Zeitschrift: Bollettino della Società ticinese di scienze naturali

Herausgeber: Società ticinese di scienze naturali

Band: 112 (2024)

Artikel: Cambiamenti morfologici del Chromatium okenii : un'indagine

sperimentale sulla ricreazione di un ambiente naturale in laboratorio

Autor: Poli, Natan / Di Nezio, Francesco / Roman, Samuele / Storelli, Nicola

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-1055164

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 18.11.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Cambiamenti morfologici del *Chromatium okenii*: Un'indagine sperimentale sulla ricreazione di un ambiente naturale in laboratorio

Natan Poli^{1,2}, Francesco Di Nezio^{1,4}, Samuele Roman^{1,3} e Nicola Storelli^{1,4*}

Scuola universitaria professionale della Svizzera italiana (SUPSI), Dipartimento ambiente costruzioni e design SUPSI (DACD), Istituto microbiologia (IM); Via Flora Ruchat Roncati 15, 6850 Mendrisio, Svizzera
 Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della vita (DBSV), Università degli studi dell'Insubria,

nto di Biotecnologie e Scienze della vita (DBSV), Università degli studi dell'Insubria via Ravasi 2, 21100 Varese, Italia

³ Fondazione Centro Biologia Alpina Piora, Via Mirasole 22a, 6500 Bellinzona, Svizzera
 ⁴ Dép. Sciences végétales, Unité de Microbiologie, Universite de Genève,30, quai Ernest-Ansermet, 1211 Genève 4, Svizzera

* nicola.storelli@supsi.ch

Riassunto: La bioconvezione è un fenomeno osservato finora solo nel lago di Cadagno, negli oceani ed in laboratorio. Nel lago il fenomeno è attribuito al "purple sulfur bacterium" (PSB) anaerobico Chromatium okenii, il quale nuota attivamente verso la luce (fototassi) e si blocca repentinamente al raggiungimento dell'ossigeno, aumentando la densità dell'acqua, e quindi precipitando. Questo salire attivamente e scendere passivamente crea un moto convettivo, ossia la bioconvezione. Sebbene sia stato studiato in laboratorio con altre specie batteriche, la sua riproduzione con C. okenii si è rivelata difficoltosa. In questo studio sono state investigate le differenze fenotipiche tra cellule campionate dal lago e cellule coltivate in laboratorio, con l'obbiettivo di cercare di comprendere meglio i fattori che ostacolano la riproduzione in vitro della bioconvezione. A tal fine, è stato pianificato un esperimento per verificare i cambiamenti morfologici di C. okenii tra cui la presenza del flagello, in diversi regimi di solfuro (H₂S), composto necessario a questa specie per la fotosintesi anaerobica. Dai risultati dell'esperimento è emerso che C. okenii non mostra differenze significative nel tasso di crescita così come nella morfologia cellulare, con la costante assenza del flagello, per tutte le concentrazioni di solfuro somministrato. Inoltre, abbiamo potuto dimostrare che in natura, chemoclinio del lago di Cadagno, nei mesi autunnali quando la bioconvezione è assente le cellule di C. okenii mantengono il flagello, e quindi la loro capacità di nuotare in maniera attiva. Il passaggio delle cellule di C. okenii prelevate dal lago, al terreno di cultura ha evidenziato la progressiva perdita del flagello e modifica dei tratti morfologici. Sebbene riprodurre la bioconvezione in laboratorio risulti ancora inattuabile, questo studio ha evidenziato che oltre a luce e solfuro, anche altri fattori (che necessitano di ulteriori approfondimenti fisiologici e molecolari) influenzano la motilità di C. okenii. La loro comprensione è fondamentale per migliorare la riproduzione del fenomeno in laboratorio e poterlo quindi studiare più approfonditamente.

Parole chiave: bioconvezione, Chromatium okenii, flagello, in vivo, in vitro, lago di Cadagno

Morphological changes of *Chromatium okenii*: An experimental investigation of the recreation of a natural environment in a laboratory setting

Abstract: Bioconvection is a phenomenon observed so far only in Lake Cadagno, in the oceans and in the laboratory. In the lake, the phenomenon is attributed to the anaerobic 'purple sulfur bacterium' (PSB) Chromatium ohenii, which actively swims towards the light (phototaxis) and stops abruptly upon reaching oxygen, increasing the density of the water, and thus precipitating. This active ascent and passive descent creates convective motion, i.e. bioconvection. Although it has been studied in the laboratory with other bacterial species, its reproduction with C. okenii has proved difficult. In this study, the phenotypic differences between cells sampled from the lake and cells cultivated in the laboratory were investigated, with the aim of trying to gain a better understanding of the factors that hinder the in vitro reproduction of bioconvection. To this end, an experiment was planned to test the morphological changes of C. okenii, including the presence of the flagellum, in different regimes of sulfide (H₂S), a compound required by this species for anaerobic photosynthesis. The results of the experiment showed that C. okenii shows no significant differences in growth rate as well as cell morphology, with the constant absence of the flagellum, for all concentrations of sulphide administered. Furthermore, we were able to show that in the chemocline of Lake Cadagno, in the autumn months when bioconvection is absent, C. okenii cells retain the flagellum, and thus their ability to swim actively. Transferring the C. ohenii cells taken from the lake to the culture medium showed the progressive loss of the flagellum and modification of morphological traits. Although reproducing bioconvection in the laboratory is still impractical, this study showed that in addition to light and sulfide, other factors (which require further physiological and molecular investigation) influence the motility of C. okenii. Understanding these is essential to improve the reproduction of the phenomenon in the laboratory and thus be able to study it in greater depth.

