

# La diversità microbica del Lago Cadagno e degli endoliti della Val Piora (Cantone Ticino, Svizzera)

Autor(en): **Ravasi, Damiana F. / Peduzzi, Raffaele / Tonolla, Mauro**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Memorie / Società ticinese di scienze naturali, Museo cantonale di storia naturale**

Band (Jahr): **11 (2012)**

PDF erstellt am: **15.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981647>

## **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.

# La diversità microbica del Lago Cadagno e degli endoliti della Val Piora (Cantone Ticino, Svizzera)

Damiana F. Ravasi<sup>1</sup>, Raffaele Peduzzi<sup>1</sup> e Mauro Tonolla<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Fondazione Centro Biologia Alpina, Piora, c/o Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, CH-6500 Bellinzona (damiana.ravasi@ti.ch)

<sup>2</sup> Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, CH-6500 Bellinzona (raffaele.peduzzi@ti.ch)

<sup>3</sup> Groupe d'Écologie Microbienne, Unité de Microbiologie, Département de Botanique et Biologie Végétale, Université de Genève, 30, Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève (mauro.tonolla@ti.ch)

**Riassunto.** La conoscenza della diversità microbica nell'ambiente naturale è limitata, nonostante gli sforzi intrapresi nell'ultimo decennio in questa direzione. Il Lago Cadagno in Val Piora, grazie al fenomeno raro di "meromissi crenogenica", esibisce una grande ricchezza di popolazioni batteriche e si presta quindi molto bene per studi sulla diversità microbica, peraltro già intrapresi nel corso degli ultimi 30 anni. Nell'ambito del progetto "48 ore della biodiversità in Val Piora" abbiamo raggruppato tutti i dati raccolti finora sui batteri provenienti da cinque ambienti: lo strato acquoso superiore (mixolimnion) del lago, quello intermedio (chemocline) e quello inferiore (monimolimnion); i sedimenti del lago; la comunità di batteri endoliti che vivono in strati situati nelle rocce dolomitiche della Val Piora. Abbiamo analizzato la diversità batterica in questi ambienti usando un approccio basato sulle librerie del gene 16S rRNA comprendenti 475 cloni. In base a questi dati la diversità più alta è stata trovata nel chemocline (indice Shannon di 2.3), seguito dal monimolimnion (2.2). Le sequenze affiliate al phylum Proteobacteria sono le più frequentemente trovate nel chemocline, nel monimolimnion e nei sedimenti, seguito dai Bacteroidetes. Il mixolimnion ospita principalmente batteri del phylum Actinobacteria, mentre gli endoliti sono composti in maggioranza da cianobatteri. All'interno dei Proteobacteria, la classe dei Deltaproteobacteria (anaerobici) predomina nei sedimenti e nel monimolimnion. Il chemocline è invece dominato dalla classe dei Gammaproteobacteria, che comprendono la famiglia delle Chromatiaceae.

## Microbial diversity of Lake Cadagno and of the endoliths in the Piora Valley (Canton Ticino, Switzerland)

**Abstract.** Our knowledge of microbial diversity in the natural environment is limited, despite the efforts undertaken in this direction during the last decade. The Lake Cadagno in the Piora Valley (Switzerland), thanks to its rare phenomenon of "crenogenic meromixis", exhibits a great richness of bacterial populations and is therefore very suitable for studies on microbial diversity, studies already undertaken in the last 30 years. Within the framework of the project "48 hours of biodiversity in Piora Valley" we grouped all data collected until now on the bacteria from five habitat types: the upper water layer (mixolimnion) of the lake, the intermediate layer (chemocline) and the lower layer (monimolimnion); the lake sediments; the bacterial community living in the internal layers of the dolomite rocks of the Piora Valley, i.e., endoliths. We analyzed the bacterial diversity in these habitats using a 16S rRNA gene library approach comparing 475 clones. Based on this data the highest diversity was found in the chemocline (Shannon values of 2.3), followed by the monimolimnion (2.2). The sequences affiliated to the Proteobacteria phylum were the most frequently found in the chemocline, the monimolimnion, and the lake's sediments, followed by Bacteroidetes. The mixolimnion harbors bacteria mainly belong to the Actinobacteria phylum, while the endoliths are mainly composed by Cyanobacteria. In the Proteobacteria, the Deltaproteobacteria class (anaerobic bacteria) prevails in the sediments and in the monimolimnion. The chemocline is instead dominated by the Gammaproteobacteria class, which includes the Chromatiaceae family.

**Keywords:** microbial communities, bacterioplankton, meromictic lake, endoliths, 16S rRNA

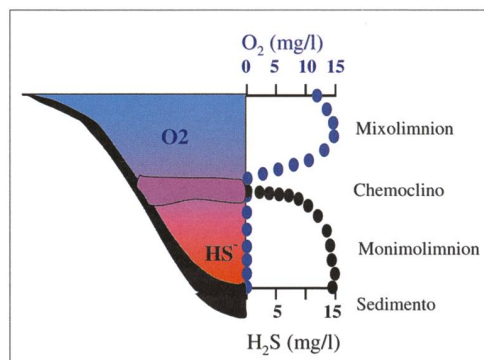
## INTRODUZIONE

Con il suo eccezionale patrimonio idrico la regione di Piora ha contribuito allo sviluppo della limnologia (lo studio delle acque dolci) in Europa, servendo come base per lavori di ricerca sulla limnobatteriologia (DÜGGELI 1919), la fauna acquatica (BORNER 1928) e la dinamica del plancton (BORNER 1920). Il Lago Cadagno in particolare costituisce un sistema

raro e complesso che ne ha fatto l'oggetto di maggior richiamo scientifico della regione. Esso presenta un fenomeno unico su tutto l'arco alpino, definito "meromissi crenogenica" (fig. 1): lo strato inferiore dell'acqua del lago (monimolimnion), privo di ossigeno, è ricco di sali disciolti provenienti da sorgenti solforose sottolacustri ed è separato da quello superiore (mixolimnion), normalmente ossigenato e povero di sali minerali. Tra le due

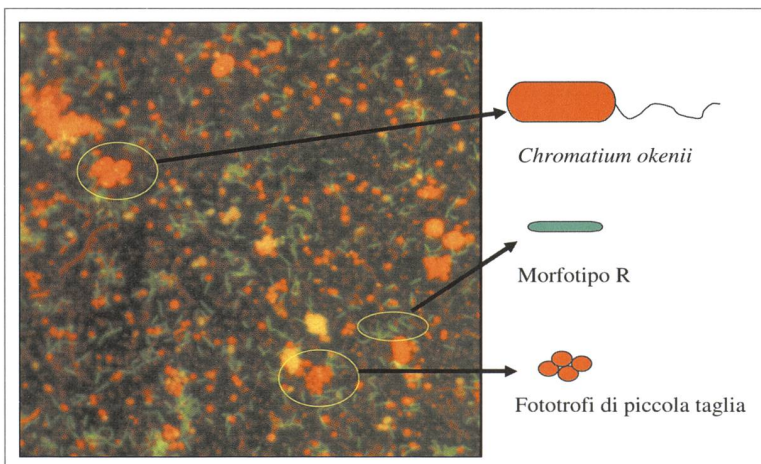
parti, che sono come due laghi sovrapposti, si creano le condizioni ideali per lo sviluppo massiccio di batteri fotosintetici anaerobici ad una profondità di circa 12 m, nello strato chiamato chemocline. Questi batteri contribuiscono significativamente alla produzione primaria del lago approfittando della luce penetrante attraverso lo strato superiore del lago, così come di molti composti chimici quali solfuro, magnesio, carbonato, solfato, ammonio, fosfato e ferro disciolto, che si diffondono verso l'alto dallo strato acquoso anossico (TONOLLA *et al.* 1988, PEDUZZI 1990, PEDUZZI 1993, TONOLLA *et al.* 1998, DEL DON *et al.* 2001). Inoltre essi costituiscono un filtro, impedendo all'idrogeno solforato tossico proveniente dallo strato acquoso inferiore, di risalire nello strato ossigenato superiore.

