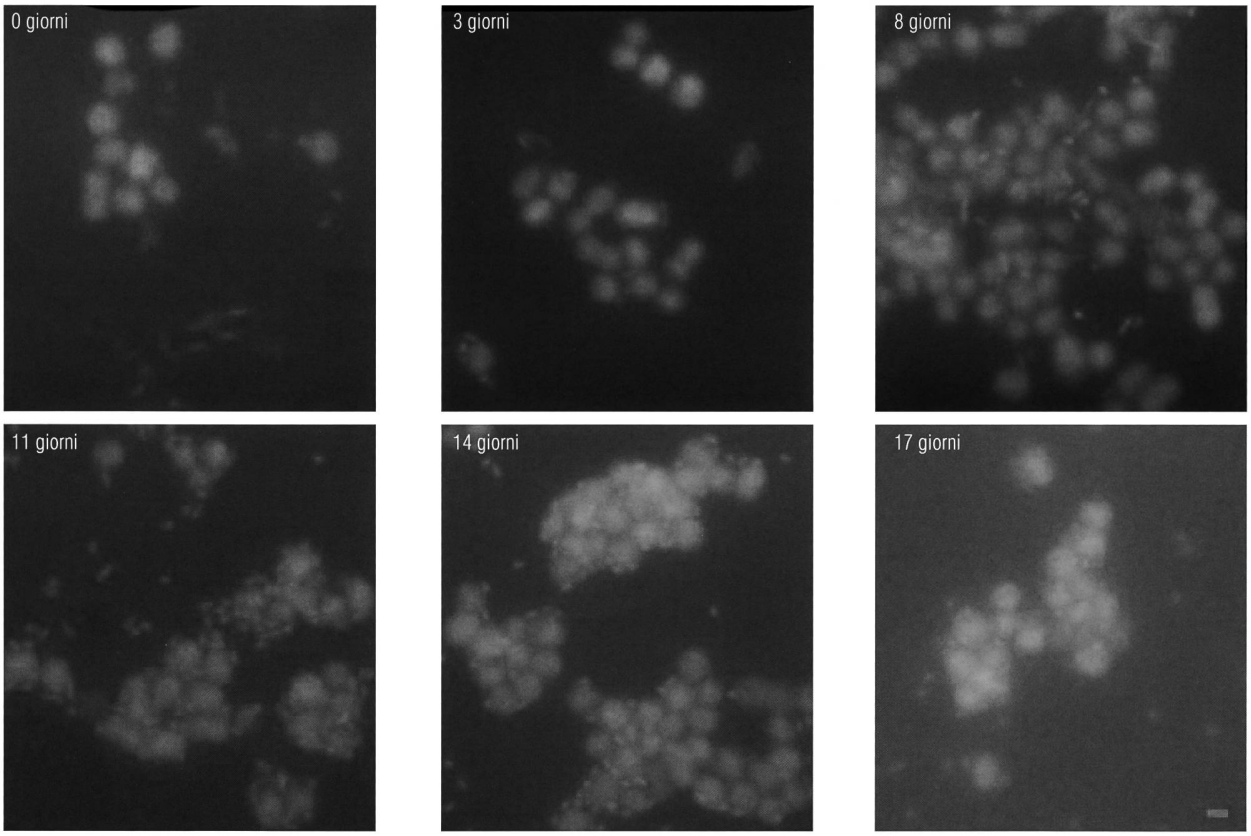

Fig. 8 - Le immagini di microscopia a epifluorescenza mostrano la crescita delle cellule in condizioni aerobiche e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 6.0 mM. *D. thiozymogenes* Cad626 presenta una morfologia a bastoncello candidatus *T. syntrophicum* Cad16 presenta una morfologia sferica. La scala è di 2 µm.