Keywords: bioconvection, Chromatium okenii, Flagellum, in vitro, in situ, lake Cadagno

INTRODUZIONE

Il lago di Cadagno, situato in Val Piora a 1921 m sul livello del mare nelle Alpi svizzere meridionali (46°33 N, 8°43 E), presenta il fenomeno della meromissi, cioè due strati d'acqua che non si mescolano mai (Tonolla et al. 2017). Lo strato superiore, chiamato mixolimnio, è soggetto all'azione del vento che ne permette il mescolamento delle acque. Lo strato inferiore, detto monimolimnio, ha una densità più elevata che impedisce il rimescolamento con l'acqua soprastante. I due strati sono divisi da una zona di transizione chiamata chemoclino che è caratterizzato da rapidi cambiamenti chimici: si passa da un ambiente ricco di ossigeno (ossidante) ad uno privo di ossigeno (riducente) (Fig. 1). Il mixolimnio, alimentato da acqua proveniente da rocce di tipo granitico, è situato tra 0 e 11 m. L'acqua di questo strato è povera di sali minerali, contiene ossigeno ed è popolata dalla tipica fauna e flora dei laghi alpini, tra cui pesci, alghe, zooplancton e fitoplancton. Il monimolimnio è alimentato da sorgenti sottolacustri che sgorgano acqua di origine carsica, ricca di carbonati, solfati e magnesio. Grazie alla sua maggiore densità, si posiziona nella parte inferiore della colonna d'acqua, tra i 13 m ed il fondale del lago, la cui massima profondità è di 21 m. Il monimolimnio presenta acque con alto contenuto di sali minerali e assenza di ossigeno disciolto. Questo tipo di stratificazione, dovuto all'intrusione di acque ricche di sali da sorgenti saline situate sul fondo della conca lacustre, è noto come meromissi crenogenica. La stratificazione permanente del lago di Cadagno lo rende un sito di grande interesse scientifico. Infatti, la presenza di una zona anossica permanente lo rende un "Modern Analogues" (Canfield et al. 2010; Xiong et al. 2019; Philippi et al. 2021), ovvero un ambiente che presenta delle caratteristiche simili a quelle che si presume esistessero all'epoca in cui comparvero le prime forme di vita complessa, nell'era Proterozoica (da circa 2.5 miliardi a 540 milioni di anni fa).

Nello strato profondo, in condizioni di anossia e di assenza di luce, predominano comunità di batteri eterotrofi solfato-riduttori (SRB, "Sulfate Reducing Bacteria"). Questi microorganismi svolgono un ruolo fondamentale nel ciclo dello zolfo (Peduzzi et al. 2003; Tonolla et al. 2000, 2005). Respirando il solfato (SO₄²), che funge da accettore di elettroni, producono solfuro (H₀S) come sostanza scarto. Il solfuro prodotto dai SRB si diffonde lungo la colonna d'acqua e, raggiungendo la zona anossica e luminosa del lago, viene utilizzato dai solfobatteri fotosintetici anaerobici come donatore di elettroni nella fotosintesi anossigenica (Storelli et al. 2013; Luedin et al. 2019; Di Nezio et al. 2021). Questi fototrofi anaerobici proliferano durante il periodo estivo nella zona anossica del chemoclino, raggiungendo considerevoli concentrazioni cellulari (10⁷ cellule per ml) e creando una "fascia batterica" che conferisce all'acqua un colore rosa. All'interno di questa fascia si trovano due gruppi di batteri con metabolismi simili (Danza et al. 2018): i solfobatteri verdi (Green Sulfur Bacteria GSB) e i solfobatteri viola (Purple Sulfur Bacteria PSB). Tra questi ultimi si distinguono due morfologie differenti: una di dimensioni maggio-

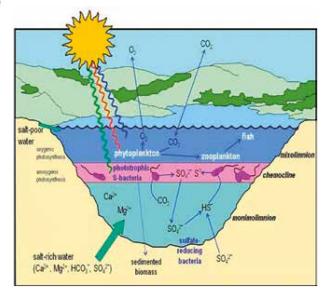


Figura 1: Schema del lago meromittico di Cadagno © CBA. La parte superiore, il mixolimnio (blu), ricco di ossigeno e povero di sali minerali ospita le comuni forme di vita presenti nei laghi alpini. Lo strato inferiore, monimolimnio (verde), completamente privo di ossigeno e ricco in sali minerali come SO₄², Mg²⁺, Ca²⁺, HCO₃, provenienti dalla dolomia. La zona di transizione, chemoclinio (rosa), ospita una comunità di batteri fototrofi anaerobici, i PSB e GSB.

ri rappresentata unicamente dalla specie *Chromatium ohenii* (Luedin et al. 2019), l'altra di dimensioni inferiori, comprendente le altre specie di PSB (Peduzzi et al. 2011, 2012; Luedin et al. 2018). Le caratteristiche generali dei vari microorganismi citati sono riassunte nella tabella 1.

Tra le specie che condividono questa nicchia ecologica $C.\ ohenii$ riveste un ruolo di particolare rilievo. Sebbene costituisca solo il 10-15% delle conte totali batteriche, grazie alla sua notevole taglia cellulare (8-10 mm) occupa circa l'80-90% del biovolume disponibile, soprattutto nei primi mesi estivi. I PSB hanno la possibilità di immagazzinare zolfo elementare in forma di granuli intracellulari che possono in seguito essere ulteriormente ossidati fino a ${\rm SO_4}^2$. I granuli dei PSB sono osservabili sia in microscopia ottica che rilevabili tramite citometria di flusso, monitorando il parametro della granularità interna (SSC) (Danza et al. 2017).

C. okenii ha una morfologia a bacillo e presenta flagelli in posizione lofotrica, ovvero concentrati ad una sola estremità. Grazie alla sua motilità flagellare e alla chemo- e fototassi, questa specie genera nel lago un fenomeno conosciuto come bioconvezione, finora descritto in ecosistemi d'acqua dolce unicamente nel lago Cadagno (Sommer et al. 2017; Sepúlveda Steiner et al. 2021, 2023). La bioconvezione è un processo nel quale vi è un moto circolare dell'acqua generato dal movimento dei batteri. Le cellule di C. okenii, stimolate a risalire lungo la colonna d'acqua dalla maggiore intensità luminosa ma bloccate dalla presenza di ossigeno, si accumulano nell'interfaccia tra acqua ossica e anossica. Quando la maggiore densità locale causata dall'accumulo di cellule supera la densità del liquido, si verifica la caduta di piccole goccioline di cellule e acqua verso lo strato inferiore. In una zona a minore luminosità, queste cellule risalgono attivamente, generando così un fenomeno continuo che causa un'omogeneità termica e di conducibilità misurabile all'interno della fascia batterica

Ricerche condotte sul lago Cadagno hanno ipotizzato una correlazione tra la maggior durata del periodo luce di giugno (Storelli et al. 2024), luglio e agosto (circa 16-14 ore) alla presenza di bioconvezione, che ha come effetto quello di avvantaggiare il suo promotore rispetto agli altri PSB e GSB (Di Nezio et al. 2023). Il fenomeno è stato ulteriormente studiato in laboratorio ma le differenze di comportamento e morfologia con le cellule osservate nell'ambiente naturale non hanno permesso di giungere alla piena comprensione.

