Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/167243

File ID	167243
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Nitrogen fixation in microbial mats : complexity and dynamics of a small-scale ecosystem
Author	I. Severin
Faculty	Faculty of Science
Year	2010
Pages	206
ISBN	978-90-76894-86-7

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/333963

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting

Het doel van dit onderzoek was het bepalen van de potentie van microbiële matten om stikstof te fixeren en om individuele functionele groepen van micro-organismen te identificeren die daartoe bijdragen. Daartoe werden microbiële matten bestudeerd die langs een getijdengradiënt aan de kust voorkomen en die daardoor in morfologie en samenstelling van de microbiële gemeenschap verschillen. Omdat stikstoffixerende organismen verschillende strategieën hebben, werd aangenomen dat de verschillende types microbiële matten verschillende dag-nacht ritmes in hun stikstoffixatie vertonen. Dit werd onderzocht met behulp van een hoge tijdresolutie en in lijn opgestelde, vrijwel onvertraagde meting van de nitrogenase activiteit (activiteit van het enzym dat de reductie van stikstofgas tot ammonium katalyseert) en door de analyse van de genetische potentie (de aanwezigheid van *nifH* en zijn transcripten).

Op basis van een aantal publicaties (met inbegrip van verscheidene literatuur overzichtsartikelen) kan worden geconcludeerd dat microbiële matten in verschillende milieus voorkomen waaronder sommige van de meest vijandige op deze planeet. Het succes van deze kleinschalige ecosystemen om zich te kunnen handhaven onder een grote verscheidenheid van omstandigheden wordt toegeschreven aan de grote (metabole) diversiteit van de mat-vormende organismen. Een van de vele processen die belangrijk zijn voor de ontwikkeling van microbiële matten is de fixatie van stikstofgas (N_2), het enige proces dat compenseert voor het verlies van gebonden stikstofverbindingen door microbiële processen zoals denitrificatie en anaerobe ammonium oxidatie. Het literatuur overzichtsartikel in **Hoofdstuk 2** maakt duidelijk dat de fixatie van stikstofgas belangrijk is in alle matten die daarop werden onderzocht. De beschikbare gegevens suggereren dat temperatuur en zoutgehalte de ontwikkeling en stikstoffixatie van microbiële matten voor een belangrijk deel bepalen. Mattenvormende microorganismen komen niettemin ook voor in hete bronnen en hypersaline milieus.

Er zijn verscheidene andere factoren die de stikstoffixatie van de hele gemeenschap bepalen. Om de variatie in de stikstoffixatie in de tijd en ruimte te begrijpen werden cyanobacteriële matten onderzocht, die gesitueerd zijn langs de litorale gradiënt op één van de Nederlandse Waddeneilanden. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**, bleek dat de dagelijkse patronen van de twee types microbiële matten zeer verschillend en dynamisch te zijn. Microbiële matten in de hogere regionen van het litoraal waren samengesteld uit een gemeenschap van verschillende cyanobacteriën en de hoogste nitrogenase activiteiten werden tijdens zonsopgang en zonsondergang gevonden. De matten die dichtbij de laagwater lijn groeien bevatten echter voornamelijk niet-heterocysten-

vormende, draadvormige cyanobacteriën. In deze matten bleek de nitrogenase activiteit het hoogste gedurende de nacht. Het was opmerkelijk dat, hoewel de dagelijkse patronen van de nitrogenase activiteit zo verschillend waren, de geïntegreerde dag en nacht stikstoffixatie in beide matten nagenoeg dezelfde bleken. De resultaten van de metingen suggereerden dat verschillende soorten van stikstoffixerende organismen op verschillende tijdstippen van de dag actief werden en dat de soortensamenstelling van de microbiële matgemeenschap het patroon van de dagelijkse stikstoffixatie als ook de maximumactiviteit bepaalde. De licht respons van nitrogenase activiteit en de licht actiespectra liet zien dat fototrofe organismen, waaronder de cyanobacteriën, de dominante stikstoffixeerders waren. Verder werd geconcludeerd dat de diversiteit van de stikstoffixerende cyanobacteriën de totale fixatie van de microbiële gemeenschap optimaal maakte.

