

AMBIO - Resultaten

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

DUUR VAN HET PROJECT
15/12/2008 - 30/06/2011

BUDGET
857.900 €

SLEUTELWOORDEN

Antarctica, Microbiële diversiteit, biogeografie, bacteriën, cyanobacteriën, micro-algen, endemisme, kosmopoliet.

CONTEXT

Microbiële organismen domineren de meeste Antarctische habitats en zijn cruciaal voor de ecosysteemfuncties en primaire productiviteit. In vergelijking met gematigde en tropische regio's en ondanks hun ecologisch belang, is er weinig gekend over Antarctische microbiële organismen en hun geografische verspreiding. Dit is het gevolg van een gebrek aan systematische staalname en de problemen die geassocieerd zijn met het definiëren van soorten, cryptische diversiteit en cultiveerbaarheid. Bijgevolg missen we de basisgegevens die nodig zijn om toekomstige veranderingen in microbiële diversiteit en taxonomische samenstelling als respons op ecosysteemveranderingen en/of introducties door de mens te bestuderen.

De meeste diversiteitstudies werden doorgaans uitgevoerd met traditionele methoden, zoals isolatie van bacteriën en microscopische identificatie van cyanobacteriën en protisten op basis van morfologische kenmerken. Hierbij werd veelal een breed soortconcept gehanteerd. Deze benadering ontbrak ook aan stabiliteit door de plasticiteit van de morfologie. Moleculaire technieken maakten studies gebaseerd op het SSU rRNA gen mogelijk en hebben een ander licht geworpen op de diversiteit en het bestaan van nog niet gecultiveerde genotypes. In tegenstelling tot fenotypische merkers hebben de methodes gebaseerd op genotypes een veel fijnere taxonomische resolutie. Bovendien reflecteren deze gegevens de evolutionaire geschiedenis van de organismen. Moleculaire technieken hebben ook een aanzienlijk potentieel voor het bestuderen van de geografische verspreiding van micro-organismen. Dit is belangrijk, aangezien het nog steeds onduidelijk is of geografische isolatie belangrijk is voor de biogeografie van micro-organismen. Deze 'ubiquiteitshypothese' werd voor het eerst geformuleerd door Baas-Becking (1934) en stelt dat 'alles overal is, maar dat de omgeving selecteert'. Dit wordt ondersteund door de veronderstelling dat de enorme populatiegrootte van micro-organismen leidt tot een alomtegenwoordige dispersie en ervoor zorgt dat lokale extincties virtueel onmogelijk zijn. Nochtans suggereren verschillende recente studies dat micro-organismen wel degelijk een beperkte geografische verspreiding kunnen vertonen en dat endemisme mogelijk is.

Antarctica is een uiterst geschikte regio om **microbiële biogeografie** te bestuderen en om het belang na te gaan van historische processen versus huidige omgevingscondities voor het structureren van de microbiële diversiteit en gemeenschapsstructuur. Dit is het gevolg van de extreme isolatie van het continent in verhouding met de rest van de wereld, de geografische setting en de aard van de oceaan en atmosferische stromingen en het verspreid voorkomen van terrestrische habitats in de kustgebieden. Bovendien zijn de microorganismen in Antarctica goed aangepast aan extreme omgevingsomstandigheden, zoals lage en extreem variërende temperaturen, grote veranderingen in lichtcondities, hoge seizoensale UV-B stress en een lage vochtigheid. Het continent wordt aldus gekenmerkt door een wijde omgevingsgradiënt die de biodiversiteit en gemeenschapsstructuur van de aanwezige habitats onder druk zet. Sommige habitats bieden echter bescherming tegen extreme omstandigheden, zoals vloeibaar water dat in aquatische omgevingen kan fungeren als thermische buffer. Bovendien tonen voorlopige analyses van de diversiteit in aerosolen op het Antarctische schiereiland aan dat transport van microorganismen over grote afstanden mogelijk is, hoewel de aangetroffen aerobiota grotendeels van Antarctica afkomstig zijn.