In laboratorio le cellule sono coltivate in un terreno di coltura liquido, costituito da acqua con aggiunta di sali minerali e solfuro d'idrogeno, la cui conducibilità è molto maggiore rispetto all'acqua dello strato batterico nel lago. Oltre alla differenza di composizione, vi è anche una diversa dinamica di contatto con il solfuro: in laboratorio si ha una concentrazione iniziale di circa 1 mM che viene consumata durante la crescita della coltura, mentre nel lago la concentrazione di solfuro varia a seconda della profondità e presenza o meno di bioconvezione (tra 0 e 0.06 mM).

La capacità di isolare i microrganismi dal loro ambiente naturale e di coltivarli in condizioni controllate di laboratorio è stata fondamentale per far progredire in modo sistematico le nostre attuali conoscenze sul comportamento, la fisiologia e l'adattabilità dei microorganismi (Vartoukian et al. 2010; Stewart 2012).

Tuttavia a differenza delle condizioni in laboratorio l'ambiente naturale dei microrganismi presenta condizioni fluttuanti, influenzate da vari fattori ambientali, sia biotici che abiotici, che ne modellano lo stile di vita e le strategie di sopravvivenza e adattamento (Palkova 2004; Barreto et al. 2020). Quando vengono trasferiti in condizioni di laboratorio, i microorganismi appena isolati, non più soggetti alle limitazioni della crescita in natura, vanno spesso incontro alla perdita di tratti eco-fisiologici chiave attraverso l'adattamento fenotipico o mutazioni genetiche a lungo termine (Kuthan et al. 2003). Ciò porta a cambiamenti nella morfologia cellulare, nella fisiologia e nella fitness, con le prime evidenze di questo processo di adattamento osservabili già entro pochi giorni dalla coltivazione (Eydallin et al. 2014).

Studi precedenti hanno evidenziato come le specie possano subire alterazioni o perdite concomitanti di più tratti, ma poco si sa se queste perdite avvengano in modo sinergico o indipendente. Ad esempio, è stato osservato come la motilità di *Myxococcus xanthus*, possa rapidamente decrescere in condizioni di bassa pressione selettiva in ambienti artificiali di laboratorio (Velicer et al. 1998). Altro esempio è il cambiamento della morfologia cellulare in *Vibrio cholerae*, che assume una forma allungata, facilitando la formazione di biofilm (Fernandez et al. 2020).

Nonostante le ampie implicazioni ecologiche che la transizione dei microrganismi dal loro habitat naturale all'ambiente di laboratorio può avere, rimane difficile comprendere le ragioni dei cambiamenti fisiologici osservati. Per quanto riguarda C. okenii LaCa cresciuto in laboratorio, si osserva un cambio di forma della cellula e soprattutto l'assenza di flagello, e quindi di movimento attivo in funzione dei vari stimoli (tassie). Per poter eseguire studi più approfonditi in laboratorio sul fenomeno della bioconvezione risulta quindi cruciale l'analogia di comportamento e morfologia tra cellule del lago e di laboratorio. In questo studio abbiamo in primo luogo verificato se in assenza di bioconvezione, osservabile normalmente in settembre, la popolazione di C. okenii nella fascia batterica conservi il flagello oppure no (come in laboratorio). Dopodiché abbiamo modificato l'apporto di solfuro nelle culture di laboratorio per verificare un suo eventuale ruolo nel determinare il movimento tramite flagello delle culture di C. okenii LaCa in laboratorio.

MATERIALI E METODI

A) Campionamento

L'analisi della colonna d'acqua del lago di Cadagno è stata effettuata il 20.09.2023 ed è stata fatta con l'utilizzo di una sonda multiparametrica detta CTD, sigla che sta per conducibilità (C), temperatura (T) e profondità (D) (CTD115M, Sea & Sun Technology, Trappenkamp, Germania) dotata di sensori di pressione (bar), temperatura (C°), conducibilità (mS/cm), ossigeno disciolto (mg/L) e torbidità (FTU, Formazine Turbidity Unit). Inoltre, la CTD è ulteriormente equipaggiata con un sensore di radiazione fotosinteticamente attiva

Tabella 1: In questa tabella vengono riassunte le caratteristiche principali delle specie batteriche anaerobiche che popolano la fascia batterica nella parte inferiore del chemoclino del lago di Cadagno.

	PSB: Purple Sulfur Bacteria grandi	PSB: Purple Sulfur Bacteria piccoli	GSB: Green Sulfur Bacteria
Famiglia	Chromatiaceae	Chromatiaceae	Chlorobiaceae
Genere	Chromatium	Lamprocystis, Thiocystis e Thiodictyon	Chlorobium
Specie	Chriomatium okenii	Lamprocystis purpurea e roseopersicina Thiocystis chemoclinalis e cadagnonensis Thiodictyon syntrophicum	Chlorobium phaeobacteroides e clathratiforme
Forma e Taglia	Bastoncino 8-10 μ m	Cocchi/bastoncino tra i 2-4 μm	Bastoncini 0.5-1.0 μm
Granuli di zolfo	Intracellulari	Intracellulari	Extracellulari
Motilità	Flagellare	Vacuoli gassosi e flagellare	Vacuoli gassosi
Fissazione CO ₂	Ciclo di Calvin	Ciclo di Calvin	Ciclo inverso dell'acido tricarbossilico

(PAR) (LI-COLBiosciences, Lincoln, NE), che rileva la gamma spettrale (banda d'onda) della radiazione solare da 400 a 700 nm utilizzata dagli organismi fotosintetici nel processo di fotosintesi, e un sensore di ficocianina delle alghe blu-verdi (BGAPC) (Turner Designs, San Jose, CA). Per il campionamento è stato montato un tubo Tygon (lungo 20 m, diametro interno 6.5 mm e volume 0.66 L) per pompare l'acqua in superficie a una portata di circa 1.0 L/min utilizzando una pompa per liquidi a membrana (KNF Neuberger Inc., Trenton, NJ). I campioni sono stati prelevati a 3 profondità diverse, ossia parte superiore della fascia batterica (12.63 m), definita dal sensore di turbidità (FTU>10), dopo 50 cm piu in basso (13.13 m) e nella parte inferiore (14.20 m). Sono stati prelevati 100 mL di acqua e sono stati conservati in 3 boccette a tappo di gomma e sono stati poi analizzati per parametri microbiologici (citometria a flusso) entro l'ora successiva e analizzati per parametri di mobilità il giorno successivo tramite microscopia, dove i filmati sono stati registrati a 10 fotogrammi al secondo per 10 s e convertiti in sequenze di immagini. Le analisi si sono protratte fino all'ottavo giorno dopo il prelievo per testare la presenza del flagello dopo incubazione in laboratorio con un periodo di 16 ore di luce e 8 di buio in un incubatore AlgaeTron AG 130 con una intensità luminosa di 3.5 μmol/m²/s PAR misurato con un LI-180 spettrometro portatile (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

B) Condizioni di crescita dei Chromatium okenii

Per poter comprendere cosa influenza la morfologia e la presenza/assenza del flagello del *C. okenii* è stato deciso di compiere un secondo esperimento basato su come variano questi parametri con diversi regimi di solfuro.