Fig. 1 – La meromissi nel Lago Cadagno.



Con la sua ricchezza di popolazioni batteriche il Lago Cadagno si presta molto bene per studi sulla biodiversità microbica, una componente degli ecosistemi naturali ancora largamente inesplorata (D'AURIA *et al.* 2010). L'elevata biodiversità microbica funge da modello ideale per la comprensione del ruolo dei microorganismi nei cicli biogeochimici globali, importanti nello studio dell'evoluzione della Terra (HALM *et al.* 2009, Dahl *et al.* 2010). La biodiversità microbica del Lago Cadagno è stata oggetto di numerosi studi nel corso degli ultimi tre decenni (v. Appendice). A causa delle difficoltà di messa in coltura dei microrganismi ambientali, lo studio delle popolazioni batteriche si è focalizzato, già a partire dal 1992, su delle osservazioni *in situ*

Fig. 2 – Alcuni dei maggiori morfotipi batterici trovati nel chemocline del Lago Cadagno (foto M. Tonolla).



con, da una parte, metodi di colorazione totale degli acidi nucleici (DAPI e arancio di acridina) e dall'altra l'applicazione di tecniche molecolari come la filogenia basata sulle sequenze degli RNA ribosomici (DEMARTA *et al.* 1998, TONOLLA *et al.* 1998). Questo approccio ha permesso di osservare le distribuzioni nella colonna d'acqua di diverse popolazioni batteriche in diversi periodi dell'anno. In più ha permesso di stabilire la distribuzione di morfotipi caratteristici e ben discernibili come *Chromatium okenii* e il morfotipo R (BENSADOUN *et al.* 1998, TONOLLA *et al.* 1998) (fig. 2). L'ibridazione cellulare *in situ* (applicazione di sonde oligonucleiche che si ibridano con gli RNA ribosomici 16S e 23S dei batteri) ha aperto la possibilità di una detezione che va dai grandi gruppi sistematici alle specie e sotto specie. Le analisi si sono focalizzate su diversi ambienti del lago, come lo strato acquoso superiore aerobico (GREGERSEN *et al.* 2009), lo strato acquoso inferiore anossico (TONOLLA *et al.* 2005b, GREGERSEN *et al.* 2009), il chemocline (TONOLLA *et al.* 1999, BOSSHARD *et al.* 2000a, TONOLLA *et al.* 2000, 2005a, 2005b, GREGERSEN *et al.* 2009, HALM *et al.* 2009) e i sedimenti (BOTTINELLI risultati non pubblicati, BOTTINELLI 2008, SCHUBERT *et al.* 2011). Sono anche state determinate di recente alcune nuove specie di batteri, che portano il nome del lago (*Thiocystis chemoclinalis* e *Thiocystis cadagnonensis*) (PEDUZZI *et al.* 2010). L'impiego di tecniche molecolari ha infine consentito l'analisi dei resti di batteri fossili estratti dal sedimento profondo del lago (fino a 9 m di profondità) per tracciare l'evoluzione temporale dei popolamenti microbici sull'arco di tutta la storia del lago (RAVASI *et al.* 2012).

Nonostante le analisi molecolari abbiano permesso la raccolta e il sequenziamento del gene 16S rRNA di oltre 500 ceppi batterici provenienti dal lago, solo una piccola parte di essi ha potuto essere classificata con precisione, ai livelli tassonomici di famiglia e genere (TONOLLA *et al.* 1999, 2005a, HALM *et al.* 2009). Per la maggior parte dei ceppi sequenziati si è riusciti ad identificare unicamente il gruppo di appartenenza al livello tassonomico di classe. Questo è dovuto all'assenza di banche dati batteriche ben fornite al momento in cui questi studi venivano completati. Avendo oggi a disposizione banche dati più aggiornate per la costruzione di alberi filogenetici, abbiamo considerato opportuno raggruppare i dati ricavati dagli studi citati e di usarli per la costruzione di un albero filogenetico che possa darci maggiori informazioni riguardo l'identità dei batteri isolati dal lago e non ancora classificati. Il nostro lavoro non si basa quindi sull'identificazione di specie nell'ambito del progetto "48 ore della biodiversità in Val Piora" ma sulla sintesi di dati già raccolti in studi precedenti, necessaria per completare il lavoro svolto finora. In effetti, considerando i costi e i lunghi tempi necessari all'analisi molecolare (raccolta campioni,

estrazione DNA dai batteri, sequenziamento dei geni, analisi delle sequenze) sarebbe stato impossibile ricavare una quantità consistente di dati in sole 48 ore. Gli obiettivi di questo progetto sono dunque di descrivere la diversità microbica presente nel Lago Cadagno e negli endoliti usando il gene 16S rRNA come marcatore molecolare; abbiamo raccolto i dati delle librerie di cloni esistenti in un'unica banca dati, per cinque componenti ambientali: mixolimnion, chemoclino, monimolimnion, sedimenti e endoliti.

## MATERIALI E METODI

### Area di studio e raccolta dei dati

Il Lago Cadagno è stato originato dall'erosione glaciale dell'ultimo periodo di glaciazione e ha un'età stimata tra gli 8'000 e i 10'000 anni (KRIGE 1918, BOUCHERLE & ZÜLLIG 1988, STAPFER 1991, DEL DON *et al.* 2001). Il piccolo lago alpino (lunghezza: 830 m, larghezza: 420 m, area di superficie: 0.26 km<sup>2</sup>, profondità massima: 21 m) è situato nella parte Sud delle Alpi svizzere a 1921 m s.l.m., nella Val Piora (latitudine: 46°33'N; longitudine: 08°43'E). Il Lago Cadagno presenta il fenomeno, ormai unico in tutto l'arco alpino, della meromissi crenogenica (fig. 1). Il mixolimnion ha un volume di ca. 2.5 x 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>, mentre il monimolimnion è più di dieci volte più piccolo, ca. 0.2 x 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>. Il chemoclino si sviluppa a una profondità di ca. 8-14 m ed è caratterizzato da gradienti marcati nella concentrazione di componenti chimici (HANSELMANN & HUTTER 1998, PEDUZZI *et al.* 1998, DEL DON *et al.* 2001).

I lavori su cui ci siamo basati per raccogliere le sequenze del gene 16S rRNA da analizzare sono elencati nella tabella 1. Le 475 sequenze utilizzate in questo studio sono state costruite a partire da ceppi batterici di diversi campioni ambientali del Lago Cadagno (tab. 1), quali l'acqua proveniente da varie profondità e i sedimenti raccolti dal fondo del lago. In un

unico caso (SIGLER *et al.* 2003) i batteri sequenziati non provengono dal Lago Cadagno, ma da campioni di due diversi strati di biomassa (dolomite con sfumature di verde e di rosso) estratti dalla roccia dolomitica in diverse ubicazioni casuali della Val Piora. Questi batteri vivono all'interno della roccia e sono chiamati endoliti (HORAT *et al.* 2006). Nella tabella 1 vengono indicate le origini dei campioni come pure i numeri di accesso con i quali le sequenze del gene 16S rRNA sono state depositate nelle banche dati EMBL/GenBank. Per i metodi dettagliati delle procedure di campionamento, estrazione di DNA, amplificazione del gene 16S rRNA, clonaggio e sequenziamento rimandiamo agli articoli di riferimento (tab. 1).