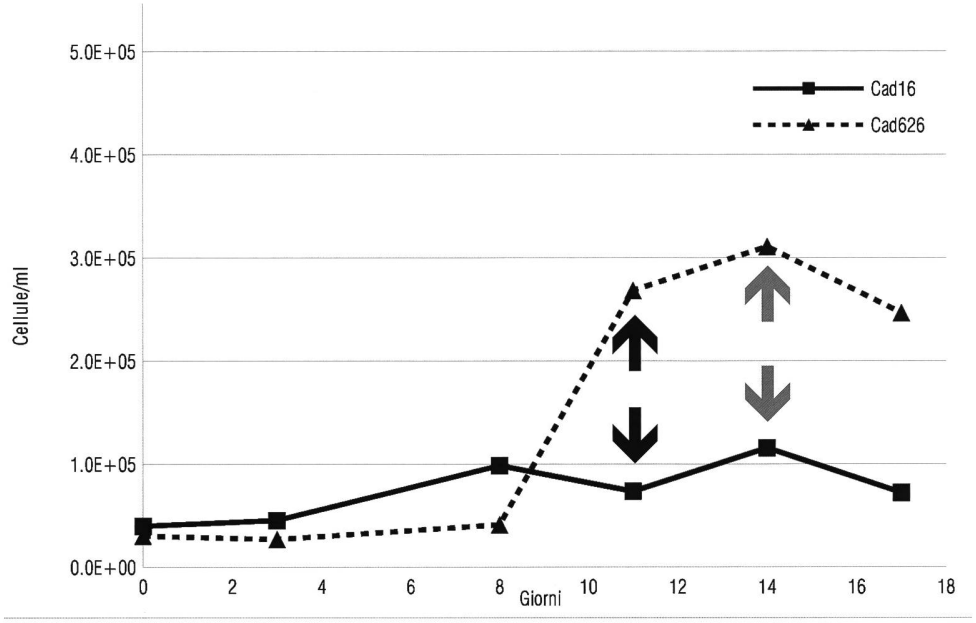

Fig. 9 - Cellule/ml presenti nel terreno misto allestito per la crescita di Cad16 e Cad626 in condizioni di microaerofilia e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 6.0 mM. La linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626, la linea continua rappresenta la crescita candidatus *T. syntrophicum* Cad16. Le frecce indicano i momenti in cui abbiamo individuato gli aggregati. La massima crescita di Cad626 corrisponde alla più alta concentrazione di aggregati (freccia grigia).

Condizione 2: 2.0 mM SO_4^{2-} in presenza di ossigeno

Durante il secondo esperimento, è stata rilevata la più alta crescita di cellule di Cad626 (5.0×10^5cellule/ml) (fig. 11) accompagnata da una riduzione del solfato (da 1.8 mM a 0.76 mM) e dalla formazione di alcuni aggregati anche se questi erano presenti in concentrazioni minori (192 aggregati/ml) rispetto alla condizione 1. Negli ultimi prelievi (giorni 14 e 17) c'è stata una diminuzione di entrambi i tipi di cellule (fig. 10 - fig. 11) che probabilmente sono entrati in una fase di morte cellulare, infatti, a questo punto non sono più stati individuati gli aggregati.