Sono stati preparati 3 triplicati biologici inoculati con 500 µl di cultura pura di *C. okenii* presente in laboratorio per un totale di 9 boccette a cui sono sono state somministrate tre diversi regimi di H₂S (Tab. 2): Standard con l'aggiunta di 0.008 mM di solfuro ad inizio esperimento come usualmente nelle colture di laboratorio, Daily con somministrazioni ogni due giorni di 0.008 mM (11 aggiunte totali), e Hourly con somministrazioni orarie durante i periodi diurni (con un totale di 4/8 somministrazioni giornaliere) di terreno fresco con concentrazio-

ne di solfuro di 0.006 mM (58 volte in totale); per ogni condizione sono stati monitorati regolarmente tramite citometria e microscopia i seguenti parametri granulosità della cellula (SSC), motilità, crescita della coltura e aspect ratio, quest'ultima è una misura metrica che mette in proporzione la lunghezza con la larghezza e serve per valutare sia la morfologia cellulare sia la motilità (In quanto quest'ultima è influenzata dalla forma cellulare). Il terreno utilizzato per l'esperimento è stato il terreno di Pfennig I (Eichler & Pfennig 1988), contenenti per litro: $0.2\bar{5}$ g di KH_2PO_4 , 0.34 g di NH_4Cl , 0.5 g di $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.25 g di $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.34 g di KCl, 1.5 g di NaHCO₃, 0.02 mg di vitamina B12 e 1,0 mL di soluzione di oligoelementi SL10. Il terreno è stato preparato in una bottiglia da 2.0 L utilizzando una composizione di gas composta dell'80% di N₂ e del 20% di CO₂ secondo (Widdel & Bak 1992) ed è stato ridotto con l'aggiunta di una soluzione neutralizzata di $Na_2S \times 9H_2O$ a una concentrazione di 0.6 mM S₂⁻ e regolato a un pH di circa 7.1. Tutte le colture sono state incubate a temperatura ambiente (22-23C°) e sottoposte a un fotoperiodo chiaro/scuro di 16/8 h con un'intensità luminosa di 136.4 µmol/m²/s PAR misurata con uno spettrometro portatile LI-180 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

C) Citofluorimetro a flusso

I batteri fototrofi dello zolfo in colture pure sono stati enumerati mediante citofluorimetro a flusso (FCM) misurando eventi di particelle di autofluorescenza simili alla clorofilla. Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato un citometro BD Accuri C6 (Becton Dickinson, San Jose, CA) dotato di due laser (488 e 680 nm), due rivelatori a dispersione e quattro rivelatori a fluorescenza (laser 488 nm: FL1 = 533/30, FL2 = 585/40, FL3 =670; laser 640 nm: FL4 = 675/25). Per la caratterizzazione delle particelle sono stati utilizzati due parametri principali: la dispersione diretta (FSC), che consente la discriminazione delle cellule in base alle dimensioni, e la dispersione laterale 90° (SSC), che è proporzionale alla complessità interna delle cellule. All'inizio dell'esperimento è stata applicata una soglia di 2'000 per l'FSC-H per poi applicare una soglia di 10'000 verso la fine per escludere la maggior parte delle piccole particelle indesiderate. Inoltre, per discriminare le cellule

Tabella 2: In questa tabella viene riassunto l'esperimento per verificare eventuali cambiamenti morfologici del *C. okenii* con diversi regimi di solfuro e la concentrazione finale di solfuro che avrebbe raggiunto il triplicato se non fosse stato consumato il solfuro dato.

	Standard	Daily	Hourly
Regimi di solfuro	0.6 mM iniziale + 0.008 mM	0.6 mM + (0.008 mM x 11 giorni)	0.6 mM + (0.006 mM x 58 h)
e concentrazione totale finale	= 0.608 mM	= 0.703 mM	= 1.15 mM
Tipo di sistema	Chiuso	Semichiuso	Dinamico
Fonte di solfuro	Boccetta contenente solfuro puro	Boccetta contenente solfuro puro	Terreno Pfennig

Tabella 3: In questa tabella si può osservare la percentuale di cellule flagellate nel corso del tempo. Si può notare come più il tempo passa e più le cellule tendono a perdere il flagello.

	Prelievo	1° giorno dopo prelievo	4° giorno dopo prelievo	8° giorno dopo prelievo
% Cellule Flagellate	89%	53%	37%	23%

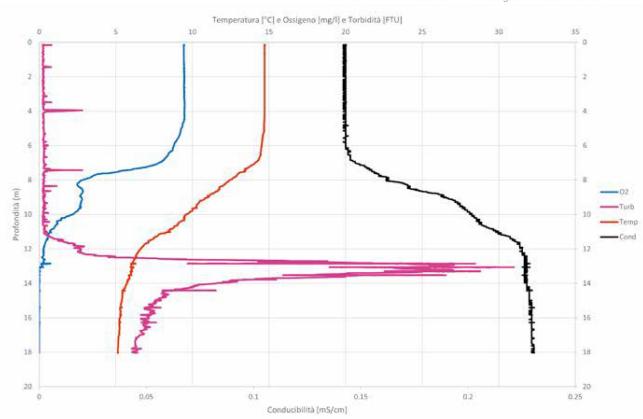


Figura 2: Questo grafico ci mostra il profilo di Temperatura, Ossigenazione, Conducibilità e Torbidità del lago di Cadagno nel momento del prelievo.

che emettono autofluorescenza a causa della clorofilla e della batterioclorofilla, è stata applicata una soglia FL3-A>1'100 su FL3 (fluorescenza rossa).

L'analisi dei campioni è stata eseguita come in Danza et al. (2017).