DOELSTELLINGEN

Het huidige project beoogt de beschikbare data over de microbiële diversiteit in Antarctica uit te breiden door middel van een geïntegreerde en gestandaardiseerde analyse van de diversiteit van aquatische habitats in terrestrische milieus. We pasten een polyfasische benadering toe die morfologische karakterisatie via microscopie combineert met moleculaire technieken voor de studie van de diversiteit van bacteriën, cyanobacteriën en protisten (met speciale aandacht voor groenwieren en diatomeeën). We beogen tot een vollediger beeld van de microbiële diversiteit te komen door omgevingsstalen te analyseren in combinatie met de isolatie van stammen.



AMBIO - Resultaten

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

CONCLUSIES

a) Diversiteit van Bacteria

Negen stalen werden geïncubeerd in verschillende types media en bij drie relatief lage temperaturen voor de studie van de **cultiveerbare bacteriële diversiteit**. In totaal werden 3806 isolaten bekomen. De isolaten werden eerst gekarakteriseerd door een vergelijking van een volledig genoom fingerprint (rep-PCR) waarna ze werden gegroepeerd in ongeveer 1400 unieke rep-types. Slechts enkele van deze rep-types werden geïsoleerd uit meer dan één staal. Om deze organismen te identificeren werd het 16S rRNA gen van een vertegenwoordiger van elk type gedeeltelijk of volledig gesequeneerd. De teruggevonden diversiteit behoorde tot vier grote fyta, namelijk *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* en *Firmicutes*. Isolaten die behoorden tot het fyllum *Deinococcus-Thermus* werden enkel teruggevonden in 4 stalen. We troffen een groot aantal potentieel nieuwe soorten of nieuwe genera aan onder de isolaten. Hoewel de meeste genera die werden teruggevonden reeds op Antarctica aangetroffen werden, was dit niet het geval voor 30 van de 83 genera. Bovendien behoren verschillende isolaten tot genera die tot op heden slechts één soort of zelfs één stam bevatten. Een vergelijking met sequenties in een publieke database gaf aan dat een belangrijk aantal (42,2%) van de gevonden soorten beperkt lijkt tot Antarctica. Het is echter geweten dat slechts ongeveer 5% van alle bestaande bacteriële soorten op dit moment aanwezig is in deze databases zodat dit aantal in de toekomst mogelijk kan dalen. Het suggereert wel dat in Antarctica zowel kosmopolitische taxa voorkomen als taxa met een beperkte dispersiecapaciteit die evolueerden in isolatie.

Een selectie van *Flavobacterium* isolaten werd in meer detail bestudeerd door middel van een fylogenie van het 16S rRNA gen en het *gyrB* gen in combinatie met biochemische en chemotaxonomische merkers. We ontdekten nieuwe stammen van het Antarctische taxon *Flavobacterium micromati* en twaalf potentieel nieuwe soorten die verder zullen bestudeerd en beschreven worden. Een PCR test met specifieke 16S rDNA primers ontwikkeld en gebruikt op 32 Antarctische stalen. Deze aanpak kan in de toekomst gebruikt worden om de verspreiding van deze *Flavobacterium* soorten in omgevingsstalen in detail te bestuderen.

b) Diversiteit van Cyanobacteria

Verschiedende moleculaire technieken werden gebruikt om de **diversiteit van cyanobacteriën** te bestuderen in isolaten (5) en omgevingsstalen (95). Vijf Oscillatoriaceae **isolaten** werden geïsoleerd uit vier continentale stalen. We ontdekten 2 OTU's die niet werden aangetoond met andere moleculaire technieken (clone libraries en DGGE). Dit benadrukt het belang van een polyfasische benadering om de microbiële diversiteit van omgevingsstalen te bestuderen.

De **niet gecultiveerde diversiteit** werd bestudeerd via clone libraries en Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **Clone libraries** onthulden een relatieve hoge rijkdom die varieerde tussen 2 en 12 operational taxonomic units (OTU's, gedefinieerd met een grens van 98,5% 16S rRNA simillariteit).

Een detrended correspondence analysis (DCA) werd uitgevoerd met de data van de clone libraries van 20 stalen afkomstig van Prydz Bay, de Trans-Antarctische Bergen, Shackleton Range en het Antarctische schiereiland en toonde aan dat de OTU samenstelling geografisch gestructureerd is met voor elke regio een min of meer een unieke flora. Deze patronen kunnen het gevolg zijn van verschillen in limnologische eigenschappen tussen de regio's of dispersie limitatie. De stalen van saliene meren waren gegroepeerd.