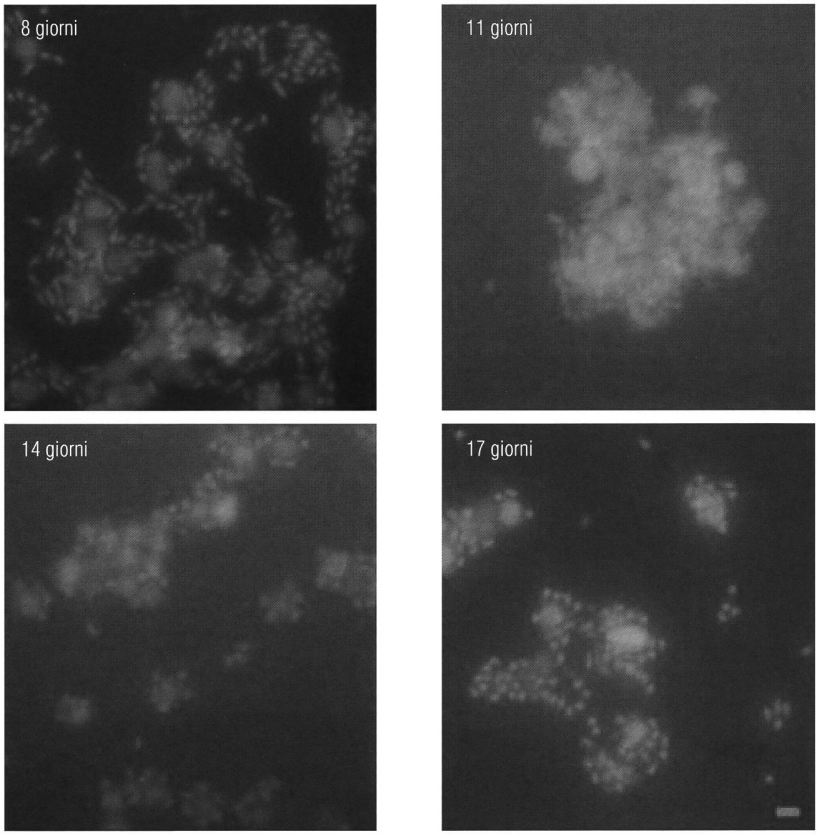

Fig. 10 - Le immagini di microscopia a campo largo mostrano lo sviluppo della crescita delle cellule in condizioni aerobiche e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 2.0 mM. *D. thiozymogenes* Cad626 presenta una morfologia a bastoncello candidatus *T. syntrophicum* Cad16 presenta una morfologia sferica. La scala è di 2 µm.

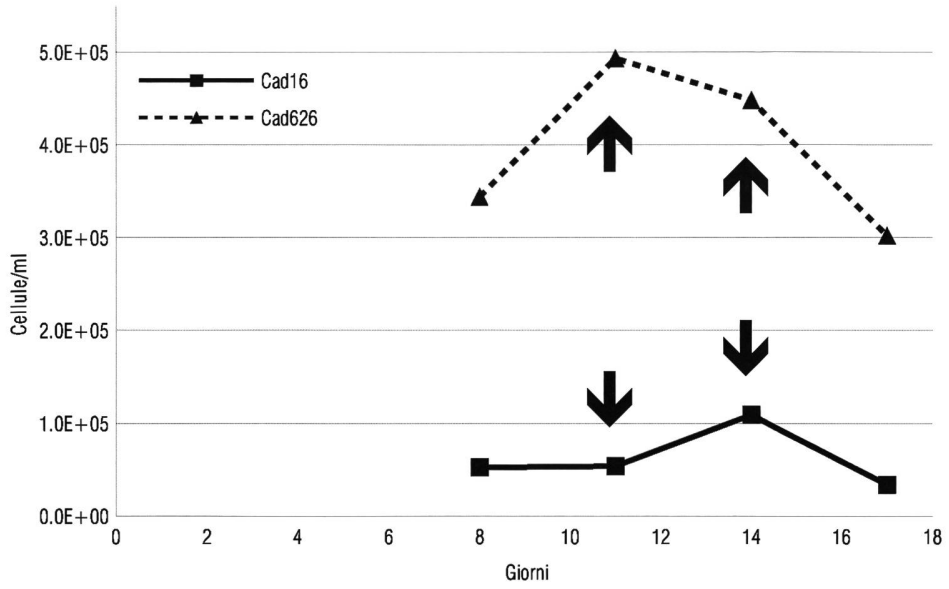

Fig. 11 - Cellule/ml presenti nel terreno misto allestito per la crescita di Cad16 e Cad626 in condizioni di microaerofilia e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 2.0 mM. La linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626, la linea continua rappresenta la crescita candidatus *T. syntrophicum* Cad16. Le frecce indicano le fasi in cui abbiamo individuato gli aggregati.

Condizioni 3 e 4: 6.0 mM SO_4^{2-} e 2.0 mM SO_4^{2-} in assenza di ossigeno

Negli esperimenti allestiti in assenza di ossigeno e con due diverse concentrazioni di solfato (6.0 mM e 2.0 mM) non si sono osservate forme di aggregazione. Al tempo zero per entrambe le condizioni sperimentali Cad16 e Cad626 sono cresciuti come cellule singole. Al giorno 3 le cellule di Cad16 hanno formato i loro tipici ammassi già visti nel lago e nei sacchi dialisi.