D) Ricerca flagellare

Il flagello delle cellule batteriche è stato analizzato su immagini acquisite con una telecamera a colori Zeiss Axiocam 305 collegata a un microscopio a epifluorescenza Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Oberkochen, Germania) utilizzando il software di imaging ZEN 2.6 (blue edition) (Zeiss, Oberkochen, Germania). Per ogni specie, sono state prese in considerazione tra le 15 e le 20 cellule in fase esponenziale per determinare la presenza di flagello tramite un ingrandimento 100x.

F) Analisi della motilità

Per analizzare la motilità sono state analizzati dei video acquisiti con un ingradimento 100x e con una telecamera a colori Zeiss Axiocam 305 collegata a un microscopio a epifluorescenza Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Oberkochen, Germania) utilizzando il software di imaging ZEN 2.6 (blue edition) (Zeiss, Oberkochen, Germania).

RISULTATI

Mobilità di C. okenii in assenza di bioconvezione

Il fenomeno di bioconvezione si osserva normalmente nei mesi estivi (giugno-agosto) nella fascia batterica nel chemoclino del lago di Cadagno. Il 20 settembre 2023 in assenza di bioconvezione è stato prelevato un campione della fascia batterica, che corrisponde la picco di turbidita attorno ai 13 metri di profondità (Fig. 2).

L'analisi del campione mediante microscopia ottica ha confermato la presenza del flagello e la mobilità delle cellule di *C. okenii*, quantificata tramite analisi numeriche dei filmati attorno al 89% (Tab. 3 colonna "prelievo"; Fig. 3A).

Il campione ambientale è poi stato trasferito in un incubatore con condizioni di laboratorio (vedi materiali e metodi). È interessante osservare che la percentuale di cellule di *C. okenii* potenzialmente mobili (con flagello) diminuisce costantemente durante l'incubazione in laboratorio (Tab. 3).

Crescita di C. okenii in differenti regimi di solfuro (H₂S)

Osservando che *C. okenii* in laboratorio tende a perdere il flagello anche in condizioni di luce simili a quelle estive, si è deciso di sperimentare se le variazioni della motilità e della morfologia fossero dovute da una differenza di nutrimento. Infatti, oltre ai periodi di luce, una delle grandi differenze tra l'ambiente naturale e quello di laboratorio è la presenza di H₂S, necessario come donatore di elettroni nella fotosintesi anossigenica. In questo esperimento è stato confrontato il fenotipo di *C. okenii* in differenti condizioni di apporto di solfuro durante la crescita (vedi Materiali e metodi) con quello di cellule isolate dal lago in settembre.

La figura 4 mostra l'andamento della crescita delle cellule nelle tre differenti condizioni di incubazione. Come si può osservare dal grafico, i tre regimi di aggiunta di $\rm H_2S$ non hanno portato a notevoli differenze.

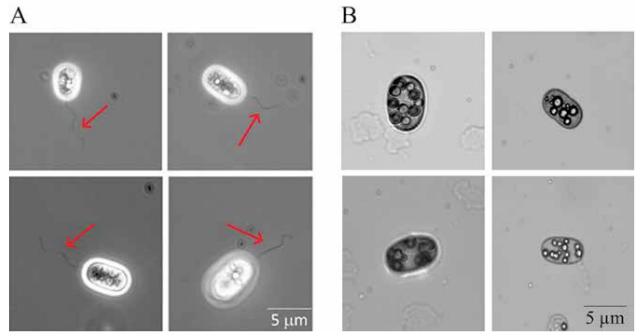


Figura 3: Immagini al microscopio contrasto di fase con ingrandimento 100x di A) 4 differenti cellule di *C. okenii* appena prelevate dal chemoclinio del lago di Cadagno il 20 settembre 2023, e B) 4 differenti cellule di *C. okenii* incubate 8 giorni in condizioni di laboratorio.

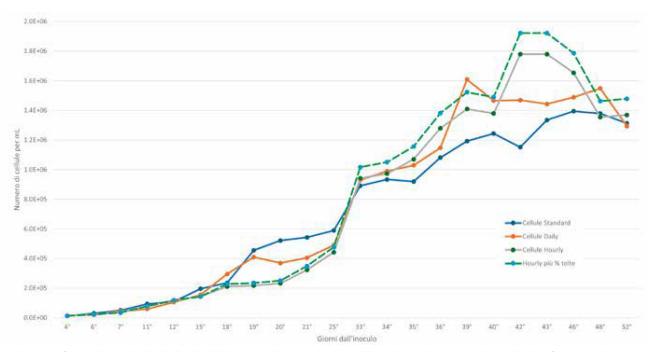


Figura 4: Curve di crescita di *C. okenii* in differenti condizioni misurate utilizzando un citometro a flusso. Nel grafico è stato inserito una quarta curva (in verde) che sarebbe la crescita dei Hourly tenendo conto dei microrganismi rimossi ad ogni aggiunta di terreno. Si può notare che il triplicato con crescita maggiore è quello a cui è stato dato più solfuro.

Tabella 4: In questa tabella si può osservare la granulosità (SSC) dei tre triplicati biologici misurata tramite un citometro a flusso. Come si può vedere dalla tabella il triplicato a cui è stato dato più solfuro è quello che alla fine dell'esperimento presentava più granuli di zolfo al suo interno.

	Standard	Daily	Hourly
Conc. H ₂ S totale	0.608 mM	0.703 mM	1.15 mM
Granulosità finale (Sottoforma di valori SSC)	1x10⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵

Differenze fenotipiche e mobilità di C. okenii

I diversi regimi di solfuro, che hanno fornito differenti concentrazioni finali, hanno anche influenzato la granulosità finale dei tre triplicati (Tab. 4). In particolare per la condizione Hourly, avendo ricevuto un apporto di solfuro maggiore rispetto agli altri due, presenta una granulosità (misurata in funzione del SSC = Side Scatter) più elevata.

Il grafico sulla forma cellulare (aspect ratio) dei tre campioni era molto lineare e l'andamento in questo caso era simile, se non uguale, per tutti. Per quanto riguarda la mobilità, durante il corso dell'esperimento non si è osservata in nessuna condizione di crescita l'aumento del numero di cellule di *C. okenii* provviste di flagello, e quindi attivamente mobili. Al contrario, a fine esperimento, l'analisi dei filmati ottenuti con la videocamera del microscopio ha evidenziato una diminuzione del numero di cellule mobili rispetto a quello iniziale. Tale diminuzione è anche visibile nelle immagini catturate dove si osservano batteri senza flagello (Fig. 5). Questa riduzione impedisce alle cellule di *C. okenii* di svolgere la bioconvezione in laboratorio.