Voor de **DGGE**, de banden van een deelverzameling van 56 stalen werden gesequeneerd en gegroepeerd in 33 OTU's. De meerderheid (60%) is geografisch en ecologische wijdverspreid. De minderheid (40%) is beperkt tot de koude biosfeer (polaire en alpiene habitats) en 5 OTU's zijn mogelijk endemische voor Antarctica.

In conclusie, deze sequentie-analyses suggereren dat dispersielimitatie in combinatie met omgevingsfactoren de verspreiding van cyanobacteriële OTU's bepalen en dat zowel kosmopolitische als potentieel endemische cyanobacteriën voorkomen op Antarctica.

c) Diversiteit van microalgen

De **cultiveerbare diversiteit van coccale groenwieren** werd bestudeerd in stalen van 33 meren in Maritiem en Continentaal Antarctica. De 14 verschillende taxa behoren tot de Chlorophyceae en Trebouxiophyceae en werden vergeleken met de aanwezige sequenties in GenBank. Deze analyse toonde de aanwezigheid aan van een ruime fylogenetische diversiteit bestaande uit schijnbaar endemische Antarctische taxa op verschillende taxonomische niveaus. Twee taxa komen voor in de meeste regio's, wat een wijde verspreiding over Antarctica suggereert. De meerderheid van de bestudeerde taxa (10 van de 14) werd echter enkel teruggevonden in één ijsvrije regio. Een moleculaire klok werd toegepast en gekalibreerd door gebruik te maken van fossiele gegevens voor de splitsing van de Chlorophyta en de Streptophyta tussen 700 en 1500 Ma. De meeste taxa (16/26) divergeerden van hun nauwste verwanten tussen 17 en 84 Ma wat ongeveer samenvalt met de opening van Drake Passage. Sommige taxa divergeerden vroeger en één taxon heeft een geschatte leeftijd tussen 330 tot 708 Ma, wat de splitsing van Gondwana voorafgaat. De variatie in ouderdom tussen de taxa wijst op verschillende onafhankelijke maar zeldzame kolonisatiegebeurtenissen.

Voor de **diatomeeën** werd de cultiveerbare diversiteit bestudeerd in het globaal verspreide soortcomplex *Pinnularia borealis*. De tijdsgekalibreerde moleculaire fylogenie gebaseerd op *rbcL* en *LSU* (D1-D2 regio) sequentiedata toonde de divergentie aan van de continentaal Antarctische lijnen van west Europese taxa rond 7,67 Ma. Wanneer de bevindingen van de **groenwieren** en **diatomeeën** worden gecombineerd blijkt dat de gevonden patronen gelijkaardig zijn aan die in multicellulaire organismen. Onze gegevens ondersteunen aldus de 'glaciale refugia hypothese', die stelt dat lange termijn overleving tijdens glaciaal-interglaciaal cycli resulteerde in een specifieke Antarctische flora en fauna.



AMBIO - Resultaten

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

d) Geografische patronen in Antarctische microbiële diversiteit

Een vergelijking van de **niet gecultiveerde diversiteit** in 41 stalen toonde aan dat conductiviteit en variabelen die gerelateerd zijn met saliniteit de verschillen in de gemeenschapsstructuur van **diatomeeën, groenwieren en cyanobacteriën** significant kunnen verklaren. Een **variation partitioning** analyse van 41 stalen waarvan alle microbiële groepen werden bestudeerd toonde aan dat geografische variabelen belangrijker zijn in de eukaryote micro-organismen in vergelijking met de prokaryoten. Als deze verschillen tussen verschillende taxonomische groepen echt zijn, dan zijn de contrasterende patronen die geobserveerd worden tussen de pro- en eukaryoten waarschijnlijk gerelateerd aan verschillen in levenscyclus karakteristieken (b.v. vorming van sporen, ruststadia, seksueel versus asexuele fase). De bevindingen van één bepaalde microbiële groep kunnen aldus niet veralgemeend worden naar microorganismen als een geheel. Een 454 pyrosequencing analyse zal ons in staat stellen om deze hypothese verder te testen. Wat we nu reeds kunnen besluiten is dat de **gecultiveerde en cultuuronafhankelijke benaderingen complementair zijn in het bestuderen van de diversiteit van een bepaald habitat**, aangezien sommige gecultiveerde taxa niet werden gedetecteerd met de 454 pyrosequencing analyse.