Al giorno 8, mentre nel campione con una concentrazione iniziale di solfato di 2.0 mM, la situazione era simile al giorno 3, nel campione con una concentrazione iniziale di solfato di 6.0 mM si è notato che Cad16 e Cad626 formavano aggregati eterospecifici. Il ceppo Cad626 come già osservato nel campione con l'ossigeno tendeva a disporsi attorno alle cellule di Cad16 formando la struttura a rosetta disposta su un piano.

Dal giorno 11 fino alla conclusione dell'esperimento, nel campione con il solfato ad una concentrazione di 2.0 mM, oltre a mancare completamente le forme di aggregazione, ambedue i ceppi hanno mostrato una crescita molto limitata (fig. 13).

Nel campione con la concentrazione di 6.0 mM di solfato, al giorno 11 si è osservato un aumento nel numero degli ammassi con cellule di Cad626 che crescevano negli spazi presenti tra le cellule di Cad16, ma allo stesso tempo questi avevano delle dimensioni ridotte e non formavano strutture tridimensionali.

Al giorno 14, una leggera diminuzione della concentrazione di solfato a 5.52 mM è stata accompagnata da una crescita del volume degli ammassi e del numero di cellule di Cad626 all'interno degli ammassi. In generale, in queste condizioni il volume dell'aggregato era più piccolo rispetto agli aggregati osservati nel lago e nei flaconcini con l'ossigeno.

Nell'ultimo campione c'è stata una generale diminuzione delle cellule, e non è stata osservata alcuna forma di aggregazione.

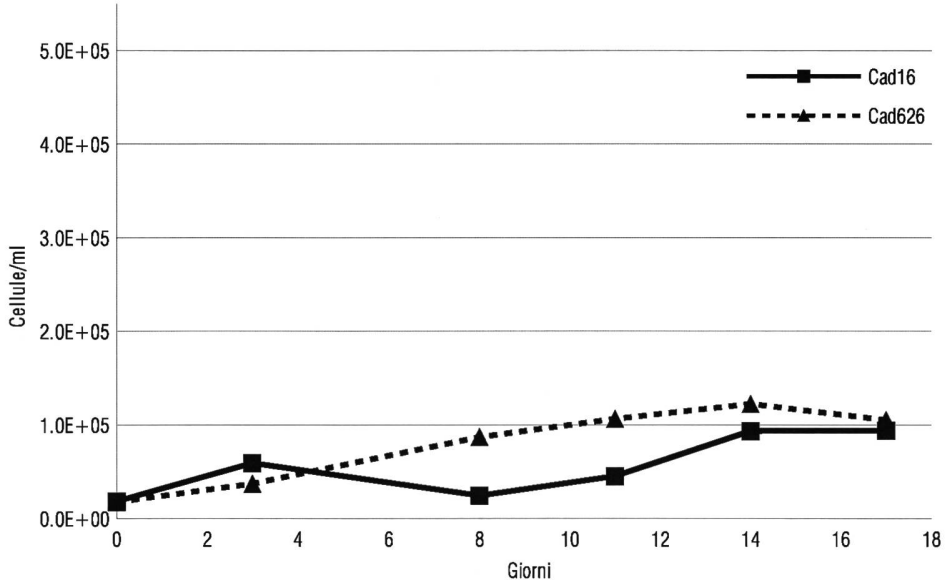

Fig. 12 - Cellule/ml presenti nel terreno misto allestito per la crescita di Cad16 e Cad626 in condizioni anerobiche e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 6.0 mM. La linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626, la linea continua rappresenta la crescita candidatus *T. syntrophicum* Cad16.