### Analisi filogenetiche

Le sequenze sono state analizzate con il pacchetto software ARB [versione 5.2-org-6779; O. Strunk and W. Ludwig, Technische Universität München (<http://www.arb-home.de>); LUDWIG *et al.* 2004]. Le sequenze sono state dapprima raggruppate in un file e poi importate in ARB e allineate con lo strumento SINA accessibile sul web [(SILVA INcremental Aligner), <http://www.arb-silva.de/aligner>]. Gli allineamenti sono stati controllati e corretti manualmente dove necessario. Gli alberi filogenetici sono stati creati aggiungendo le sequenze studiate alla database LTP\_s102 SSU contenente ~ 8000 sequenze del gene 16S rRNA (small subunit) e compilato da YARZA e collaboratori (2008). Il database può essere scaricato come file ARB da <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>. Una volta inserite le sequenze nel database LTP\_s102, gli alberi filogenetici sono stati creati usando l'analisi di parsimonia in ARB, che permette l'aggiunta di sequenze corte (<1,400 basi) a alberi filogenetici esistenti senza cambiare la topologia globale degli alberi (LUDWIG *et al.* 1998). Le sequenze sono state controllate per la presenza di chimere con i seguenti programmi: OrientationChecker [versione 1.0, ASHELFORD

Tab. 1 – Numeri di accesso, origine e referenza delle sequenze del gene 16S rRNA dei cloni che sono stati utilizzati in questo studio.

Numero di accesso cloni	Origine campione	Referenza
AJ006021, AJ006057-AJ006063, AJ223234, AJ223235	Acqua chemoclino	TONOLLA <i>et al.</i> 1999
AJ389622-AJ389629	Acqua chemoclino	TONOLLA <i>et al.</i> 2000
AF107316-AF107337, AF109140	Acqua chemoclino	BOSSHARD <i>et al.</i> 2000a
AJ543755-AJ534760	Sedimento anossico	BOTTINELLI, inedito
AY153448-AY153464	Strati di dolomite verde e dolomite rossa	SIGLER <i>et al.</i> 2003
AJ831742-AJ831747, AJ831751, AJ831752	Acqua chemoclino	TONOLLA <i>et al.</i> 2005a
AJ316020-AJ316024	Acqua monimolimnion	TONOLLA <i>et al.</i> 2005b
AJ831748-AJ831750, AJ831753	Acqua chemoclino	TONOLLA <i>et al.</i> 2005b
FR729043-FR729085, FR729596-FR729667, FR733724-FR733802	Sedimento fino a 48 cm di profondità	BOTTINELLI 2008
FJ502249-FJ502279	Acqua chemoclino	HALM <i>et al.</i> 2009
FJ546750-FJ546842,	Acqua mixolimnion (10 m di profondità)	GREGERSEN <i>et al.</i> 2009
FJ546983-FJ547019	Acqua chemoclino (11.5 m di profondità)	GREGERSEN <i>et al.</i> 2009
FJ547020-FJ547059	Acqua monimolimnion (15 m di profondità)	GREGERSEN <i>et al.</i> 2009
AM851080-AM851088	Sedimento	SCHUBERT <i>et al.</i> 2011

Tab. 2 – Indici di diversità applicati all'abbondanza di sequenze per unità tassonomiche operazionali (OTUs) al livello di ordine.

	Mixolimnion	Chemoclino	Monimolimnion	Sedimenti
Sequenze	77	90	25	90
Ricchezza (S)	11	17	12	12
Dominanza (D)	0.30	0.15	0.14	0.16
Shannon (H)	1.7	2.3	2.2	2.0
Equità (J)	0.72	0.80	0.89	0.82

et al. 2006, <http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/>, Clustal W [versione 1.83, THOMPSON et al. 1994, <http://www.bioinformatics-toolkit.org/Help/Topics/clustalw.html>] e Mallard [versione 1.02, ASHELFORD et al. 2006, <http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/>]. Due sequenze sono risultate essere delle chimere e sono quindi state eliminate dalle analisi.

Il software PAST [PAleontological STatistics versione 2.07; HAMMER et al. 2001; (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>)] è stato utilizzato per calcolare gli indici di diversità Dominanza, Shannon e Equità a livello tassonomico di ordine. L'indice di Dominanza è stato calcolato come  $D = \sum (n_i/n)^2$  dove  $n_i$  è il numero di individui del taxon  $i$  e  $n$  il numero totale di individui. L'indice di informazione Shannon è stato calcolato come  $H = -\sum n_i/n \ln(n_i/n)$  (SHANNON & WEAVER 1963) e l'indice di Equità è stato calcolato come  $J = H/H_{max}$  dove  $H$  è l'indice di informazione Shannon e  $H_{max} = \ln(S)$ , dove  $S$  è la ricchezza o il numero di taxa.

## RISULTATI

### Indici di diversità e rarefazione

La diversità microbica ospitata dalle quattro componenti ambientali del Lago Cadagno considerata risulta essere abbastanza alta. Secondo il livello tassonomico di 'ordine', 11, 17, 12 e 12 taxa sono stati identificati per, rispettivamente, gli ambienti mixolimnion, chemoclino, monimolimnion e sedimenti (tab. 2). In generale, i valori di dominanza sono abbastanza bassi per tutti gli ambienti, ciò che indica grande diversità. Secondo l'indice Shannon, il chemoclino

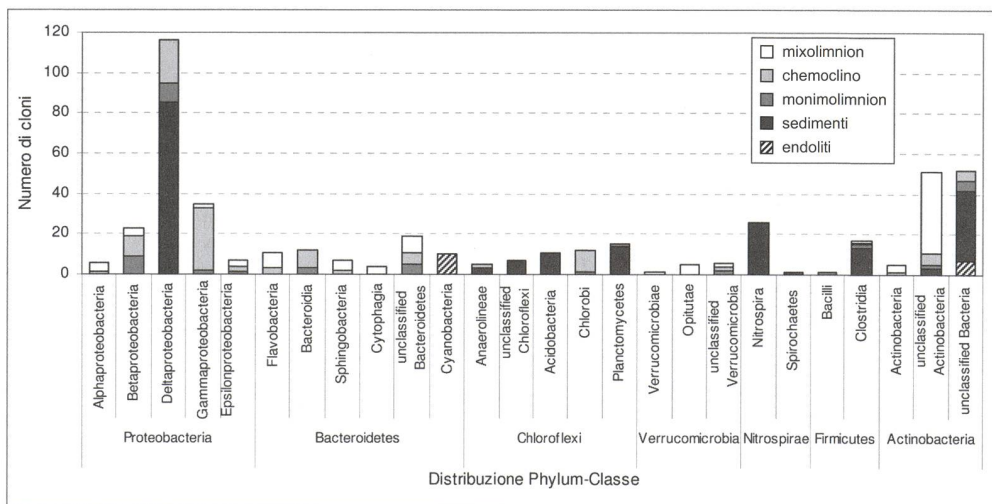
ospita la comunità microbica più diversa, seguito da monimolimnion, sedimenti e mixolimnion, ma la comunità è più equamente distribuita nel monimolimnion ( $J = 0.89$ ).

### Distribuzione della diversità

Il numero di sequenze raccolte e analizzate varia a seconda del tipo di ambiente campionato. Una grande parte delle sequenze (205 su un totale di 473 sequenze) appartiene a ceppi provenienti dai sedimenti del lago. Un'altra buona parte di sequenze proviene dallo strato acquoso del chemoclino e dallo strato acquoso superiore del mixolimnion (rispettivamente 114 e 92 sequenze). Il numero di ceppi campionati e sequenziati dallo strato acquoso inferiore del monimolimnion è più basso (45 cloni), così come nel caso degli endoliti (17 cloni). Di questo bisogna tenere conto quando si analizza la diversità dei ceppi. Nella distribuzione ai livelli tassonomici di phylum e classe (fig. 3) si può osservare che la maggior parte dei cloni appartiene al phylum Proteobacteria: 58, 50 e 43% dei campioni provenienti rispettivamente da chemoclino, monimolimnion e sedimenti. Diversamente, la maggior parte dei cloni provenienti dal mixolimnion (48%) appartiene al phylum Actinobacteria, anche se i Proteobacteria vi sono comunque presenti (15%).

