

Ecology of Lake Balaton/ A Balaton ökológiája

MTA ÖK BLI Elektronikus folyóirata
2016. 3: 8-15.



AEROB ANOXIGENIKUS FOTOTRÓF BAKTÉRIUMOK MENNYISÉGE ÉS SZEZONÁLIS DINAMIKÁJA A BALATONBAN

Tugyi Nóra*, Vörös Lajos, Somogyi Boglárka

MTA Ökológiai Kutatóközpont, Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany,
Klebelsberg Kuno u. 3.

*tugyi.nora@okologia.mta.hu

Kulcsszavak: aerob anoxigenikus fototrófok (AAP), infravörös mikroszkópia, abundancia

Kivonat: Az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok (AAP) infravörös sugárzást hasznosító baktériumok, amelyek aerob életmódot folytatnak és csupán másfél évtizede ismert, hogy a tengerek, óceánok mikroszkópikus élővilágának fontos szereplői Kontinentális vizekben az AAP szervezetek előfordulását még alig ismerjük, ez idáig csehországi és közép-ázsiai tavakban mutatták ki előfordulásukat. A hagyományos mikroszkópi eljárásokkal ezek az élőlények nem detektálhatók, ehhez a spektrum közeli infravörös tartományára kell az észlelést kiterjesztenünk. Célunk volt az AAP szervezetek előfordulásának megismerése a Balatonban 2014 és 2015 között, Olympus XM10-IR infravörös kamera segítségével, epifluoreszcens mikroszkópi technikával. A kapott eredmények alapján az AAP szervezetek a Balatonban jelentős abundancia értékekkel ($4 \cdot 10^4$ - $42 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1}) képviseltették magukat. Ezek nagyságrendileg megfeleltek a korábban tengeröblökben leírtaknak. Jellegzetes szezonális dinamikát figyeltünk meg az év során, nyári magasabb és téli alacsonyabb abundancia értékekkel. Az AAP szervezetek a produktívabb nyugati területeken fordultak elő nagyobb mennyiségben: a Siófoki-medencében az AAP szervezetek abundanciája körülbelül a fele volt a Keszthelyi-medencében megfigyeltnek.

Bevezetés

Az 1970-es évek végén a fluoreszcens technikák alkalmazásának köszönhetően felfedezték, hogy apró, bakteriális méretű algák – fotoautotróf pikoplankton; $< 3\mu\text{m}$ - népesítik be az óceánok és tengerek felső régióját, csakúgy, mint a kontinentális tavak többségét (JOHNSON & SIEBURTH, 1979; WATERBURY *et al.*, 1979; VÖRÖS *et al.*, 1991). Az autotróf pikoplankton felfedezése teljesen átalakította a vízi táplálékhálózatról és anyagforgalomról korábban kialakult képet. Kiderült továbbá, hogy az algák által fixált szén jelentős része (akár 90 %) a mikrobiális táplálékhálózaton ('microbial loop') halad keresztül, amelyben az autotróf pikoplankton és a heterotróf bakterioplankton produkciója a heterotróf nanoflagelláták közvetítésével jut el a magasabb trofikus szintek felé (AZAM *et al.*, 1983). A bakteriális méretű, fényenergiát hasznosító szervezetek között mindemellett olyan mikroorganizmusok is megtalálhatóak, amelyek nem termelnek oxigént.