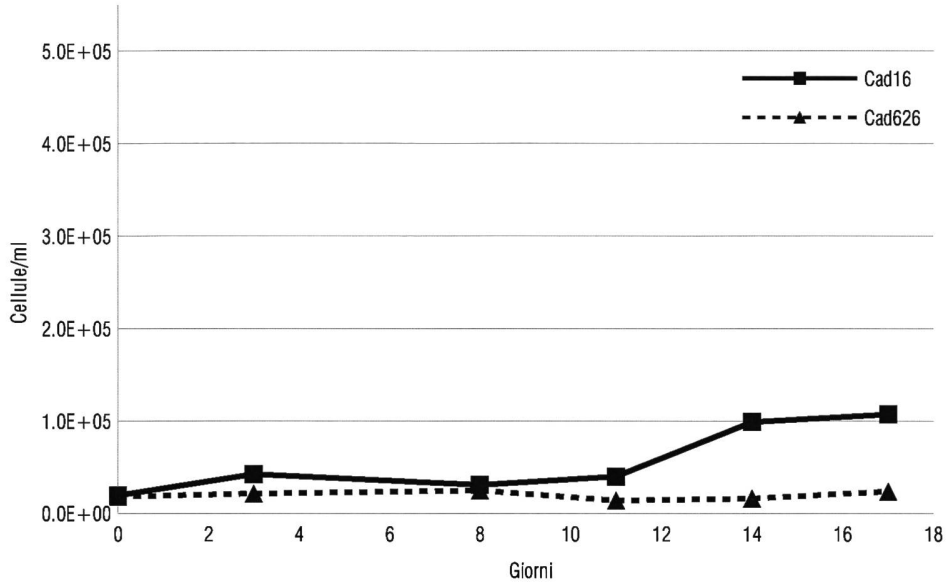

Fig. 13 - Cellule/ml presenti nel terreno misto allestito per la crescita di Cad16 e Cad626 in condizioni anerobiche e in presenza di una concentrazione iniziale di solfato pari a 2.0 mM. La linea tratteggiata rappresenta la crescita di *D. thiozymogenes* Cad626, la linea continua rappresenta la crescita candidatus *T. syntrophicum* Cad16.

DISCUSSIONE

Riproduzione degli aggregati in laboratorio

I campioni d'acqua del lago ci hanno fornito delle importanti informazioni preliminari sull'aggregato. A tutte e tre le profondità prese in esame le dimensioni degli aggregati erano comprese tra i 60 e 240 µm di diametro, con una struttura di base costituita da una porzione centrale fatta prevalentemente da gruppi di Cad16, mentre i Cad626 si disponevano nelle "nicchie" che si creano tra le cellule di Cad16.

Avendo trovato traccia degli aggregati a tutte e tre le profondità abbiamo utilizzato i sacchetti di dialisi per monitorare con attenzione la crescita dei batteri nel lago, avendo così la certezza che questi fossero ben isolati dalla flora batterica del lago.

Le osservazioni di questo esperimento ci hanno permesso di stabilire che delle colture pure utilizzate solo quelle contenenti cellule di Cad16 riuscivano a crescere con facilità mentre la crescita dei Cad626 era fortemente compromesso. Lo stesso fenomeno si è verificato nelle colture miste di Cad16 e Cad626. Questo comportamento potrebbe essere dovuto alla cresciuta anossia e alla diminuzione dei potenziali di ossidoriduzione (fig. 2).

Solo nel campione incubato a 10.5 m le cellule di Cad626 hanno mostrato una crescita, prima sottoforma di cellule libere e poi, successivamente, hanno incominciato a riunirsi verso la periferia degli ammassi di Cad16 per crescere negli spazi presenti all'interno degli ammassi. La struttura individuata in questo esempio è la più vicina alla riproduzione di un aggregato in condizioni ambientali. La grande differenza tra questa forma di aggregazione e gli aggregati isolati nel lago sono le dimensioni, questi aggregati artificiali erano significativamente più grandi di quelli osservati in situ. Ma questo risultato pone alcune domande interessanti: gli aggregati si formano a 10.5 m per poi sedimentare a 11.5 m e 12.5 m? Se questo è vero qual è il fattore chiave che induce l'aggregazione? Perché?

