Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/200086

File ID	200086
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Linking microbial community structure to biogeochemical function in coastal marine sediments: Stable isotope probing combined with magnetic bead capture
Author	T. Miyatake
Faculty	Faculty of Science
Year	2011
Pages	120
ISBN	978-94-6108-115-5

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/362993

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 than for strictly personal, individual use.

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

Samenvatting

Micro-organismen (bacteriën, microalgen etc.) vormen een zeer diverse groep in natuurlijke ecosystemen en spelen een centrale rol in vele processen in de elementencycli. Het doel van deze studie was om door middel van het labelen van 16S rRNA met het stabiele isotoop ^{13}C ('stable isotope probing'; SIP) verbanden aan te tonen tussen de microbiële soortensamenstelling en de biogeochemische processen in kustsedimenten. In de microbiële ecologie wordt het 16S rRNA algemeen gebruikt om de diversiteit en soortensamenstelling van micro-organismen te beschrijven. Het merendeel van de16S rRNA sequenties die in natuurlijke ecosystemen gevonden worden is echter afkomstig van micro-organismen die nog niet geïsoleerd en beschreven zijn. Er is daarom weinig bekend over het metabolisme van deze micro-organismen en daarmee over hun rol in biogeochemische processen. Functionele genen die coderen voor bepaalde enzymen geven meer informatie over de rol van micro-organismen. Het blijft echter moeilijk om een direct verband te leggen tussen een organisme en een microbieel proces omdat er vaak geen eenduidig verband bestaat tussen genexpressie en processnelheden. Er is daardoor weinig bekend over het functioneren van microbiële gemeenschappen en de interacties tussen micro-organismen onderling en met hun omgeving.

SIP, een verzameling van technieken waarbij biomarkers worden gelabeld met stabiele isotopen (^{13}C, ^{15}N), biedt de mogelijkheid om tegelijkertijd micro-organismen te identificeren (de biomarker) en hun metabolische activiteiten te karakteriseren (label opname). In dit proefschrift is eerst een SIP-methode ontwikkeld die gebruikt maakt van oligonucleotide probes en paramagnetische bolletjes om het 16S rRNA van specifieke fylogenetische groepen te isoleren en om die vervolgens te analyseren op de isotopensamenstelling. Het voordeel van deze methode (Mag-SIP) ten opzichte van andere SIP methoden is de combinatie van een hoge fylogenetische resolutie en de mogelijkheid om lage hoeveelheden label te kunnen detecteren waardoor artefacten als gevolg van de toevoeging van gelabelde substraten worden vermeden.

De Mag-SIP methode werd vervolgens toegepast op het sediment van slikplaten in de getijdenzone om te onderzoeken welke groepen van micro-organismen betrokken zijn bij chemoheterotrofe en chemoautotrofe processen, en om de koolstofstromen tussen groepen van micro-organismen te meten.

In **hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling en verfijning van de Mag-SIP methode beschreven. De isotopenanalyse van het geïsoleerde 16S rRNA werd verbeterd waardoor er ongeveer 10 keer minder 16S rRNA nodig is voor de isotopenmeting. Dit maakte het mogelijk om een geneste set van specifieke probes te ontwikkelen die een stapsgewijze verfijning van de fylogenetische groepen van de *Bacteria*, via de *Deltaproteobacteria* naar de *Desulfobacteraceae* mogelijk maakten. In kustsedimenten is de familie *Desulfobacteraceae* vermoedelijk betrokken bij de sulfaatreductie; het belangrijkste afbraakproces van organisch materiaal. De specificiteit van elke probe werd bepaald door het maken van kloonbibliotheken van het geïsoleerde 16S rRNA. De specificiteit van het

uiteindelijke protocol was uitstekend omdat meer dan 90% van de klonen tot de doelgroep behoorden. De Mag-SIP methode werd vervolgens gebruikt in een studie naar de substraatopname door sulfaatreducerende *Deltaproteobacteria* in zuurstofloos kustsediment. Hieruit bleek dat propionzuur maar niet glucose een belangrijk substraat was voor de *Desulfobacteraceae*.