Se da un lato l'aggiunta di grandi volumi di terreno per la condizione Hourly ha influenzato indirettamente il conteggio del numero di cellule, dall'altra parte ha permesso di evidenziare l'importanza dei co-fattori di crescita, come le vitamine e gli elementi traccia, per il mantenimento di un buono stato vitale delle cellule microbiche. Infatti, l'analisi al microscopio ottico ha rivelato la presenza di *C. okenii* sproporzionatamente più grandi della media nei campioni Daily e negli Standard, con dimensioni superiori ai 10 µm, mentre tali cellule erano assenti nei campioni Hourly (Fig. 6).

DISCUSSIONE

Il processo di bioconvezione conferisce un vantaggio ecologico al suo promotore, il PSB C. okenii, tuttavia, questo vantaggio è limitato nel tempo e presente solo tra giugno ed agosto quando le ore di luce e l'irradiazione solare sono maggiori (Di Nezio et al. 2023; Storelli et al. 2024). Durante il processo di bioconvezione, riconoscibile dai profili omogenei di temperatura e conducibilità a livello della fascia batterica, C. okenii presenta flagelli e una buona motilità (Sommer et al. 2017). In assenza di bioconvezione, tra fine agosto e ottobre, il fenotipo di C. okenii non cambia rispetto alle osservazioni precedenti: il flagello e la motilità rimangono invariati (Fig. 3A). Questo risultato indica che non è C. okenii a modificare il suo comportamento eco-fisiologico, ma che sono gli altri PSB e GSB a trarre maggior vantaggio dalle condizioni di luce ridotta, come già osservato in altri studi (Danza et al. 2018; Di Nezio et al. 2023).

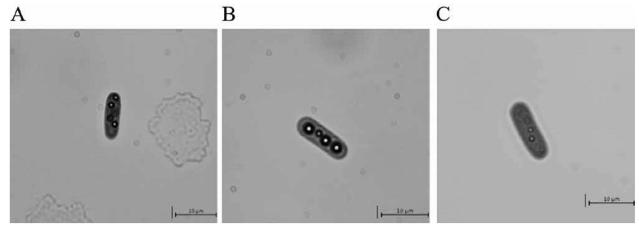


Figura 5: Foto di *C. okenii* dei tre campioni con ingrandimento 100x in fase esponenziale (giorno 18 dell'esperimento), abbiamo Standard (A), Daily (B) e Hourly (C). Si può notare come non vi è la presenza del flagello in tutti e tre i triplicati. La morfologia e l'assenza di flagello è stato osservato durante tutto il periodo dell'esperimento.

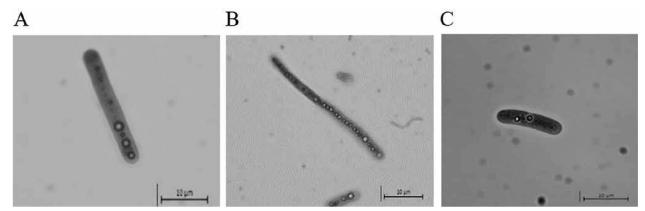


Figura 6: Foto di 3 batteri di *C. okenii* dei tre triplicati biologici in fase stazionaria giorno 48 dell'esperimento, con ingrandimento 100x. Abbiamo Standard (a), Daily (B) e Hourly (C). Si noti come solo il triplicato a cui è stato aggiunto il terreno non abbia la presenza di cellule sproporzionate.

Tabella 5: In questa tabella si possono confrontare le morfologie presenti in natura con quelle che avevano i batteri dei tre triplicati alla fine dell'esperimento. Come si può osservare i *C. okenii* presenti in laboratorio presentano un aspect ratio (misura che mette in proporzione la lunghezza con la larghezza) più alto di quelli in natura e questo si riflette sul volume; infatti, il volume dei batteri in laboratorio è minore di quelli in natura.

	Laboratorio	Natura
Presenza del flagello:	No	Si
Aspect Ratio:	3.01	1.50
Volume:	115.5 μ m³	207.6 μm³

In natura, la capacità di nuotare attivamente di C. okenii non sembra essere direttamente influenzata dalle differenti condizioni di luce, ma solo il fenomeno della bioconvezione ne sembra influenzato. La capacità di movimento invece cambia drasticamente quando i campioni del lago vengono incubati in laboratorio in condizioni ipoteticamente ottimali per la crescita. Dopo alcuni giorni, infatti, si osserva la perdita del flagello e un notevole cambiamento della morfologia cellulare (Fig. 3B), con il risultato che *C. okenii* diventa immobile. L'esperimento finale ha evidenziato che in laboratorio, nelle tre diverse condizioni di crescita si può giungere alla medesima conclusione: l'assenza dei flagelli. Confrontando i dati dell'ultimo esperimento con le osservazioni dello studio di Di Nezio et al. (2023), si osserva una marcata differenza tra la morfologia dei batteri in vitro e in vivo (Tab. 5). Ciò suggerisce che le differenze di concentrazioni di solfuro e i periodi di luce simili a quelli estivi non sono sufficienti per garantire a C. okenii una motilità sufficiente per creare la bioconvezione.

una motilità sufficiente per creare la bioconvezione. Nell'esperimento svolto interamente in laboratorio con differenti regimi di solfuro, il triplicato Standard ha mostrato una crescita simile agli altri due, in cui il solfuro era aggiunto a differenti intervalli di tempo. Questa osservazione ha portato all'ipotesi che *C. okenii* possa crescere senza necessariamente ricevere H₂S. Come detto in precedenza i PSB hanno la capacità di immagazzinare dei globuli di riserva composti da zolfo elementare (S⁰) (Maki 2013; Dahl 2020) che possono essere utilizzati in assenza di H₂S nell'ambiente e ossidati ulteriormente a SO₄², garantendo elettroni per

la crescita autototrofa. Inoltre, è stata osservata la presenza di H₂S dopo i periodi di buio, suggerendo un'attività di respirazione cellulare da parte di *C. okenii* con conseguente riduzione dello zolfo e liberazione di H₂S. È interessante notare che ogni aumento di concentrazione di solfuro corrisponde a un aumento del tasso di crescita della popolazione di *C. okenii* (Fig. 7) Tale crescita potrebbe portare all'ipotesi di una eventuale crescita eterotrofa e non fototrofa.

