



Doctoral Thesis

Interactions among sulfate-reducing and purple sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland

Author(s):

Peduzzi, Sandro

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004593069> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 15015

**Interactions among sulfate-reducing and purple
sulfur bacteria in the chemocline of meromictic
Lake Cadagno, Switzerland**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
SANDRO PEDUZZI
Ing. dipl. EPFL
born on October 15, 1973
from Airolo (Ticino)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Alexander J.B. Zehnder, examiner
Prof. Dr. Dittmar Hahn, co-examiner
Dr. Mauro Tonolla, co-examiner

2003

Summary

Permanently stratified lakes represent optimal model systems for the study of aquatic microorganisms since defined and stable vertical gradients of environmental conditions such as light intensity and quality, oxygen availability, or the presence of sulfide support the development of diverse populations of microorganisms adapted to defined ecological niches. Lake Cadagno is a meromictic lake located 1923 m above sea level in the Southern Alps of Switzerland (46°33'N, 8°43'E), in the catchment area of a dolomite vein rich in gypsum (Piora-Mulde). A permanent chemocline at a depth between 9 and 14 meters is stabilized by density differences of salt-rich water constantly supplied by subaquatic springs to the monimolimnion and of electrolyte-poor surface water feeding the mixolimnion. High concentrations of sulfate and steep sulfide gradients in the chemocline support the growth of large numbers of bacteria (up to 10^7 cells ml⁻¹) indicating that a bacterial community making use of these gradients is present.

Molecular techniques that were used to analyze microbial community structure unaffected by the limitations of culturability showed that almost all bacteria in the chemocline of Lake Cadagno belonged to the Proteobacteria with numbers for the α -, β -, γ - and δ -subdivision of Proteobacteria accounting for 23, 17, 45 and 15% of the total number of bacteria, respectively. Most prominent numerically (ca. 35% of all bacteria) were large- and small-celled phototrophic purple sulfur bacteria. The large-celled phototrophic sulfur bacteria were identified as *Chromatium okenii*, while small-celled phototrophic sulfur bacteria consisted of four major populations forming a tight cluster with *Lamprocystis purpurea* (former *Amoebobacter purpureus* and *Pfennigia purpurea*) and *L. roseopersicina*. The numerically most important phototrophic sulfur bacteria in the chemocline were small-celled purple sulfur bacteria of two yet uncultured populations designated D and F. Other small-celled purple sulfur bacteria (*L. purpurea* and *L. roseopersicina*) were found in numbers about one order of magnitude lower. These numbers were similar to those of the large-celled purple sulfur bacteria (*C. okenii*) and green sulfur bacteria that almost entirely consisted of *Chlorobium phaeobacteroides*. Under limited light conditions during winter and spring, most populations were evenly distributed throughout the whole chemocline. Under more favorable light conditions during summer and fall, however, a micro-stratification of populations was detected suggesting specific eco-physiological adaptations of different populations of phototrophic sulfur bacteria to the steep physico-chemical gradients in the chemocline of Lake Cadagno.

Depending on the season as much as 35 to 45% of the total microbial community were associated in aggregates consisting of small-celled purple sulfur bacteria (15 to 35% of the total microbial community) and sulfate-reducing bacteria of the family *Desulfovibrionaceae* (3 to 13% of the total microbial community). Based on comparative sequence analysis of a 16S rRNA gene clone library, these cells of the *Desulfovibrionaceae* that accounted for up to 72% of all sulfate-reducing bacteria were almost completely represented by a cluster of sequences closely related to *Desulfocapsa*

thiozymogenes DSM7269. Another group of the *Desulfovibrionaceae* that was not very prominent numerically, was represented by a second cluster of sequences that resembled free-living cells or cells loosely attached to other cells or debris, similar to sulfate-reducing bacteria of the family *Desulfobacteriaceae*. The association between small-celled purple sulfur bacteria and these sulfate-reducing bacteria related to *D. thiozymogenes* was not specific for one of the four populations and also not obligate since non-associated cells of bacteria related to *D. thiozymogenes* were frequently found in winter and early summer when limited light conditions caused by snow and ice cover had reduced the abundance of small-celled phototrophic sulfur bacteria to below 25% of the values found in late summer. Nonetheless, the association suggested an ecological advantage to both groups of organisms under appropriate environmental conditions.