Als vervolg op deze studie werd de structuur van de microbiële gemeenschap en de diversiteit van *nifH*, het structurele gen voor dinitrogenase reductase, en zijn transcripten onderzocht in **Hoofdstuk 4**. Beide microbiële mat gemeenschappen werden gedomineerd door cyanobacteriën maar verschilden met betrekking tot de samenstelling van de bacteriële gemeenschap als geheel. Hoger in het litoraal waren *Proteobacteria* de op één na meest algemene groep van bacteriën terwijl *Bacteroidetes* juist meer algemeen waren in de mat bij de laagwaterlijn. De stikstoffixerende gemeenschappen vertoonden een grotere overeenkomst op beide stations. *Lyngbya aestuarii*, een draadvormige, niet-heterocysten-vormende cyanobacterie, die beide matten structureel domineerde, was ook het meest algemeen in de kloonbibliotheken. Eencellige cyanobacteriën en *Proteobacteria* werden in beide matten aangetroffen maar droegen in verschillende mate bij tot de stikstoffixerende gemeenschap. De analyse van de expressie van *nifH* in een van de matten liet een discrepantie zien tussen de aanwezige en actieve stikstoffixerende gemeenschap. De hoeveelheid *nifH* transcripten veranderde gedurende een 24 uur cyclus en werden gedurende de dag door cyanobacteriën gedomineerd terwijl *Gammaproteobacteria* gedurende nacht piekten. Deze veranderingen waren mogelijk verantwoordelijk voor het waargenomen patroon van de stikstoffixatie in de twee mat types (**Hoofdstuk 3**).

Omdat cyanobacteriën, de enige zuurstofproducerende fototrofe stikstoffixeerders, het meest opvallende structurele onderdeel van microbiële matten zijn, werd in **Hoofdstuk 5**, de patronen van de dagelijkse expressie van *nifH* en van het 16S rRNA gen van drie benthische, draadvormige stikstoffixerende cyanobacteriën (*Lyngbya* sp., *Nodularia* sp. en *Anabaena* sp.) gekwantificeerd. Microscopische waarnemingen lieten zien dat op een na in alle matten de niet-heterocysten-vormende *Lyngbya* sp. de voornaamste cyanobacteriële morfologische vorm was en dat wanneer het gerelateerd werd aan het aantal gen kopieën, de expressie van zowel *nifH* als 16S rRNA van *Lyngbya* sp. hoger was dan die van heterocysten-vormende cyanobacteriën. Gerelateerd aan de totale hoeveelheid geëxtraheerd RNA, domineerde *Lyngbya* sp. de 16S rRNA gen expressie maar werd weggeconcurreerd door heterocysten-vormende cyanobacteriën voor wat betreft de expressie van *nifH*. Dit toont aan dat, met betrekking tot de totale expressie van *nifH*, de

structureel overheersende stikstoffixeerder blijkbaar niet de meest actieve was. De resultaten lieten ook verschillende celspecifieke expressieniveaus zien door de drie cyanobacteriën gedurende de loop van een dag-nacht cyclus en ook in de verschillende mat types. Daarenboven volgde het patroon van de *nifH* expressie niet die van de nitrogenase activiteit en dus kan genexpressie niet direct worden gerelateerd aan activiteit van het door dat gen gecodeerde enzym.

De grote diversiteit van de sequenties van *nifH* in de microbiële matten van Schiermonnikoog was de reden om de expressie van de dominante types (vier niet-heterocysten-vormende cyanobacteriën en een lid van de *Gammaproteobacteria*) gedurende een dag-nacht cyclus te bepalen (**Hoofdstuk 6**). Zoals al in **Hoofdstuk 5** vermeld werd, was er weinig expressie van *Lyngbya* sp. *nifH*. De andere drie cyanobacteriële fylotypes domineerden de expressie van *nifH* op alle stations. De stikstoffixerende leden van de *Gammaproteobacteria* vertoonden een hoge celspecifieke expressie van *nifH* maar vanwege hun lage aantallen *nifH* kopieën was hun bijdrage tot *nifH* expressie van de hele gemeenschap laag in vergelijking tot de dominerende stikstoffixerende cyanobacteriën. De resultaten lieten variabele bijdragen aan de totale *nifH* expressie door de verschillende stikstoffixeerders zien. Ook hier volgde de stikstoffixatie niet de expressie van *nifH* en bevestigde dat moleculaire data alleen niet voldoende zijn om de stikstoffixatie in een ecosysteem te onderzoeken.