Az ezredfordulóig a vízi ökoszisztémákban előforduló fototróf, oxigént nem termelő baktériumok közül elsősorban azok anaerob képviselőit ismertük (anaerob zöldbaktériumok, bíborbaktériumok, stb.). 2000-ben fedezték fel, hogy az aerob életmódot folytató, anoxigenikus fényhasznosító baktériumok (AAP) nagy abundanciával fordulnak elő a világ tengereiben, óceánjaiban (KOLBER *et al.*, 2000). Detektálásukat az ez tette lehetővé, hogy a fluoreszcens mikroszkóp képalkotását kiterjesztették az infravörös tartományba, amely révén láthatóvá vált a sejtek infravörös autofluoreszcenciája. Az AAP szervezetek a közeli infravörös tartományban (800-900 nm) képesek a fény hasznosítására a bakterioklorofill tartalmuk révén (KOLBER *et al.*, 2000, KOLBER *et al.*, 2001). Anyagcseréjükre alapvetően kemoorganoheterotróf életmód jellemző: energiaszükségletüket (ATP-termelés), valamint a redukáló erőt (redukált koenzimek, pl. $\text{NADH}+\text{H}^+$ termelése) szerves anyagokra alapozva fedezik és hasonlóképp szénforrásként is szerves szubsztrátokra van szükségük, minthogy az algákkal szemben a szerves szén megkötésére nem képesek (KOBÍZEK *et al.*, 2010). Fényenergia hasznosító képességük révén (ciklikus fotofoszfóriláció) ugyanakkor kiegészítő ATP forrásra tesznek szert. Ez kompetitív előnyt jelent számukra a csak heterotróf anyagcserére képes baktériumokkal szemben (KOBÍZEK *et al.*, 2007). Az óceánokból és tengerekből izolált AAP törzsek filogenetikailag a legtöbb esetben az *Alphaproteobacteria* osztályba tartoztak. Az osztályon belül pedig leginkább a *Roseobacter* és az *Erythrobacter* nemzetség tagjait azonosították (SHIBA *et al.*, 1991; BIEBL *et al.*, 2005).

Kontinentális vizekben kutatásuk csupán az elmúlt évtizedben kezdődött (2008-tól), ez idáig hegyvidéki tavakban, víztározókban és sós sztyepptavakban igazolták az AAP szervezetek jelenlétét (MASINE *et al.*, 2008; MEDOVÁ *et al.*, 2011; CUPEROVÁ *et al.*, 2013). Éppen ezért célunk volt az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok (AAP) előfordulásának és szezonális dinamikájának megismerése a Balaton különböző területein.

Anyag és módszer

Az AAP szervezetek vizsgálatához a Balaton Keszthelyi- és Siófoki-medencéjében mederközépen, vízoszlop mintavevővel gyűjtöttünk mintát 2016. augusztusa és 2015 júliusa között (**1. táblázat**). A hidegebb időszakban havi gyakorisággal, a produktív időszakban (júniustól októberig) kétheti gyakorisággal történt vízmintavétel. Mindemellett 2014 augusztusában a tó hossz tengelyében 5 mintavételi ponton végeztünk algológiai vizsgálatokat (**1. táblázat**). A mintavétel után 5 órán belül meghatároztuk a fotoautotróf pikofitoplankton (pikocianobaktériumok és a pikoeukarióta zöldalgák) abundanciáját

Aerob anoxigenikus fototróf baktériumok mennyisége és szezonális dinamikája

epifluoreszcens mikroszkóppal, valamint az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok (továbbiakban AAP szervezetek) abundancia és biomassza értékeit infravörös epifluoreszcens mikroszkópi technikával.

1. táblázat. A mintavételi helyek koordinátái és a mintavétel gyakorisága.