Un altro phylum presente in modo importante nell'acqua del Lago Cadagno è quello dei Bacteroidetes, con 27, 18 e 18% delle sequenze di, rispettivamente, mixolimnion, chemoclino e monimolimnion. Gli endoliti invece appartengono prevalentemente (59%) al phylum Cyanobacteria; il resto di questi ceppi campionati dalle rocce dolomitiche della Val Piora non ha

Fig. 3 – Distribuzione dei cloni ai livelli tassonomici di phylum e classe. Le barre sono suddivise secondo l'origine dei campioni.

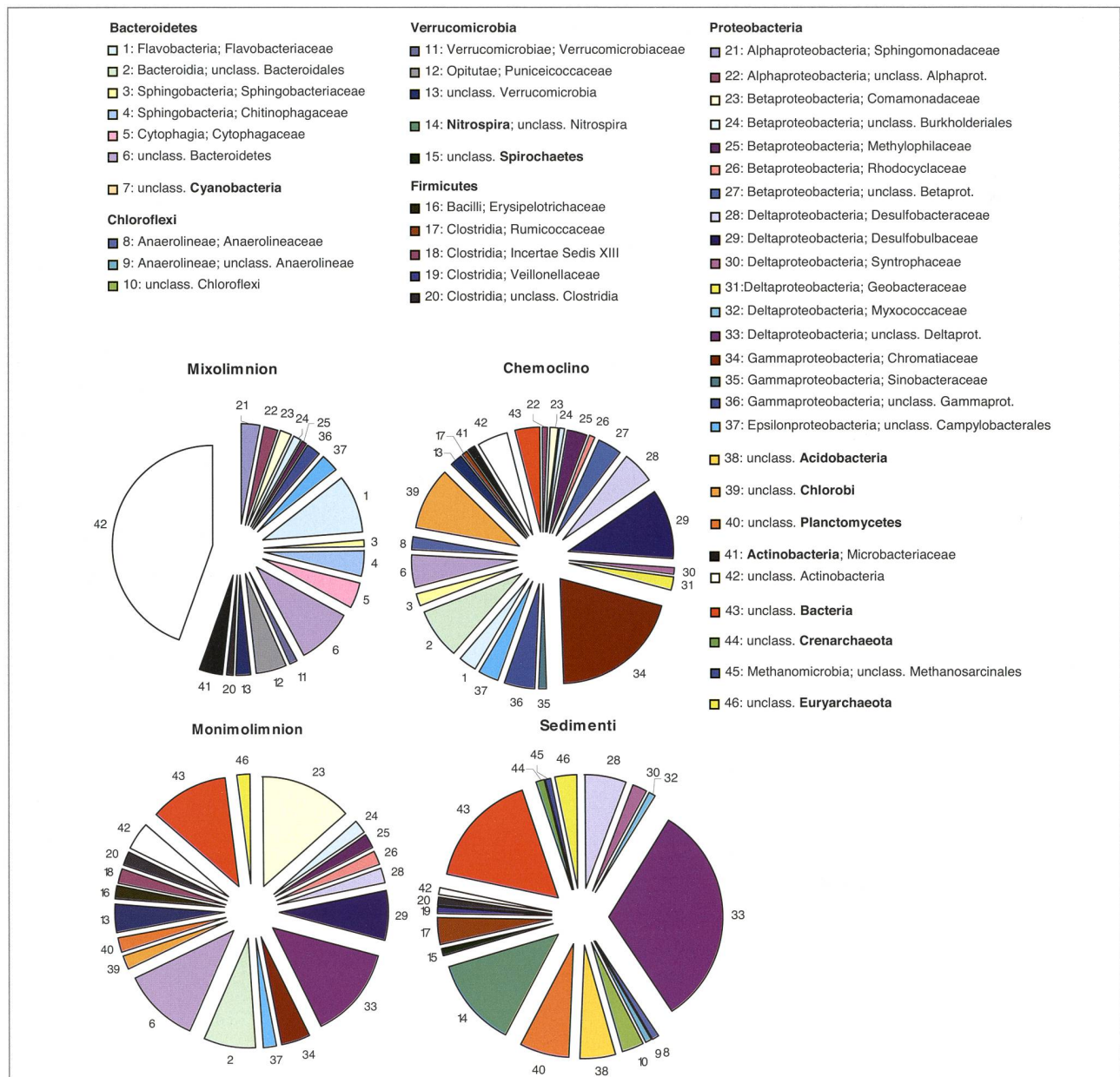


potuto essere classificato in modo preciso, così come 45 altre sequenze provenienti da altri tipi di ambienti. I phyla meno abbondanti mostrano una distribuzione irregolare: i phyla Acidobacteria, Nitrospirae e Spirochaetes appaiono unicamente nei sedimenti del lago; il phylum Chlorobi è stato riscontrato per la maggior parte nel chemoclino, ma anche in altri strati acquosi. I phyla Chloroflexi, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Firmicutes sono stati ritrovati in diversi ambienti campionati, a percentuali variabili. Otto cloni provenienti dai sedimenti e un clone proveniente dal monimolimnion appartengono al regno degli Archaea. La figura 4 mostra in dettaglio la distribuzione dei cloni a livello tassonomico di famiglia per gli ambienti mixolimnion, chemoclino, monimolimnion e sedimenti. Si può constatare che i batteri del phylum Actinobacteria occupano una posizione importante (47%) nella comunità microbica del mixolimnion. Nel chemoclino, un posto

importante è occupato da Chromatiaceae (Gammaproteobacteria) (21%), Chlorobi (10%) e Desulfobulbaceae (Deltaproteobacteria) (11%). La famiglia Desulfobacteraceae, vicina alle Desulfobulbaceae, è presente nei sedimenti del lago (6%), dove i Deltaproteobacteria sembrano avere un ruolo preponderante (41%). Nel monimolimnion, oltre ai phyla già descritti in precedenza, trova un forte riscontro la famiglia Comamonadaceae, dei Betaproteobacteria (13%).

Abbiamo scelto quattro gruppi specifici, ovvero Chlorobi, Chromatiaceae (Gammaproteobacteria), Desulfobacteraceae e Desulfobulbaceae (entrambe Deltaproteobacteria), per rappresentare in alberi filogenetici le posizioni dei cloni studiati che si inseriscono in tali gruppi (fig. 5, 6, 7 e 8). Questi gruppi sono di particolare interesse perché sono già stati documentati in dettaglio in studi precedenti (TONOLLA *et al.* 1999, 2000, 2005a, 2005b,

Fig. 4 – Distribuzione dei cloni ai livelli tassonomici di phylum-classe-famiglia per campioni da mixolimnion, chemoclino, monimolimnion e sedimenti.



BOSSHARD *et al.* 2000a, BOTTINELLI 2008, GREGERSEN *et al.* 2009, HALM *et al.* 2009, SCHUBERT *et al.* 2011), usando però altri tipi di analisi filogenetiche. I cloni appartenenti al phylum Chlorobi (fig. 5) provengono per la maggior parte dall'ambiente del chemocline e si avvicinano alle due specie *Chlorobium phaeobacteroides* e *C. clathratiforme*, la specie che domina numericamente nella popolazione attuale

di batteri sulfurei fototrofi del chemocline. Nella figura 5 è anche possibile farsi un'idea della posizioni e distanze genetiche reciproche di tutti i phyla studiati. Anche nella famiglia Chromatiaceae (fig. 6), i cloni hanno posizioni molto vicine a specie ben conosciute nel Lago Cadagno, in particolare nell'ambiente del chemocline: *Chromatium okenii*, *Lamprocystis purpurea*, *Thiocystis sp.* e *Thiodictyon*

Fig. 5 – Posizione filogenetica dei cloni appartenenti al phylum Chlorobi, a partire dalla libreria di cloni del gene 16S rRNA del Lago Cadagno. I cloni sono stati inseriti nell'albero tramite il criterio della massima parsimonia. Le sequenze studiate sono colorate secondo il tipo di ambiente campionato. La scala di distanza indica approssimativamente 10% di differenza nella sequenza.