Microcoleus chthonoplastes is een kosmopolitische cyanobacterie die erom bekend staat in verschillende milieus microbiële matten te vormen. Dit organisme werd opnieuw onderzocht vanwege zijn potentiële vermogen om stikstof te fixeren. Hoewel alle cyanobacteriële matten, inclusief die gedomineerd worden door *M. chthonoplastes*, erom bekend staan dat ze stikstof fixeren, werd aangenomen dat dit organisme daartoe niet in staat is. In **Hoofdstuk 7** wordt aangetoond dat in het genoom van *M. chthonoplastes* PCC 7420 een complete *nif* cluster aanwezig is en dat de drie structurele nitrogenase genen *nifHDK* aanwezig zijn in een collectie van reinculturen van *M. chthonoplastes* afkomstig van verschillende, geografisch uit elkaar liggende, locaties. Fylogenetische analyse van het *nif* operon doet vermoeden dat het door horizontale gentransfer werd verkregen. Verder doet de aanwezigheid van hetzelfde *nif* cluster in verschillende isolaten van *M. chthonoplastes*, afkomstig van plaatsen uit de hele wereld, vermoeden dat deze horizontale gentransfer vroeg in de evolutie van dit organisme moet hebben plaatsgevonden. Hoewel we niet in staat bleken nitrogenase in *M. chthonoplastes* te induceren of *nif* genen in een laboratoriumcultuur van dit organisme tot expressie te brengen, gebeurde dit wel onder natuurlijke condities in de microbiële mat.

De microbiële matten die in dit onderzoek werden bestudeerd ervaren grote verschillen in zoutgehalte. Daarom wordt in **Hoofdstuk 8** het effect van veranderende zoutgehaltes op de nitrogenase activiteit en op de samenstelling van de actieve stikstoffixerende gemeenschap onderzocht. Alle typen matten vertoonden de hoogste nitrogenase activiteit bij zoutgehaltes die dicht bij die van het zeewater liggen of lager, maar de respons op verlaging of verhoging van het zoutgehalte was het sterkst in matten hoger in het litoraal.

Deze respons betrof zowel veranderingen van de nitrogenase activiteit als ook veranderingen in de actieve stikstoffixerende gemeenschap. De twee stations hoger in het litoraal vertoonden bij een zoutgehalte van zeewater *nifH* expressie door cyanobacteriën (*Oscillatoriales* and *Chroococcales*) en *Proteobacteria* (*Gamma-* en *Deltaproteobacteria*). We namen waar dat met toenemend zoutgehalte de bijdrage van *Gamma-* en *Deltaproteobacteria* toenam terwijl de nitrogenase activiteit afnam. Het station aan de laagwaterlijn liet bij alle geteste zoutgehaltes een lage bijdrage van cyanobacteriën aan de *nifH* transcriptbibliotheken zien maar liet een toename zien van de deltaproteobacteriële *nifH* transcripten onder hypersaline condities.

De eigenschappen van stikstoffixatie en de samenstelling van de stikstoffixerende gemeenschap in drie microbiële matten die langs een getijdengradiënt gelegen waren werd gedurende drie opeenvolgende jaren onderzocht (**Hoofdstuk 9**). De patronen van de dag-nacht ritmes en de geïntegreerde snelheden van de nitrogenase activiteit in de drie types microbiële matten verschilden van elkaar evenals de samenstelling van de stikstoffixerende gemeenschap. De *nifH* kloonbibliotheken van het station dat het meest door zoetwater beïnvloed werd, bevatte voornamelijk cyanobacteriële en alfaproteobacteriële sequenties, terwijl de andere twee stations gedomineerd werden door gamma- en deltaproteobacteriële stikstoffixeerders. Daarenboven werden gedurende een periode van twee tot drie jaar in ieder van de mat types verschuivingen in de stikstoffixerende gemeenschap waargenomen evenals veranderingen in de eigenschappen van de nitrogenase activiteit.

De resultaten van dit onderzoek hebben laten zien dat er verschillende types microbiële matten langs de getijdengradiënt van het Waddeneiland Schiermonnikoog ontstaan. Deze mat types verschillen in de dag-nacht patronen en de geïntegreerde stikstoffixatiesnelheden. We hebben aannemelijk gemaakt dat dit komt door verschillen in de aanwezige en actieve gemeenschap van stikstoffixeerders in de verschillende matten. We hebben ook aangetoond dat cyanobacteriën de belangrijkste stikstoffixeerders in deze matten zijn. Als echter de metingen van de nitrogenase activiteit worden vergeleken met de moleculaire gegevens blijkt er een discrepantie te bestaan tussen het genetische potentieel (aanwezigheid van het gen), gen expressie en daadwerkelijke activiteit. Zowel nitrogenase activiteit en de actieve stikstoffixerende gemeenschap vertonen een grote variabiliteit in tijd en ruimte.