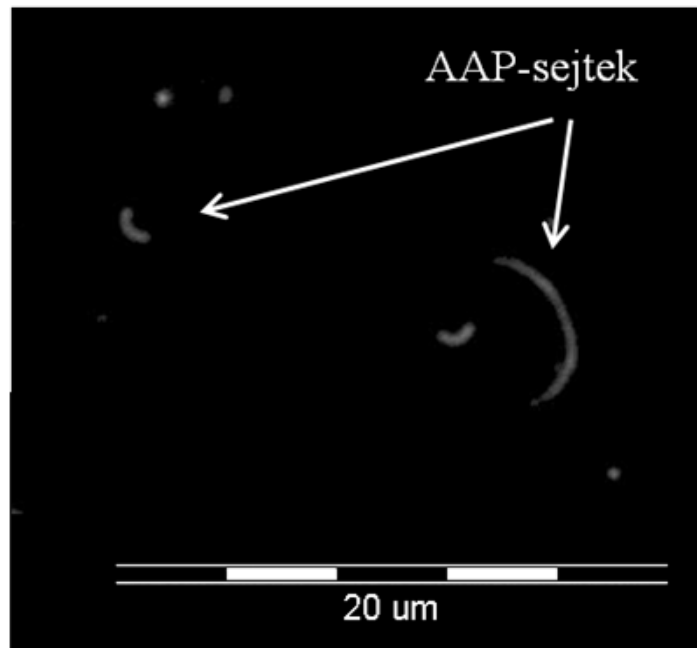
Mintavételi hely	Koordináták	Mintavétel ideje és gyakorisága
Keszthelyi-medence	46°44'05.8"N; 17°16'32.0"E	2014.08.13.-2015.07.23. kétheti/havi
Szigligeti-medence	46°44'33.1"N; 17°26'18.5"E	2014.08.13.
Szemesi-medence	46°50'40.3"N; 17°44'28.8"E	2014.08.13.
Siófoki-medence (T)	46°55'19.0"N; 17°55'53.6"E	2014.08.13.-2015.07.23. kétheti/havi
Siófoki-medence (Bf)	46°57'54,7"N; 18°03'48.8"E	2014.08.13.

A vizsgált fototrófok abundanciáját a sejtek autofluoreszcenciája révén becsültük JIAO *et al.* (2006), valamint MACISAAC és STOCKNER (1993) szerint. A vízmintákat 0,2 µm pórusméretű, fehér polikarbonát membránfilterre (Millipore) szűrtük, majd a szűrőpapírt glicerinbe ágyaztuk és a preparátumot Olympus BX51 epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk 1000x nagyítás mellett. Először a különböző pigment típusú pikoalgákat azonosítottuk kékesibolya (U-MWBV2) és zöld (U-MWG2) gerjesztőfény segítségével, a látható fényt érzékelő mikroszkóp kamerával (Olympus DP71) MACISAAC és STOCKNER (1993) szerint. A következő lépésben az AAP szervezeteket detektáltuk kék gerjesztőfényt alkalmazva (350-550 nm), infravörös emissziós filter (>780 nm) és infravörös kamera (Olympus XM10) segítségével (JIAO *et al.*, 2006). Az AAP szervezetek gerjesztése során alkalmazott fény hatására a pikoalgák is mutatnak közeli infravörös autofluoreszcenciát, amely kizárólag az infravörös kép elemzése révén nem különíthető el az AAP szervezetek autofluoreszcenciájától. Éppen ezért az AAP szervezetek és a pikoalgák elkülönítése az egyazon látótérről a két különböző kamerával készített felvétel (minimum 10 látótér v. 300 sejt) összevetése alapján történt Cell^D szoftverrel (a hagyományos kamerával csak a pikoalgák láthatóak, az infravörös kamerával a pikoalgák és az AAP szervezetek is láthatóak voltak). A mikroszkópos képek további elemzését Zeder és munkatársai által 2011-ben kidolgozott YABBA-2011 kép-analizáló szoftver segítségével.

Meghatároztuk továbbá a barna színű oldott szerves anyagok (Pt szín) koncentrációját, amelyet 45 µm pórusátmérőjű filterre szűrés, majd szárítás után a fényelnyelés mérésével kaptunk meg. Az a-klorofill koncentrációt frissen szűrt mintából, forró metanolos extrakciót követően szintén spektrofotométer (Hitachi U-2900) segítségével határoztuk meg (NÉMETH, 1998).

Eredmények és értékelésük

A Balatonban számos AAP szervezetet detektálunk infravörös mikroszkópi technika alkalmazásával, a detektált szervezetek között elsősorban a vibrió, illetve a hajlított fonal sejtek voltak jellemző (1. ábra).