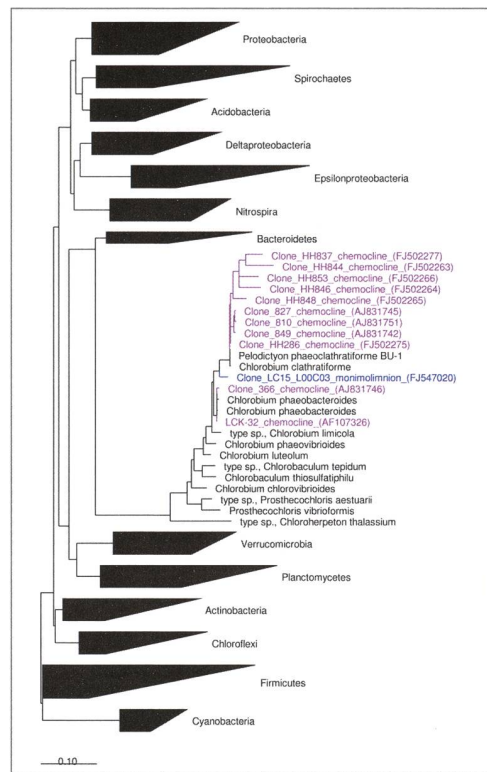


Fig. 6 – Posizione filogenetica dei cloni appartenenti alla famiglia Chromatiaceae (classe Gammaproteobacteria), a partire dalla libreria di cloni del gene 16S rRNA del Lago Cadagno. Per dettagli sulla calcolazione dell'albero e annotazione, vedi legenda alla fig. 5.

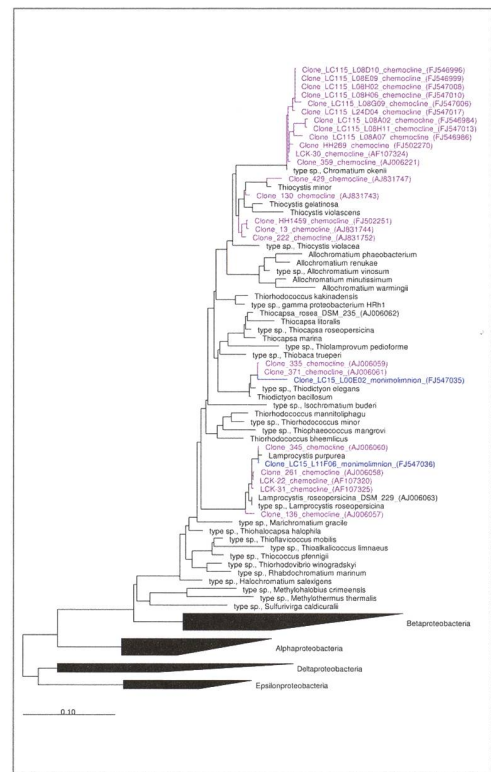


Fig. 7 – Posizione filogenetica dei cloni appartenenti alla famiglia Desulfobacteraceae (classe Deltaproteobacteria), a partire dalla libreria di cloni del gene 16S rRNA del Lago Cadagno. Per dettagli sulla calcolazione dell'albero e annotazione, vedi legenda alla fig. 5.

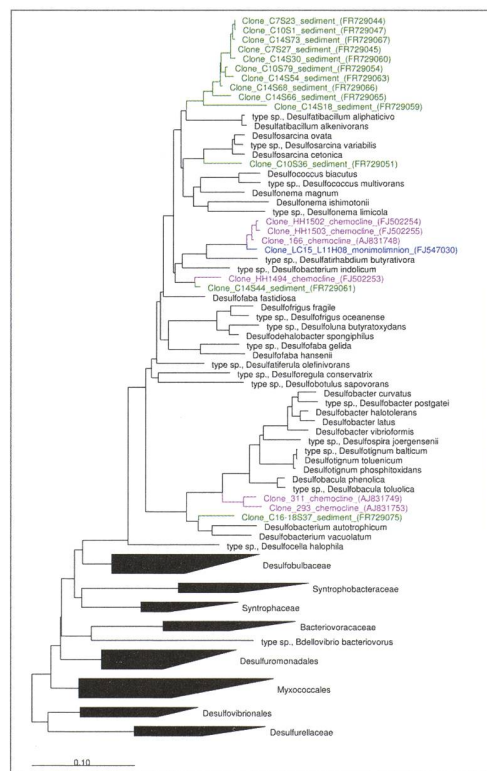
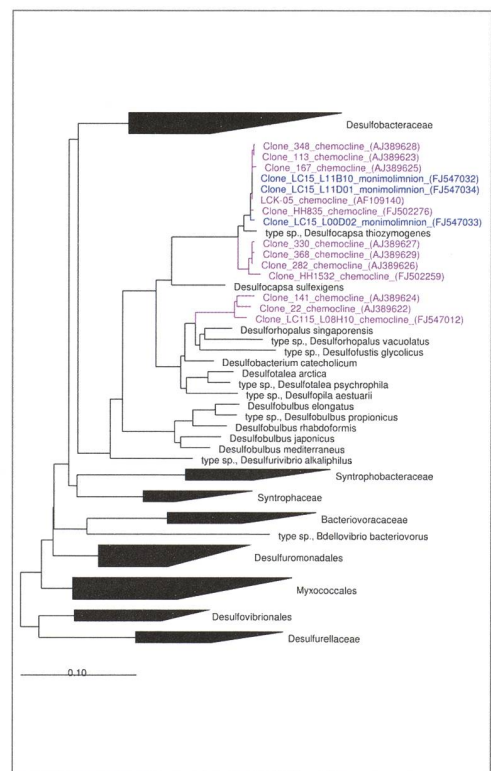


Fig. 8 – Posizione filogenetica dei cloni appartenenti alla famiglia Desulfobulbaceae (classe Deltaproteobacteria), a partire dalla libreria di cloni del gene 16S rRNA del Lago Cadagno. Per dettagli sulla calcolazione dell'albero e annotazione, vedi legenda alla fig. 5.



sp. Si può notare che le due specie recentemente determinate e omologate ufficialmente da PEDUZZI e collaboratori (2010) (*Thiocystis chemoclinalis* e *Thiocystis cadagnonensis*) non fanno ancora parte della banca dati LTP\_s102 SSU. La famiglia Desulfobacteraceae (fig. 7) include in prevalenza cloni provenienti dai sedimenti del lago, ma anche dal chemocline. Se osserviamo le barre indicanti le distanze filogenetiche, qui i cloni si avvicinano meno a delle specie in particolare. Al contrario, nella famiglia Desulfobulbaceae (fig. 8), molti cloni sono vicini alla specie *Desulfocapsa thiozymogenes*, mentre per tre cloni la determinazione non va oltre il livello tassonomico di famiglia.

## DISCUSSIONE

Le 474 sequenze di gene 16S rRNA analizzate in questo studio e provenienti da cinque componenti ambientali del Lago Cadagno e della Val Piora sono risultate appartenere a 14 phyla diversi di Eubacteria e Archaeota. Per la maggior parte delle sequenze, una determinazione a livello tassonomico di famiglia rappresenta un buon risultato; sono pochi i cloni per cui la specie esatta può essere determinata (vedi fig. 5, 6, 7 e 8). Nel caso dello studio della comunità batterica del Lago Cadagno risulta dunque molto difficile stilare un elenco esaustivo delle specie riscontrate nell'area di studio. Un tentativo di elenco è comunque stato stilato ed è visibile nell'Appendice I.