Both partners of this association were finally isolated using enrichment and isolation conditions that resembled those of their nearest cultured relatives, the sulfate-reducing bacterium *D. thiozymogenes* and small-celled purple sulfur bacteria belonging to the genus *Lamprocystis*, respectively. Molecular techniques were used to monitor the enrichments and to select potential isolates, i.e. *in situ* hybridization with specific oligonucleotide probes allowed targeted enrichments and isolations. Based on comparative 16S rRNA analysis and physiological characterization, isolate Cad626 was found to resemble *D. thiozymogenes* although it differed from the type strain by its ability to grow on lactate and pyruvate. Like *D. thiozymogenes*, isolate Cad626 was able to disproportionate inorganic sulfur compounds (sulfur, thiosulfate, sulfite) and to grow, although growth on sulfur required a sulfide scavenger (FeOOH). Isolate Cad16 represented small celled purple sulfur bacteria belonging to population F related to *L. purpurea* as evidenced by comparative 16S rRNA analysis and the presence of bacteriochlorophyll *a* and the carotenoid okenone. Mixed cultures of isolates Cad626 and Cad16 resulted in their association in aggregates similar to those observed in the chemocline of Lake Cadagno. Concomitant growth enhancement of both isolates in mixed culture suggested synergistic interactions that presumably resemble a source-sink relationship for sulfide between the sulfate-reducing bacterium growing by sulfur disproportionation and the purple sulfur bacteria acting as biotic scavenger.

The availability of these pure cultures opens up the door for future studies considering other facets of potential interactions in aggregates since both types of organisms are metabolically highly versatile and interactions may not be limited to sulfur compounds only. Future studies also need to address the effects of varying environmental conditions on growth and aggregate formation of both organisms and should incorporate the remaining three populations of uncultured small-celled purple sulfur bacteria in addition to attempts to imitate and maintain the environmental conditions found in the upper part of the chemocline of Lake Cadagno.

Résumé

Les lacs avec une stratification permanente représentent des modèles idéaux pour l'étude des micro-organismes aquatiques puisque différents groupes de bactéries adaptés à des niches écologiques particulières se succèdent le long de gradients stables de lumière, d'oxygène, de salinité et d'hydrogène sulfuré. Le lac de Cadagno est un lac méromictique crénogénique situé à une altitude de 1923 m.s.m au sud des Alpes dans le Massif du St. Gothard (46°33'N, 8°43'E), sur une lentille de dolomie riche en gypse (connue comme Piora-Mulde). La présence d'une zone de transition permanente entre 9 et 14 m de profondeur (la chémocline) est principalement due aux différences de densité entre les eaux du mixolimnion, pauvres en sels minéraux, et celles qui alimentent le monimolimnion par des sources sous-lacustres, riches en soufre, calcium et magnésium. Des teneurs en sulfates très élevés ainsi que des gradients très prononcés d'hydrogène sulfuré et d'autres substances trophogènes, permettent le développement et la prolifération massive de bactéries (jusqu'à 10^7 cellules ml^{-1}), ce qui indique l'existence d'une communauté bactérienne capable d'exploiter d'une manière active les gradients présents.

L'utilisation de techniques moléculaires a permis d'analyser la structure de la communauté bactérienne sans les limitations dues aux problèmes de cultivabilité. Par hybridation *in situ* il a été démontré que la grande majorité des bactéries de la chémocline appartient au phylum des protéobactéries; les groupes majeurs α -, β -, γ - et δ - ont montré des pourcentages de 23, 17, 45 et 15% respectivement par rapport au nombre total de bactéries. Le groupe des sulfobactéries pourpres (bactéries photosynthétiques anaérobies) appartenant au γ -protéobactéries est le plus nombreux et constitue environ 35% de la totalité des bactéries. De ce groupe font partie les sulfobactéries pourpres de grandes dimensions appartenant à l'espèce *Chromatium okenii* et quatre différentes populations de bactéries de petites dimensions, à l'apparence morphologique uniforme, phylogénétiquement très proches de *Lamprocystis purpurea* (anciennement *Amoebobacter purpureus* et *Pfennigia purpurea*) et *L. roseopersicina*. Deux des quatre populations de petite dimension, désignées par la suite D et F et auparavant pas cultivées *in vitro*, constituent la majorité des sulfobactéries pourpres de la chémocline. Les abondances des deux autres populations de sulfobactéries de petites dimensions (*L. purpurea* et *L. roseopersicina*) ainsi que de *C. okenii* et des sulfobactéries vertes, représentées presque entièrement par *Chlorobium phaeobacteroides*, étaient d'un ordre de grandeur inférieur. Dans des conditions de faible pénétration de lumière, en hiver et au printemps, la majorité de ces différentes populations liées au cycle du soufre étaient distribuée de manière uniforme dans la colonne de la chémocline. Par contre, en été et en automne avec des intensités lumineuses plus élevées, nous avons pu mettre en évidence des micro-stratifications marquées et distinctes des différentes populations, ce qui suggère des adaptations éco-physiologiques spécifiques aux gradients physico-chimiques très prononcés dans la chémocline.