Nel primo esperimento che abbiamo condotto, Cad16 e Cad626 sono stati incubati in co-coltura in presenza di eccessi di ioni solfato (10 mM), in strette condizioni anaerobiche, e sotto l'effetto del mescolamento continuo. Come già osservato nelle colture incubate all'interno di sacchetti di dialisi posizionate nel chemoclinio del lago, la crescita di Cad626 era bassa, mentre i Cad16 hanno dominato sia in condizioni statiche che di mescolamento. La mancanza di crescita in questi esperimenti suggerisce che utilizzare un'alta concentrazione di nutrienti potrebbe inibire la crescita dei Cad626 e quindi la formazione degli aggregati. Inoltre nel livello superiore del chemoclinio in cui gli aggregati sono più frequenti la pressione parziale di ossigeno è superiore rispetto agli strati più profondi. Perciò l'ossigeno potrebbe rappresentare uno dei fattori chiave che influenzano l'aggregazione. Aggregazione che potrebbe aiutare i Cad626 a difendersi dagli effetti tossici dell'ossigeno come osservato per i batteri solfato-riduttori presenti nei tappeti cianobatterici del Solar Lake in Egitto (Dolla *et al.* 2006).

Al fine di valutare il ruolo di ossigeno e del solfato sulla formazione degli aggregati abbiamo allestito un secondo esperimento per confrontare la crescita in presenza di una concentrazione di ossigeno al 5% contro una crescita in assenza di ossigeno e con diverse concentrazioni di solfato (cioè 2.0 e 6.0 mM).

Nella coltura allestita in presenza di ossigeno dopo un predominio iniziale da parte dei Cad16 anche i Cad626 hanno iniziato a crescere e a interagire con i Cad16 portando alla formazione degli aggregati, formazione che si è verificata nel momento in cui entrambe le specie avevano terminato la loro crescita esponenziale. Stando a quanto noto fino ad ora, questo rappresenta il primo caso in cui sono stati riprodotti in laboratorio degli aggregati simili a quelli cresciuti nel lago. In particolare, il numero degli aggregati è stato maggiore nel campione

contenente una concentrazione iniziale di ioni solfato di 6.0 mM. Il significato dell'osservazione non è chiaro e si richiedono ulteriori esperimenti per analizzare gli scambi dei composti dello zolfo tra le due specie batteriche. D'altra parte, l'effetto dell'ossigeno è abbastanza netto e sicuramente influenza la probabilità di formare gli aggregati come avevamo inizialmente ipotizzato. Probabilmente l'aggregato rappresenta un mezzo per difendere i Cad626 dall'esposizione a bassi livelli di ossigeno presenti nell'ambiente.

È possibile che l'aggregato rappresenti uno dei mezzi con cui gli organismi unicellulari si mettano al riparo dagli effetti tossici dell'ossigeno e, al tempo stesso consenta una maggiore interazione delle vie metaboliche tra i due organismi che in questo modo riescono a trarre pieno vantaggio dalla vita in sintrofia.

BIBLIOGRAFIA

Amann R. I., Krumholz L. & Stahl D. A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Journal of Bacteriology, 172: 762-770.

Alfreider A., Pernthaler J., Amann R., Sattler B., Glöckner F. O., Wille A. & Psenner R. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. Applied Environmental Microbiology, 62: 2138–2144.

Decristophoris P. M. A., Peduzzi S., Ruggeri-Bernardi N., Hahn D. & Tonolla M. 2009. Fine scale analysis of shifts in bacterial community structure in the chemocline of meromictic lake Cadagno, Switzerland. Journal of Limnology, 68: 16-24.

Dolla A., Fournier M. & Dermoun Z. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. Journal of Biotechnology, 126: 87–100.

Fischer K., Hahnn D., Amann R. I., Daniel O. & Zeyer J. 1995a. In situ analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. Canadian. Journal of Microbiology, 41: 666–673.

Glöckner F. O., Amann R. I., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K. & Schleifer K. H. 1996. An optimized in situ hybridization protocol for planktonic bacteria. Systematic and Applied Microbiology, 19: 403-406.

Hahnn D., Amann R. I., Ludwig W., Akkermans A. D. L. & Schleifer K. H. 1992 Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. Journal of General Microbiology, 138: 879–887.

Imhoff J. 2001. Transfer of *Pfennigia purpurea* Tindall 1999 (Amoebobacter purpureus Eichler and Pfennig 1988) to the genus *Lamprocystis* as *Lamprocystis purpurea* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1699-1701.