BIJDRAGE AAN EEN BELEID GERICHT OP DUURZAME ONTWIKKELING

Onze analyses toonden een relatief hoge biodiversiteit aan in Antarctische microbiële gemeenschappen. Op basis van SSU rRNA sequenties werden een aantal soorten gedetecteerd die nieuw zijn voor de wetenschap en mogelijk uniek zijn voor Antarctica. Deze bevindingen tonen de grote waarde aan van Antarctica als relatief onverkend territorium voor biotechnologische, biomedische en andere industriële toepassingen. De ontdekking dat Antarctische meren worden gedomineerd door endemische micro-organismen, heeft bovendien belangrijke implicaties voor het behoud van deze ecosystemen. Traditioneel worden Antarctic Specially Protected Areas (ASPAs) gebaseerd op de diversiteit en aanwezigheid van multicellulaire organismen. Omdat micro-organismen, samen met enkele mossen, korstmossen, twee bloeiende planten en een aantal kleine invertebraten, de enige permanente bewoners zijn, zouden ze een bijkomend criterium moeten vormen voor het afbakenen van ASPAs. Bijvoorbeeld, een endemisch, tot nu toe ongeïdentificeerd kiezelwier komt slechts voor in enkele meren van de Larsemann Hills. De aanwezigheid van dit taxon is waarschijnlijk gerelateerd aan het feit dat sommige meren fungeerden als glaciale refugia tijdens de laatste ijstijd. De bescherming van dergelijke regio's zou dus een prioriteit moeten zijn op de internationale agenda van het Committee for Environmental Protection (CEP). Het wordt tevens duidelijk dat we nu slechts 'het topje van de ijsberg' van de microbiële biodiversiteit in Antarctica hebben ontdekt. Verder onderzoek is nodig en zal ongetwijfeld meer nieuwe organismen en inzichten opleveren. Met het oog op de verwachte toename van de effecten van de opwarming van de aarde, zoals een stijgende temperatuur, toenemende droogte, veranderingen in UV straling en sneeuw- en ijsbedekking, is er een dringende nood om de impact van deze veranderingen op Antarctische biota verder in detail te bestuderen. De totale microbiële diversiteit is immers belangrijk voor het functioneren van deze unieke ecosystemen. Bovendien moeten er meer inspanningen geleverd worden om de introductie van invasieve microbiële soorten te vermijden, wat nu reeds voor multicellulaire organismen één van de prioriteiten is van het CEP.

CONTACT INFORMATIE

Coordinator

Annick Wilmotte

Université de Liège (ULg)
Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP)
Institut de Chimie
Sart Tilman B6
B-4000 Liège
Tel:+32 (0) 4 366 38 56 / 33 87
Fax:+32 (0) 4 366 33 64
awilmotte@ulg.ac.be

Promotoren

Wim Vyverman

Universiteit Gent (Ugent)
Protistologie en Aquatische Ecologie (PAE)
Krijgslaan 281 S8
B-9000 Gent
Tel:+32 (0)9 264 85 01
Fax:+32 (0)9 264 85 99
Wim.Vyverman@UGent.be

Anne Willems

Universiteit Gent (Ugent)
Laboratorium voor Microbiologie
(LM-UGent)
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent
Tél:+32 (0)9 264 51 03
Fax:+32 (0)9 264 50 92
Anne.Willems@UGent.be

SSD
WETENSCHAP VOOR EEN DUURZAME ONTWIKKELING



FEDERAAL WETENSCHAPSBELEID

Louizalaan 231 • B-1050 Brussel
Tel. +32 (0)2 238 34 11 • Fax +32 (0)2 230 59 12 • www.belspo.be/ssd
Contact. Maaïke Vancauwenberghe

BIODIVERSITEIT | ANTARCTICA