L'utilizzo del software ARB per l'analisi genetica delle sequenze presenta il vantaggio della rapidità delle analisi, avendo a disposizione una banca dati di sequenze del gene 16S rRNA già perfezionata e costantemente aggiornata. Abbiamo voluto controllare la qualità dell'analisi paragonando le nostre determinazioni tassonomiche a quelle già create dagli studi precedenti (TONOLLA *et al.* 1999, BOSSHARD *et al.* 2000a, TONOLLA *et al.* 2000, TONOLLA *et al.* 2005a, 2005b, BOTTINELLI 2008, GREGERSEN *et al.* 2009, HALM *et al.* 2009, SCHUBERT *et al.* 2011). In generale le classificazioni trovate con ARB corrispondono a quelle degli altri studi. Solo in un caso abbiamo trovato una certa discrepanza tra la nostra classificazione e quella dello studio da cui abbiamo tratto le sequenze. Nel caso specifico diversi cloni sono stati determinati ad un livello tassonomico più preciso con ARB, ad esempio fino al livello di famiglia, rispetto ad un sottogruppo non definito nel lavoro di origine (BOTTINELLI 2008). In alcuni casi però l'analisi di BOTTINELLI (2008) ha portato ad una determinazione dei cloni fino al livello di genere, mentre noi abbiamo potuto determinare solo la classe di appartenenza degli stessi cloni. In altri casi ancora abbiamo riscontrato una divergenza nella determinazione del phylum di appartenenza tra i due tipi di analisi. Queste discrepanze meritano probabilmente un'ulteriore analisi più dettagliata. In sommario, a

parte alcuni casi da rielaborare, vi è una buona corrispondenza tra la determinazione raggiunta con il software ARB e con i metodi impiegati dagli autori degli studi fatti in precedenza. La determinazione non risulta essere più precisa a livello di gruppi con tassonomici con ARB, ma è senz'altro più rapida.

Le librerie di cloni batterici costruite a partire dai campioni provenienti dalle quattro componenti ambientali del Lago Cadagno considerate sono risultate diverse tra loro (fig. 4), indicando un'eterogeneità spaziale della comunità microbica nel lago. L'habitat ospitante una diversità maggiore a livello di phyla è quello dei sedimenti del lago, con nove phyla, tra cui il predominante è il phylum Proteobacteria, che rappresenta il 47% della comunità eubatterica e archeobatterica, seguito dal phylum Nitrospirae (13%). Il phylum Nitrospirae, i cui batteri sono coinvolti nel ciclo dell'azoto, è presente unicamente nei sedimenti del lago, così come i phyla Acidobacteria e Spichaetes. Il phylum dei Proteobacteria riveste un ruolo di maggioranza della comunità batterica anche negli habitat del monimolimnion e del chemocline, dove le sue percentuali raggiungono, rispettivamente, 47 e 60%. All'interno di questo phylum vi sono però delle differenze a livello di classe, in quanto la classe dei Deltaproteobacteria predomina nei sedimenti (dove è l'unica classe rappresentante dei Proteobacteria) e nel monimolimnion, dove è affiancata dalla classe Betaproteobacteria. I batteri dei sedimenti e del monimolimnion sono in preponderanza anaerobici (acetogeni, metanogeni, solfato-riduttori) e ricoprono un ruolo importante nei cicli dell'azoto, dello zolfo e nell'assimilazione di carbonio inorganico (SHIVELY & BARTON 1991). Il chemocline è invece dominato dalla classe dei Gammaproteobacteria, che comprendono l'importante famiglia delle Chromatiaceae. Infatti i batteri della famiglia delle Chromatiaceae, insieme ai Chlorobi, anche presenti nel chemocline, sono dei batteri fototrofi e possiedono un'adattamento cromatica che permette loro di usare le particolari condizioni di luminosità presenti nel chemocline. Le condizioni di luminosità sono in generale cruciali per la distribuzione verticale delle popolazioni batteriche nella colonna acquosa del chemocline (TONOLLA 1987). Nel chemocline sono anche presenti batteri non fototrofi, come batteri solfato-riduttori della classe Deltaproteobacteria. Questo ha suggerito la possibile esistenza di un significativo ciclo dello zolfo nel chemocline, abbinato ad un rapido turnover di solfuro (FRITZ & BACHOFEN 2000, TONOLLA & PEDUZZI 2006). Tutti gli endoliti determinati appartengono al phylum dei Cyanobacteria (o alghe verdi-blu), batteri in grado di compiere la fotosintesi.

In conclusione, risulta chiaro che il Lago Cadagno rappresenta un *hotspot* di biodiversità microbica, dove la reale diversità batterica è probabilmente sottostimata e ancora da compilare in modo esauriente. L'alto livello



di diversità batterica e l'unicità di questo particolare ecosistema ne fa un'inestimabile risorsa di conoscenza del ruolo ecologico dei microorganismi nell'ambiente e un modello ideale per la comprensione del ruolo di questi microbi nei cicli biogeochimici globali, importanti nello studio dell'evoluzione della Terra. Il Lago Cadagno costituisce anche un serbatoio genetico naturale di sostanze e meccanismi molecolari ancora inesplorati che potrebbero rivelarsi utili nel futuro. È dunque importante conservare il lago come serbatoio di ricchezza di biodiversità microbica, visto che molti batteri non sono coltivabili in laboratorio, o funzionano in modo diverso quando si trovano in coltura. Sono inoltre necessari studi ulteriori per fare luce sulla relazione tra la struttura delle comunità microbiche e il loro funzionamento.

### RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo sentitamente Stefan Neuenchwander e il Prof. Dr. Jakob Pernthaler (Department of Limnology, Institute of Plant Biology, University of Zürich) per il fondamentale supporto all'installazione e all'utilizzo del software ARB, la Fondazione Centro Biologia Alpina di Piora per il sostegno finanziario e l'Istituto Cantonale di Microbiologia di Bellinzona per il supporto logistico delle analisi.