Substraatgebruik door de belangrijkste fylogenetische groepen van micro-organismen werd vergeleken in twee sedimentlagen van 0-2 cm en 2-5 cm diep **(hoofdstuk 3)**. Kloonbibliotheken en Mag-SIP resultaten lieten duidelijke verschillen zien tussen de twee sedimentlagen. In de toplaag van het sediment gebruikten alle onderzochte groepen micro-organismen de aangeboden ^{13}C-gelabelde substraten. In de diepere zuurstofloze laag domineerden daarentegen *Gammaproteobacteria* de glucoseopname terwijl sulfaatreducerende *Deltaproteobacteria* en vooral *Desulfobacteraceae* betrokken waren bij de opname van azijnzuur, propionzuur en aminozuren. De oxygeen fototrofe micro-organismen *Cyanobacteria* en diatomeeën waren dominant aanwezig in beide sedimentlagen. Met de Mag-SIP methode werd aangetoond dat *Cyanobacteria* en diatomeeën in staat bleken om alle substraten te gebruiken in de toplaag van het sediment, terwijl ze in de diepere sedimentlaag mogelijk overleven door de vergisting van glucose. Vergisting van externe organische substraten door *Cyanobacteria* en diatomeeën is tot nu toe nog maar weinig onderzocht.

Anaerobe chemoautotrofie en de betrokken bacteriën werden bestudeerd in twee inter-getijde sedimenten **(hoofdstuk 4)**. Donker fixatie van natrium[^{13}C]bicarbonaat werd gemeten in aerobe en anaerobe incubaties. Tussen de twee locaties werd met de PLFA-SIP methode een duidelijk verschil in de labelverdeling over de verschillende biomarkers gevonden. Dit suggereert dat verschillende chemoautotrofe groepen van micro-organismen op de twee locaties actief waren. Het verschil tussen de twee locaties werd vooral bepaald door het belang van anaerobe chemoautotrophy. In de aanwezigheid van vrije sulfide was anaerobe chemoautotrofie niet erg belangrijk. Vervolgens werd met de Mag-SIP methode aangetoond dat de sulfaatreducerende *Deltaproteobacteria* belangrijker waren voor de anaerobe chemoautotrofie dan de *Gammaproteobacteria*. De resultaten uit **hoofdstuk 4** suggereren dat anaerobe chemoautotrofie een belangrijk proces is in kustsedimenten en daarom meer aandacht verdient in toekomstige studies.

Hoofdstuk 5 behandelt de koolstofstromen van benthische diatomeeën naar heterotrofe bacteriën. In een in situ pulse-chase experiment werd natrium[^{13}C]bicarbonaat verdeeld over het sedimentoppervlak tijdens laag tij. Vervolgens werd gedurende 5 dagen de ^{13}C-opname in de belangrijkste koolstofreservoirs, in intermediaire metabolieten en in microbiële biomarkers gevolgd. De inbouw van ^{13}C-label in micro-organismen werd bestudeerd met de PLFA-SIP en Mag-SIP methoden. Diatomeeën waren de belangrijkste

primaire producenten en de overdracht van ^{13}C-label naar heterotrofe bacteriën verliep via twee processen die zich onderscheiden door hun processnelheid. Zowel de ^{13}C-PLFA als ^{13}C-rRNA data suggereren een snelle overdracht van label van de diatomeeën naar heterotrofe bacteriën gedurende de eerste 24 uur. Dit was vermoedelijk het gevolg van de uitscheiding van laagmoleculaire organische stoffen door de diatomeeën. Deze aanvankelijke snelle overdracht werd gevolgd door een langzamer proces. Dit viel samen met de afbraak van water-extraheerbare extracellulaire polymere koolhydraten (EPS) afkomstig van diatomeeën. Uit de ^{13}C-label incorporatie in het 16S rRNA bleek dat de microbiële gemeenschap in biofilms van diatomeeën een sterk verweven ecosysteem is waarin de meeste groepen vergelijkbare groeisnelheden hebben.

Met de in dit proefschrift beschreven Mag-SIP methode kunnen, in combinatie met andere technieken, de microbiële soortensamenstelling en biogeochemische functies aan elkaar gerelateerd worden. Hierdoor kon gedetailleerde informatie verkregen worden over de micro-organismen die betrokken zijn bij een aantal belangrijke processen in kustsedimenten. Van een aantal groepen werd aangetoond dat hun rol breder is dan algemeen werd aangenomen. Een aantal verrassende resultaten zijn ondermeer dat de fototrofe diatomeeën en *Cyanobacteria* zeer wel in staat zijn om ook onder zuurstofloze condities organische substraten op te nemen en dat in mariene sedimenten sulfaatreducerende bacteriën uit de *Deltaproteobacteria* belangrijke chemoautotrofe micro-organismen zijn.