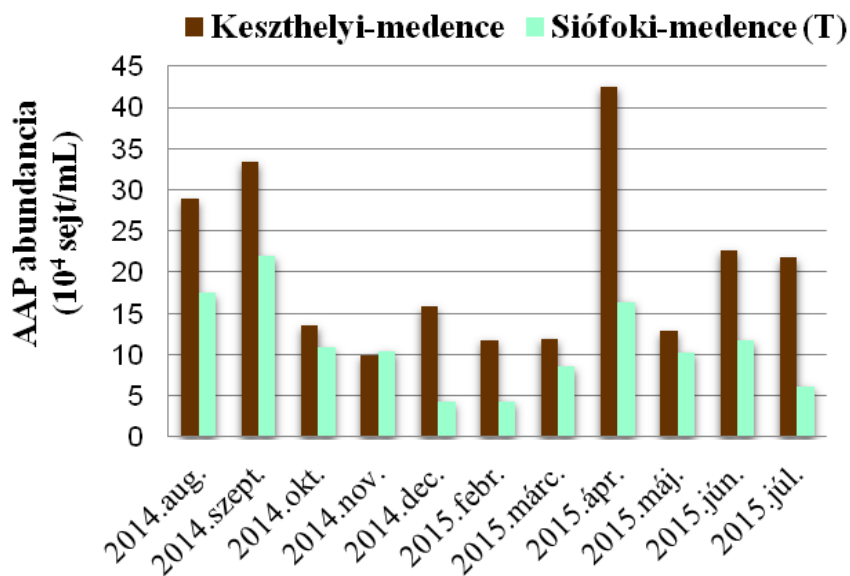


1. ábra. A Balatonban megfigyelt AAP szervezetek mikroszkópi képe. A sejteket nyilak jelölik, a felvétel infravörös kamerával (Olympus XM10), 1000 x-es nagyítással készült.

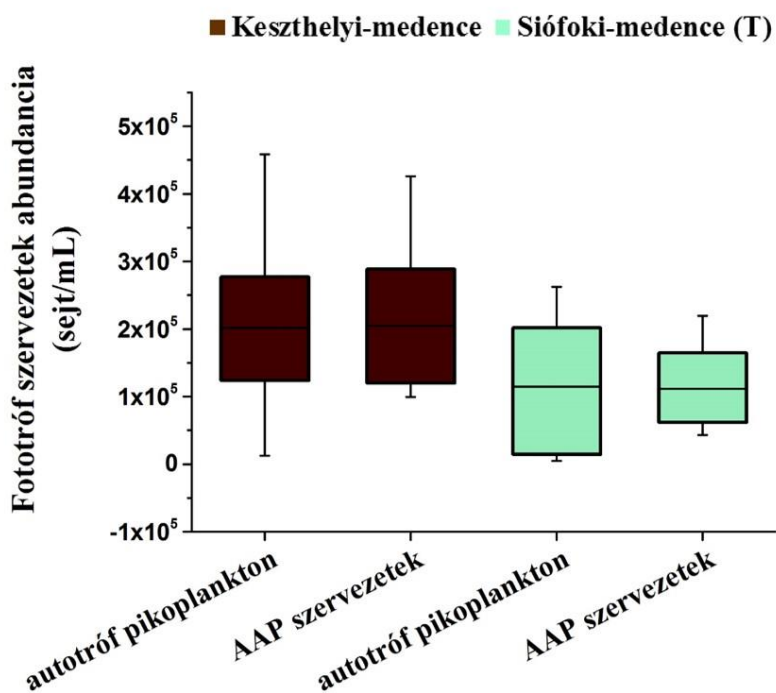
Az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok mennyisége jellegzetes szezonális dinamikát mutatott a Balaton Keszthelyi-és Siófoki-medencéjében egyaránt (**2. ábra**). Mindkét medence esetében a magasabb abundancia értékeket melegebb időszakban figyeltük meg. A Keszthelyi-medencében az AAP szervezetek abundanciája $9,9 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} és $42 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} között változott, átlagosan $20 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} volt. A legmagasabb abundancia értéket áprilisban figyeltük meg, míg a legalacsonyabbat novemberben (**2. ábra**). A Siófoki-medencében az AAP szervezetek abundanciája $4 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} és $22 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} között változott, átlagosan $11 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} volt. A legmagasabb abundancia értéket szeptemberben figyeltük meg, míg a legalacsonyabbat decemberben (**2. ábra**). Az AAP szervezetek eloszlása jellegzetes szezonális dinamikát követett, ennek ellenére nem volt szignifikáns összefüggés a víz hőmérséklet és az AAP abundancia között.