Questo fenomeno era già stato suggerito in passato da rilevamenti nella fascia batterica durante un periodo prolungato (Lüthy et al. 2000). In questo studio, gli autori affermano che, nei periodi bui e nelle zone prive di luce solare, i PSB iniziano a produrre H_2S partendo dal solfato in quantità tali che il rapporto tra $H_2S_{\text{Prodotto}}/H_2S_{\text{Consumato}}$ diventa maggiore di 1. Questo porta ad un accumulo di solfuro. Con la comparsa della luce e la fine del periodo di buio, la produzione di H_2S si arresta, portando ad un rapporto di $H_2S_{\text{Prodotto}}/H_2S_{\text{Consumato}}$ minore di 1. Di conseguenza, il solfuro viene consumato e si produce solfato (Fig. 7).

L'assenza nei triplicati Hourly di cellule batteriche con forma allungata (Fig. 6) è probabilmente dovuta all'aggiunta di terreno fresco anziché H₂S dalla soluzione madre. Oltre ai nutrienti essenziali, il terreno fresco fornisce anche vitamine e metalli necessari per la crescita e la replicazione cellulare. Di conseguenza, la mancanza di questi fattori cruciali per una corretta duplicazione cellulare ha portato alla comparsa di batteri sproporzionati. Questo evidenzia come il solo H₂S non sia sufficiente per un corretto sviluppo cellulare.

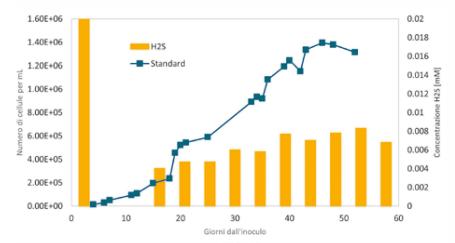




Figura 7: Come si può osservare in questa figura la crescita del solfuro nel triplicato Standard e la crescita del *C. okenii* sono simili, si può quindi pensare sia ad una produzione notturna di solfuro (illustrato nella vignetta a dx) che ad una crescita eterotrofa sommata a quella fototrofa diurna. Il rettangolo in rosso mostra uno dei momenti dove la concentrazione di solfuro e la crescita batterica sono in relazione diretta.

CONCLUSIONI

Sebbene non sia stato possibile ricreare un ambiente naturale in laboratorio, questo studio ha comunque fornito nuove informazioni sul ruolo della luce e del solfuro negli ambienti acquatici e sul legame tra bioconvezione e mobilità batterica. La diminuzione della percentuale di C. okenii mobili durante l'incubazione in laboratorio, nonostante la presenza di condizioni di luce e regimi di solfuro simili a quelle presenti nel lago di Cadagno durante il periodo estivo, suggerisce che altri fattori potrebbero influenzare la motilità cellulare. La perdita del flagello nelle cellule di C. okenii rappresenta un adattamento alle condizioni di laboratorio, dimostrando plasticità fenotipica di questo microorganismo in risposta alle variazioni ambientali. Questo apre interrogativi sulla regolazione genetica e molecolare della motilità batterica e sulla sua relazione con i cicli ambientali. Inoltre, l'osservazione che la fine della bioconvezione non è legata alla perdita del flagello nelle cellule batteriche suggerisce l'esistenza di meccanismi di regolazione più complessi di quanto ipotizzato in precedenza. Questo apre la strada a ulteriori studi sulla biologia e l'ecologia delle comunità batteriche in ambienti acquatici, e sottolineando l'importanza di combinare esperimenti in laboratorio con osservazioni nell'ambiente naturale d'interesse, e.g. Lago di Cadagno. In sintesi, questo studio evidenzia l'importanza di considerare non solo i fattori ambientali tradizionalmente associati alla bioconvezione, ma anche la complessità dei meccanismi biologici che regolano la motilità batterica e la sua risposta alle variazioni ambientali.

RINGRAZIAMENTI

La qualità delle attrezzature scientifiche utilizzate durante il monitoraggio è stata resa possibile dal finanziamento cantonale del mandato «Indagini, perizie e consulenza in Microbiologia ambientale» del Dipartimento di «socialità e sanità» (DSS). Si ringrazia la Fondazione centro di biologia alpina (CBA) per il sostegno logistico.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Barreto H.C., Cordeiro T.N., Henriques A.O. & Gordo I. 2020.
 Rampant Loss of Social Traits during Domestication of a Bacillus Subtilis Natural Isolate. Scientific Reports 2020 10:1
 10: 1-16.
- Canfield D.E., Farquhar J. & Zerkle A.L. 2010. High Isotope Fractionations during Sulfate Reduction in a Low-Sulfate Euxinic Ocean Analog. Geology, 38: 415-18.
- Dahl C. 2020. Bacterial Intracellular Sulphur Globules. In: Jendrossek, D. (eds) Bacterial Organelles and Organelle-like Inclusions. Microbiology Monographs, vol 34. Springer, Cham.
- Danza F., Ravasi D., Storelli N., Roman S., Lüdin S., Bueche M. & Tonolla M. 2018. Bacterial Diversity in the Water Column of Meromictic Lake Cadagno and Evidence for Seasonal Dynamics. PLOS ONE, 13: e0209743.