ISO Organization IS. 1998. Water quality. Detection and enumeration of Legionella. International Organization for Standardization, 11731: 1-16.

Jansenn P. H., Schuhmann A., Bak F. & Liesack W. 1996. Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa Thiozymogenes* gen. nov. Archives of Microbiology, 166: 184-192.

Lamprecht M. R., Sabatini D. M. & Carpenter A. E. 2007. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. Biotechniques, 42: 71-5.

Peduzzi S. 2003. Interaction among sulfate-reducing and purple sulfur bacteria in the chemocline of meromictic lake Cadagno, Switzerland. In Swiss Federal Institute of Technology Zürich. Diss. ETH No15015.

Peduzzi S., Tonolla M. & Hahn D. 2003. Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic lake Cadagno, Switzerland. FEMS Microbiology Ecology, 45: 29-37.

Peduzzi S., Storelli N., Welsh A., Demarta A., Decristophoris P., Peduzzi R., Hahn D. & Tonolla M. 2011. *Thiocystis chemoclinalis* sp. nov. and *Thiocystis cadagnonensis* sp. nov., two new motile purple sulfur bacteria isolated from the chemocline of meromitic lake Cadagno, Switzerland. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 1682-1687.

Peduzzi S., Storelli N., Welsh A., Peduzzi R, Hahn D., Perret X., & Tonolla M. 2012. Candidatus "*Thiodictyon syntrophicum*", sp. nov., a new purple sulfur bacterium isolated from the chemocline of lake Cadagno forming aggregates and specific associations with Desulfocapsa sp. Journal of Systematic and Applied Microbiology (accepted).

Porter K. & Feig Y. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnology and Oceanography, 25: 943-948.

Ramsing N. B., Fossing H., Ferdelman T. G., Andersen F. & Thamdrup B. 1996. Distribution of Bacterial Populations in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) Quantified by In Situ Hybridization and Related to Chemical Gradients in the Water Column. Applied Environmental Microbiology, 62: 1391–1404.

Spring S., Amann R., Ludwig W., Schleifer K. H., Van Gemerden H. & Petersen N. 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. Applied Environmental Microbiology, 59 :2397–2403.

Swedlow J. R., Andrews P. D. & Platani M. 2009. In vivo imaging of mammalian cells: image acquisition and analysis. In Goldman and Spector (eds), Live Cell Imaging, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Tonolla M., Demarta A., Peduzzi R. & Hahn D. 1999. In situ analysis of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic lake Cadagno (Switzerland). Applied Environmental Microbiology, 65: 1325-1330.

Tonolla M. Demarta A., Peduzzi S., Hahn D. & Peduzzi R. 2000. In situ analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic lake Cadagno (Switzerland). Applied Environmental Microbiology, 66: 820-824.

Tonolla M., Peduzzi R. & Hahn D. 2005. Long-term population dynamics of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of lake Cadagno, Switzerland. Applied Environmental Microbiology, 71: 3544-50.

TONOLLA M. & PEDUZZI R. 2006. Lake Cadagno, a model for microbial ecology. In Milieux extrêmes: conditions de vie en milieu alpin et milieu marin. Vol. 1. PEDUZZI R., TONOLLA M., & BOUCHER-RODONI R., (eds). Documenta ISSN 1424-4993 Edizioni Centro Biologia Alpina di Piora, Bellinzona, Switzerland, 21-52 pp.

VECCHIETTI N. 2011. Aggregates between *Thiodictyon syntrophicum* strain CAD16 and *Desulfocapsa thiozymogenes* strain CAD626 thrive under both environmental and laboratory growth conditions. Tesi di Laurea Specialistica Università degli Studi dell'Insubria.

WAGNER M., ERHART R., MANZ W., AMANN R., LEMMER H., WEDI D. & SCHLEIFER K.-H. 1994b. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge. Applied Environmental Microbiology, 60: 792–800.

WIDDEL F. & BAK F. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. The Prokaryotes, 4: 3352–3378.

ZARDA B., HAHN D., CHATZINOTAS A., SCHÖNHUBER W., NEEF A., AMANN R. I. & ZEYER J. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. Archives of Microbiology, 168: 185-192.