### BIBLIOGRAFIA

- ASHELFORD K. E., CHUZHANOVA N. A., FRY J. C., JONES A. J. & WEIGHTMAN A. J., 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5734-5741.
- BENSADOUN J.-C., TONOLLA M., DEMARTA A., BARJA F. & PEDUZZI R., 1998. Vertical distribution and microscopic characterization of a non-cultivable microorganism (morphotype R) of Lake Cadagno. In: PEDUZZI R., BACHOFEN R. & TONOLLA M. (eds), *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, 63: 11-17.
- BORNER L., 1920. Die Crustaceenfauna des Ritómsees und seines Deltas. *Festschrift für Zschokke*, 20: 1-16.
- BORNER L., 1928. Die Bodenfauna des Lago Ritóm und seines Deltagebietes vor der Absenkung (1916). *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 4: 121-161.
- BOSSHARD P.P., SANTINI Y., GRÜTER D., STETTLER R. & BACHOFEN R., 2000a. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of in the meromictic Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 173-182.
- BOTTINELLI M., 2008. Approche moléculaire à l'étude des bactéries sulfato-réductrices et des Archaea méthanogènes dans les sédiments des lacs Cadagno et Rotsee. Thèse Docteur ès sciences Université de Genève, *Terre et Environnement* 71, 138 pp.
- BOUCHERLE M. M. & ZÜLLIG H., 1988. Lago Cadagno: An environmental history. In: LANG & SCHLÜCHTER (eds), *Lake, Mire, and River Environments*. Balke-ma, Rotterdam, pp. 3-7.
- DAHL T. W., ANBAR A. D., GORDON G. W., ROSING M. T., FREI R. & CANFIELD D. E., 2010. The behavior of molybdenum and its isotopes across the chemocline and in the sediments of sulfidic Lake Cadagno, Switzerland. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74 (1): 144-163.
- D'AURIA G., BARÓN-RODRÍGUEZ M. M., DURBÁN-VICENTE A., MOYA A., ROJO C., LATORRE A. & RODRIGO M. A., 2010. Unravelling the bacterial diversity found in the semi-arid Tablas de Daimiel National Park wetland (central Spain). *Aquatic Microbial Ecology*, 59: 33-44.
- DEL DON C., HANSELMANN K. W., PEDUZZI R. & BACHOFEN R., 2001. The meromictic alpine Lake Cadagno: Orographical and biogeochemical description. *Aquatic Science*, 63: 70-90.
- DEMARTA A., TONOLLA M., CAMINADA A.-P., RUGGERI N. & PEDUZZI R., 1998. Phylogenetic diversity of the bacterial community from the anoxic layer of the meromictic Lake Cadagno. In: PEDUZZI R., BACHOFEN R. & TONOLLA M. (eds), *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, 63: 19-30.
- DÜGGELI M., 1919. Die Schwefelbakterien. *Neujahrsblatt 121 der Naturforschenden Gesellschaft Zürich*, Beer & Cie, Zurich, 121 pp.
- FRITZ M. & BACHOFEN R., 2000. Volatile organic sulfur compounds in a meromictic alpine lake. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 28: 185-192.
- GREGERSEN L. H., HABICHT K. S., PEDUZZI S., TONOLLA M., CANFIELD D. E., MILLER M., COX R. P. & FRIGAARD N.-U., 2009. Dominance of a clonal green sulfur bacterial population in a stratified lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 30-41.
- HALM H., MUSAT N., LAM P., LANGLOIS R., MUSAT F., PEDUZZI S., LAVIK G., SCHUBERT C. J., SINGHA B., LAROCHE J. & KUYPERS M. M. M., 2009. Co-occurrence of denitrification and nitrogen fixation in a meromictic lake, Lake Cadagno (Switzerland). *Environmental Microbiology*, 11 (8): 1945-1958.
- HAMMER Ø., HARPER D. A. T. & RYAN P. D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1): 9pp.
- HANSELMANN K. & HUTTER R., 1998. Geomicrobiological coupling of sulfur and iron cycling in anoxic sediments of a meromictic lake: sulfate reduction and sulfide sources and sinks in Lake Cadagno. In: PEDUZZI R., BACHOFEN R. & TONOLLA M. (eds), *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, 63: 85-98.
- HORAT T., NEU T. R. & BACHOFEN R., 2006. An endolithic microbial community in dolomite rock in central Switzerland: characterization by reflection spectroscopy, pigment analyses, scanning electron microscopy, and laser scanning microscopy. *Microbial Ecology*, 51: 353-364.
- KRIGE L. J., 1918. Petrographische Untersuchungen im Val Piora und Umgebung. *Ecologiae geologicae Helveticae*, 14: 549-654.
- LUDWIG W., STRUNK O., KLUGBAUER S., KLUGBAUER N., WEIZENEGGER M., NEUMAIER J., BACHLEITNER M. & SCHLEIFER K. H., 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, 19: 554-568.
- LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A., LAI T., STEPPI S., JOBB G., FORSTER W., BRETTSCHE I., GERBER S., GINHART A. W., GROSS O., GRUMANN S., HERMANN S., JOST R., KONIG A., LISS T., LUSSMANN R., MAY M., NONHOFF B., REICHEL B., STREHLOW R., STAMATAKIS A., STUCKMANN N., VILBIG A., LENKE M., LUDWIG T., BODE A. & SCHLEIFER K. H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32: 1363-1371.
- PEDUZZI S., WELSH A., DEMARTA A., DECRISTOPHORIS P., PEDUZZI R., HAHN D. & TONOLLA M., (2011). *Thiocystis chemoclinalis* sp. nov. and *Thiocystis cadagnonen-sis* sp. nov., two new motile purple sulfur bacteria

- isolated from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, doi:10.1099/ijs.0.010397-0.
- PEDUZZI R., 1990. Étude d'un filtre bactérien retenant les composés toxiques et trophogènes dans un lac alpin (Lac de Cadagno, Massif du St. Gothard). *Cahiers de la Faculté des Sciences, Université de Genève*, 20: 121-133.
- PEDUZZI R., 1993. Il Lago Cadagno: un modello di meromissi crenogenica. *Memorie della Società Ticinese di Scienze Naturali*, 4: 87-94.
- PEDUZZI R., BACHOFEN R. & TONOLLA M., 1998. Lake Cadagno: a meromictic alpine lake. *Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 63, 152 pp.
- RAVASI D. F., PEDUZZI S., GUIDI V., PEDUZZI R., WIRTH S., GILLI A. & TONOLLA M., 2012. Development of a real-time PCR method for the detection of fossil 16S rDNA fragments of phototrophic sulfur bacteria in the sediments of Lake Cadagno. *Geobiology*, 10: 196-204.
- SCHUBERT C. J., VAZQUEZ F., LÖSEKANN-BEHRENS T., KNITTEL K., TONOLLA M. & BOETIUS A., 2011. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago Cadagno). *FEMS Microbiology Ecology*, 76: 26-38.
- SHANNON C. E. & WEAVER W., 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- SHIVELY J. M. & BARTON L. L., 1991. *Variations in autotrophic life*. London, Academic Press.
- SIGLER V. W., BACHOFEN R. & ZEYER J., 2003. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environmental Microbiology*, 5: 618-627.
- STÄPFER A., 1991. *Pollenanalytische Untersuchungen im Val Piora (Tessin). Ein Beitrag zur Klima und Vegetationsgeschichte der Nacheiszeit*. *Geographica Helvetica*, 46: 156-164.
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. & GIBSON T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- TONOLLA M., 1987. Über das photochemotaktische Verhalten von Purpurschwefel-bakterien in ihrer natürlichen Umgebung. *Diplomarbeit Universität Zürich, Abteilung Mikrobiologie*, 93 pp.
- TONOLLA M., DEL DON C., BOSCOLO P. & PEDUZZI R., 1988. The problem of fish management in an artificially regulated meromictic lake: lake Cadagno (Canton Tessin, Switzerland). *Rivista Italiana Acquacoltura*, 23: 57-68.
- TONOLLA M., DEMARTA A., HAHN D. & PEDUZZI R., 1998. Microscopic; molecular in situ characterization of bacterial populations in the meromictic Lake Cadagno. In: PEDUZZI R., BACHOFEN R. & TONOLLA M. (eds), *Lake Cadagno: a meromictic alpine lake*. *Documenta dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 63: 31-44.
- 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., 2005a. Long-Term Population Dynamics of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of Lake Cadagno, Switzerland. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 3544-3550.
- TONOLLA M., BOTTINELLI M., DEMARTA A., PEDUZZI R. & HAHN D., 2005b. Molecular identification of an uncultured bacterium ("morphotype R") in meromictic Lake Cadagno, Switzerland. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 235-244.
- TONOLLA M. & PEDUZZI R., 2006. Lake Cadagno, a model for microbial ecology. In: TONOLLA M. & PEDUZZI R. (eds), *Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin*. Edizioni Centro Biologia Alpina, Piora, pp. 21-52.
- YARZA P., RICHTER M., PEPLIES J., EUZEBY J., AMANN R., SCHLEIFER K. H., LUDWIG W., GLÖCKNER F. O. & ROSSELLO-MORA R., 2008. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 241-250.

## APPENDICE

Ricerche sul Lago Cadagno pubblicate nel periodo 1998-2011 su riviste scientifiche internazionali peer reviewed (curata da **Sandro Peduzzi**).