- Danza F., Storelli N., Roman S., Lüdin S. & Tonolla M. 2017.
 Dynamic Cellular Complexity of Anoxygenic Phototrophic
 Sulfur Bacteria in the Chemocline of Meromictic Lake Cadagno. PLOS ONE, 12: e0189510.
- Eichler B. & Pfennig N. 1988. A New Purple Sulfur Bacterium from Stratified Freshwater Lakes, *Amoebobacter purpureus* Sp. Nov. Archives of Microbiology, 149: 395-400.
- Eydallin G., Ryall B., Maharjan R. & Ferenci T. 2014. The Nature of Laboratory Domestication Changes in Freshly Isolated *Escherichia coli* Strains. Environmental Microbiology, 16: 813-28.
- Fernandez N.L., Hsueh B.Y., Nhu N.T.Q., Franklin J.L., Dufour Y.S. & Waters C.M. 2020. Vibrio cholerae Adapts to Sessile and Motile Lifestyles by Cyclic Di-GMP Regulation of Cell Shape. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117: 29046-54.
- Kuthan M., Devaux F., Janderová B., Slaninová I., Jacq C. & Palková Z. 2003. Domestication of Wild Saccharomyces cerevisiae Is Accompanied by Changes in Gene Expression and Colony Morphology. Molecular Microbiology, 47: 745-54.
- Luedin S.M., Liechti N., Cox R.P., Danza F., Frigaard N.-U., Posth N.R., ... & Tonolla M. 2019. Draft Genome Sequence of *Chromatium ohenii* Isolated from the Stratified Alpine Lake Cadagno. Scientific Reports, 9: 1936.
- Luedin S.M., Pothier J.F., Danza F., Storelli N., Frigaard N.-U., Wittwer M. & Tonolla M. 2018. Complete Genome Sequence of "Thiodictyon syntrophicum" Sp. Nov. Strain Cad16T, a Photolithoautotrophic Purple Sulfur Bacterium Isolated from the Alpine Meromictic Lake Cadagno. Standards in Genomic Sciences, 13: 14.
- Luedin S.M., Storelli N., Danza F., Roman S., Wittwer M., Pothier J.F. & Tonolla M. 2019. Mixotrophic Growth Under Micro-Oxic Conditions in the Purple Sulfur Bacterium "Thiodictyon syntrophicum". Frontiers in Microbiology, 10: 384.
- Lüthy L., Fritz M. & Bachofen R. 2000. In Situ Determination of Sulfide Turnover Rates in a Meromictic Alpine Lake. Applied and Environmental Microbiology, 66: 712-17.
- Maki J.S. 2013. Bacterial Intracellular Sulfur Globules: Structure and Function. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 23: 270-80.
- Di Nezio F., Beney C., Roman S., Danza F., Buetti-Dinh A., Tonolla M. & Storelli N. 2021. Anoxygenic Photo- and Chemosynthesis of Phototrophic Sulfur Bacteria from an Alpine Meromictic Lake. FEMS Microbiology Ecology 97.
- Di Nezio F., Ong I.L.H., Riedel R., Goshal A., Dhar J., Roman S., ... & Sengupta A. 2024. Phenotypic adaptations of motile purple sulphur bacteria Chromatium okenii during lake-tolaboratory domestication. PLOS ONE, in publication.
- Di Nezio F., Roman S., Buetti-Dinh A., Sepúlveda Steiner O., Bouffard D., Sengupta A. & Storelli N. 2023. Motile Bacteria Leverage Bioconvection for Eco-Physiological Benefits in a Natural Aquatic Environment. Frontiers in Microbiology, 14:1253009.
- Palkova Z. 2004. Multicellular Microorganisms: Laboratory versus Nature. EMBO Reports, 5: 470-76.
- 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. Systematic and Applied Microbiology 35.

- Peduzzi S., Tonolla M. & Hahn D. 2003. Vertical Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in the Chemocline of Lake Cadagno, Switzerland, over an Annual Cycle. Aquatic Microbial Ecology, 30: 295-302.
- Peduzzi S., Welsh A., Demarta A., Decristophoris P., Peduzzi R., Hahn D. & Tonolla M. 2011. Thiocystis chemoclinalis Sp. Nov. and Thiocystis cadagnonensis Sp. Nov., Motile Purple Sulfur Bacteria Isolated from the Chemocline of a Meromictic Lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 1682-87.
- Philippi M., Kitzinger K., Berg J.S., Tschitschko B., Kidane A.T., Littmann S., ... & Kuypers M.M.M. 2021. Purple Sulfur Bacteria Fix N_2 via Molybdenum-Nitrogenase in a Low Molybdenum Proterozoic Ocean Analogue. Nature Communications, 12: 1-12.
- Sepúlveda Steiner O., Bouffard D. & Wüest A. 2021. Persistence of Bioconvection-Induced Mixed Layers in a Stratified Lake. Limnology and Oceanography, 66: 1531-47.
- Sepúlveda Steiner O., Forrest A.L., McInerney J.B.T., Fernández Castro B., Lavanchy S., Wüest A. & Bouffard D. 2023. Spatial Variability of Turbulent Mixing From an Underwater Glider in a Large, Deep, Stratified Lake. Journal of Geophysical Research: Oceans 128: e2022JC018913.
- Sommer T., Danza F., Berg J., Sengupta A., Constantinescu G., Tokyay T., ... & Wüest A. 2017. Bacteria-Induced Mixing in Natural Waters. Geophysical Research Letters, 44: 9424-9432.
- Stewart E.J. 2012. Growing Unculturable Bacteria. Journal of Bacteriology, 194: 4151-60.
- Storelli N., Peduzzi S., Saad M.M., Frigaard N.-U., Perret X. & Tonolla M. 2013. CO₂ Assimilation in the Chemocline of Lake Cadagno Is Dominated by a Few Types of Phototrophic Purple Sulfur Bacteria. FEMS Microbiology Ecology, 84: 421-32.

- Storelli N., Sepulveda Steiner O., Di Nezio F., Roman S., Buetti-Dinh A. & Bouffard D. 2024. Ecological Dynamics of Anoxygenic Phototrophs in Stably Redox-Stratified Waters: Intra and Inter-Seasonal Variability of Lake Cadagno, Research Square https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3744815/v1 (ultima consultazione 31.8.2024).
- Tonolla M., Bottinelli M., Demarta A., Peduzzi R. & Hahn D. 2005. Molecular Identification of an Uncultured Bacterium ("morphotype R") in Meromictic Lake Cadagno, Switzerland. FEMS Microbiology Ecology, 53: 235-44.
- 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 and Environmental Microbiology, 66: 820-24.
- Tonolla M., Storelli N., Danza F., Ravasi D., Peduzzi S., Posth N.R., ... & Frigaard N. 2017. Ecology of Meromictic Lakes. Vol. 228.
- Vartoukian S.R., Palmer R.M. & Wade W.G. 2010. Strategies for Culture of "Unculturable" Bacteria. FEMS Microbiology Letters, 309: 1-7.
- Velicer G.J., Kroos L. & Lenski R.E. 1998. Loss of Social Behaviors by Myxococcus Xanthus during Evolution in an Unstructured Habitat. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 12376-80.
- Widdel F. & Bak F. 1992. Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In The Prokaryotes, 3352-78. Springer New York.
- Xiong Y., Guilbaud R., Peacock C.L., Cox R.P., Canfield D.E., Krom M.D. & Poulton S.W. 2019. Phosphorus Cycling in Lake Cadagno, Switzerland: A Low Sulfate Euxinic Ocean Analogue. Geochimica et Cosmochimica Acta, 251:116-35.