Selon la saison jusqu'à 35-45% des bactéries totales de la chémocline était associé en agrégats constitués de sulfobactéries pourpres de petites dimensions et de bactéries sulfato-réductrices de la famille des *Desulfovibrionaceae* qui représentent respectivement de 15 jusqu'à 35% et de 3 à 13% de la totalité de la communauté bactérienne. Sur la base de l'analyse comparative des séquences obtenues après clonage des gènes codant pour la sous-unité 16S du RNA ribosomique, les séquences des *Desulfovibrionaceae*, qui représentent jusqu'à 72% des bactéries sulfato-réductrices, étaient regroupées en un branchement (cluster) phylogénétique proche de *Desulfocapsa thiozymogenes* DSM 7269. Un deuxième groupe appartenant aux *Desulfovibrionaceae* n'était pas très abondant et était représenté par des bactéries libres ou faiblement attachées à d'autres cellules ou à des débris de matière organique. L'association entre les bactéries sulfato-réductrices proches de *D. thiozymogenes* et les sulfobactéries pourpres à petites cellules ne semble pas être spécifique pour une des quatre populations décrites, ni strictement obligatoire. En effet, l'application de l'hybridation *in situ* a permis de mettre en évidence des bactéries proches de *D. thiozymogenes* non associés aux sulfobactéries pourpres en hiver et au printemps, lorsque l'abondance de ces dernières était réduite à moins de 25% par rapport à l'automne à cause des conditions de lumière limitées. Néanmoins, l'association observée suggère l'existence d'un avantage écologique pour les deux groupes d'organismes, au moins sous certaines conditions environnementales.

Les deux partenaires de cette association ont pu être mis en culture *in vitro*, en utilisant des conditions semblables à celles utilisées pour les bactéries les plus proches phylogénétiquement et déjà isolées, respectivement *D. thiozymogenes* et *Lamprocystis* spp.. Des techniques moléculaires ont permis de suivre les enrichissements et sélectionner les isolats potentiels. Selon l'analyse comparative des 16S rRNA, la souche Cad626 était phylogénétiquement très semblable mais non identique à *D. thiozymogenes*; en outre elle en différait par sa capacité de pousser avec du lactate et du pyruvate. Comme *D. thiozymogenes*, Cad626 est capable de croître par "disproportionation" de composés soufrés inorganiques (soufre élémentaire, thiosulfate, sulfite); la croissance sur le soufre nécessite néanmoins d'un utilisateur de sulfures (sulfide scavenger), par exemple de FeOOH. La deuxième souche isolée (Cad16) appartient à la population F des sulfobactéries pourpres proche de *L. purpurea*, comme l'indiquent l'analyse comparative des séquences du 16S de ARN ribosomique, la présence de bactériochlorophylle *a* et du caroténoïde okénone. Par des cultures mixtes des souches Cad626 et Cad16, nous avons obtenu des associations en agrégats semblables à ceux observés dans la chémocline du lac de Cadagno. Une meilleure croissance des deux isolats en culture mixte par rapport aux cultures pures, suggère l'existence d'interactions synergiques entre les deux souches. L'interaction mutuelle, avancée comme hypothèse, est probablement basée sur des échanges du type source-extinction (ou production-utilisation) d'hydrogène sulfuré: la bactérie sulfato-réductrice poussant par "disproportionation" du soufre élémentaire et les sulfobactéries pourpres ayant la fonction d'utilisateurs (scavengers) biologiques.

La disponibilité de deux organismes, avec un métabolisme très "versatiles", en culture pure offre la possibilité d'étudier les interactions potentielles sous diverses perspectives parce que les échanges métaboliques pourraient ne pas être limités qu'au seuls composés soufrés. Les résultats obtenus ouvrent ainsi la perspective pour des essais futurs dans lesquels il faudrait étudier les effets des variations des conditions environnementales sur la croissance et la formation d'agrégats entre les deux organismes. En outre, il serait fort utile d'intégrer dans ces expériences les trois populations de sulfobactéries pourpres restantes, qui ne sont pas encore en culture pure, dans le but de simuler les conditions environnementales de la chémocline du lac de Cadagno.