- BACHOFEN R. & SCHENK A. (1998). Quorum sensing autoinducers: do they play a role in natural microbial habitats? *Microbiol. Res.* 153: 61-3.
- BEHRENS A., SCHAEFFER P., BERNASCONI S. & ALBRECHT P. (2000) 7,11-cyclotryococca-5,12,26-triene, a novel botryococcene-related hydrocarbon occurring in natural environments. *Org. Lett.* 2: 1271-4.
- BELIN G. K. (2008) Investigation of Hopanoid Biomarkers in Lake Sediments by GC-MS and RP-HPLC-APCI-MS. *E-Journal of Chemistry*. 6: 77-88.
- BOSSARD P., GAMMETER S., LEHMAN C., SCHANZ F., BACHOFEN R., GÜRGI H.-R., STEINER D. & ZIMMERMANN U. (2001). Limnological description of the lakes Zürich, Lucerne, and Cadagno. *Aquat. Sci.* 63: 225-49.
- BOSSHARD P. P., SANTINI Y., GRÜTER D., STETTLER R. & BACHOFEN R. (2000) Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:173-82.
- BOSSHARD P. P., STETTLER R. & BACHOFEN R. (2000) Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic Lake Cadagno. *Arch. Microbiol.* 174:168-74.
- CAMACHO A., EREZ J., CHICOTE A., FLORIN M., SQUIRES M. M., LEHMANN C. & BACHOFEN R. (2001). Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquat. Sci.* 63: 91-106.
- CANFIELD D. E., FARQUHAR J., AUBREY L. & ZERKLE A. L. (2010) High isotope fractionations during sulfate reduction in a low-sulfate euxinic ocean analog. *Geology*. 38: 415-18.
- DAHL T. W., ANBAR A. D., GORDON G. W., RONSIG M. T., FREI R. & CANFIELD D. E. (2010). The behavior of molybdenum and its isotopes across the chemocline and in the sediments of sulfidic Lake Cadagno. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74 (1): 144-63.
- 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. *J. Limnol.* 68: 16-24.
- DEL DON C., HANSELMANN K. W., PEDUZZI R. & BACHOFEN R. (2001). The meromictic alpine Lake Cadagno: Orographical and biogeochemical description. *Aquat. Sci.* 63: 70-90.
- EGLI K., WIGGLI M., FRITZ M., KLUG J., GERSS J. & BACHOFEN R. (2004). Spatial and temporal dynamics of a

- plume of phototrophic microorganisms in a meromictic alpine lake using turbidity as a measure of cell density. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 35: 105-13.
- FRITZ M. & BACHOFEN R. (2000). Volatile organic sulfur compounds in a meromictic alpine lake. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 28: 185-192.
- GATTUSO J. P., PEDUZZI S., PIZAY M. D. & TONOLLA M. (2002). Changes in freshwater bacterial community composition during measurements of microbial and community respiration. *J. Plank. Res.* 24: 1197-206.
- GREGERSEN L. H., HABICHT K. S., PEDUZZI S., TONOLLA M., CANFIELD D. E., MILLER M., COX R. P. & FRIGAARD N. U. (2009) Dominance of a clonal green sulfur bacterial population in a stratified lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 30-41.
- HABICHT K. S., MILLER M., COX R. P., FRIGAARD N. U., TONOLLA M., PEDUZZI S., FALKENBY L.G. & ANDERSEN J. S. (2011) Comparative proteomics and activity of a green sulfur bacterium through the water column of Lake Cadagno, Switzerland. *Environ. Microbiol.* 13: 203-15.
- HALM H., MUSAT N., LAM P., LANGLOIS R., MUSAT F., PEDUZZI S., LAVIK G., SCHUBERT C. J., SINHA B., LAROCHE J. & KUYPERS M. M. (2009) Co-occurrence of denitrification and nitrogen fixation in a meromictic lake, Lake Cadagno (Switzerland). *Environ. Microbiol.* 11: 1945-58.
- HABTING Y., SCHAEFFER P., BEHRENS A., ADAM P., SCHMITT G., SCHNECKENBURGER P., BERNASCONI S. M. & ALBRECHT P. (2006) Biomarker evidence for a major preservation pathway of sedimentary organic carbon. *Science.* 312: 1627-31.
- HONEYCUTT C., CANFIELD D. & BJERRUM C. (2008) One dimensional physico-chemical ecological modeling of sulfidic oceans: applications to Proterozoic ocean chemistry and euxinic photoic zones. *Geophysical Research Abstracts.* Vol. 10, EGU: 2008-A-08712, 2008 EGU General Assembly 2008.
- LEHMANN C. & BACHOFEN R. (1999) Images of concentrations of dissolved sulphide in the sediment of a lake and implications for internal sulphur cycling. *Sedimentol.* 46: 537-45.
- LÜTHY L., FRITZ M. & BACHOFEN R. (2000) In situ determination of sulfide turnover rates in a meromictic alpine lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 712-7.
- MUSAT N., HALM H., WINTERHOLLER B., HOPPE P., PEDUZZI S., HILLION F., HORREARD F., AMANN R., JØRGENSEN B. B. & KUYPERS M. M. (2008) A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105:17861-6.
- NIEMANN H., WIRTH S. B., STADNITSKAIA A., GILLI A., ANSELMETTI F. S., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., SCHOUTEN S., HOPPMANS E. C. & LEHMANN M. F. (2011) Validation and application of a novel, terrestrial biomarker-based paleo thermometer to Holocene sediments of Lake Cadagno, Switzerland *Geophysical Research Abstracts.* Vol. 13, EGU: 2011-1463, 2011 EGU General Assembly 2011.
- NIEMANN H., WIRTH S. B., STADNITSKAIA A., GILLI A., ANSELMETTI F. S., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., SCHOUTEN S., HOPPMANS E. C. & LEHMANN M. F. (2012) Bacterial GDGTs in Holocene sediments and catchment soils of a high-alpine lake: application of the MBT/CBT-paleothermometer *Clim. Past* 8: 889-906.
- OTZ M. H., OTZ H. K. & SIEGEL D. I. (2003). Surface water/groundwater interaction in the Piora Aquifer, Switzerland: evidence from dye tracing tests. *Hydrogeol. J.* 11: 228-39.
- PEDUZZI R., BACHOFEN R., & TONOLLA, M. (eds.) (1998). Lake of Cadagno: a meromictic alpine lake. *Documenta dell' Istituto Italiano di Idrobiologia.* 63. p. 152.
- PEDUZZI S., TONOLLA M. AND HAHN D. (2003) Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 29-37.
- PEDUZZI S., STORELLI N., WELSH A., PEDUZZI R., HAHN D., PERRET X. & TONOLLA M. (in the press) 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. *Appl. Syst. Microbiol.*
- PEDUZZI S., TONOLLA M. & HAHN D. (2003). Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria in the chemocline of Lake Cadagno, Switzerland, over an annual cycle. *Aquat. Microb. Ecol.* 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1682-7.
- RAVASI D. F., PEDUZZI S., GUIDI V., PEDUZZI R., WIRTH S. B., GILLI A. & TONOLLA M. (in the press). Development of a real-time PCR method for the detection of fossil 16S rDNA fragments of phototrophic sulfur bacteria in the sediments of Lake Cadagno. *Geobiol.* 10: 196-204. doi: 10.1111/j.1472-4669.2012.00326.x
- SCHANZ F., FISCHER-ROMERO C. & BACHOFEN R. (1998). Photosynthetic production and photoadaptatin of phototrophic sulfur bacteria in Lake Cadagno (Switzerland). *Limnol. Oceanogr.* 43: 1262-69.
- SCHUBERT C. J., VAZQUEZ F., LÖSEKANN-BEHRENS T., KNITTEL K., TONOLLA M. & BOETIUS A. (2011) Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 26-38
- 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 Microbiol. Ecol.* 53: 235-44.
- TONOLLA M., DEMARTA A., PEDUZZI R. & HAHN D. (1999) In situ analysis of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1325-30.
- 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). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 820-4.
- TONOLLA M., PEDUZZI R., & HAHN D. (2005) Long-term population dynamics of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of Lake Cadagno, Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3544-50.
- TONOLLA M., PEDUZZI S., HAHN D. & PEDUZZI R. (2003) Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 89-98.
- TONOLLA M., PEDUZZI S., DEMARTA A., PEDUZZI R. & HAHN D. (2004) Phototrophic sulfur and sulfate-reducing bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland. *J. Limnol.* 63: 157-66.
- WIRTH S. B., GILLI A., NIEMANN H., DAHL T. W., RAVASI D., SAX N., HAMANNA Y., PEDUZZI R., PEDUZZI S., TONOLLA M., LEHMANN M. F. & ANSELMETTI F. S. 9800 years of meromixis and euxinia in Lake Cadagno: Sedimentary, trace metal and molecular evidence for the formation of a permanently stable chemocline in a Swiss alpine lake (submitted to *Geochimica et Cosmochimica Acta*).