A kapott abundancia értékeket összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a Siófoki-medencében az AAP szervezetek mennyisége körülbelül a fele volt a Keszthelyi-medencében megfigyeltnek (**3. ábra**). Az AAP szervezetek mennyisége összevethető volt az autotróf pikoplanktonéval. A Keszthelyi-medencében ugyanis a pikoalgák abundanciája $1,2 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} és $45,8 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} között változott, átlagosan $20 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} volt. A Siófoki-medencében $0,5 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} és $26,2 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} közötti abundancia értékeket tapasztaltunk, a pikoalgák abundanciája átlagosan $11,5 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} volt (**3. ábra**).

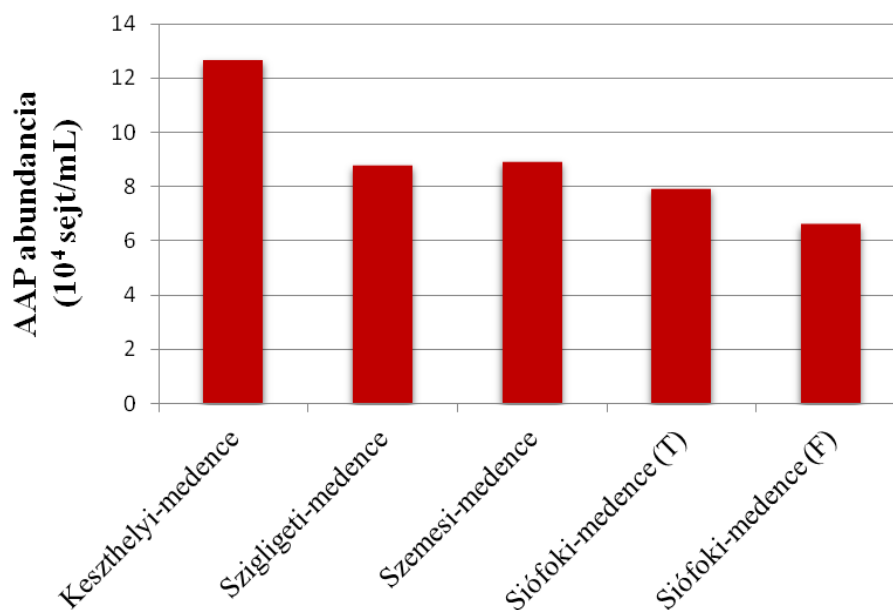
2014 augusztusában az AAP abundancia jellegzetesen változott a tó hossz tengelyében. A legmagasabb értéket a Keszthelyi-medencében tapasztaltuk, ahol mennyiségük meghaladta a 120 ezer sejtet milliliterenként. A Szigligeti- és a Szemesi-medencében alacsonyabb ($8,7 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} , illetve $8,9 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1}) értékeket tapasztaltunk. A Siófoki-medencében pedig még kisebb értékeket kaptunk: a tihanyi mintavételi ponton az AAP szervezetek abundanciája $8 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} , míg a balatonfüzfői mintavételi ponton $7 \cdot 10^4$ sejt ml^{-1} volt (**4. ábra**).



2. ábra: Aerob anoxigenikus fototróf baktériumok szezonális dinamikája a Balatonban.



3. ábra: Az autotróf pikoplankton és az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok bundanciája a Keszthelyi- és a Siófoki-medencében.



4. ábra: Az aerob anoxigenikus fototróf baktériumok (AAP) abundanciája a Balaton hossz tengelye mentén.

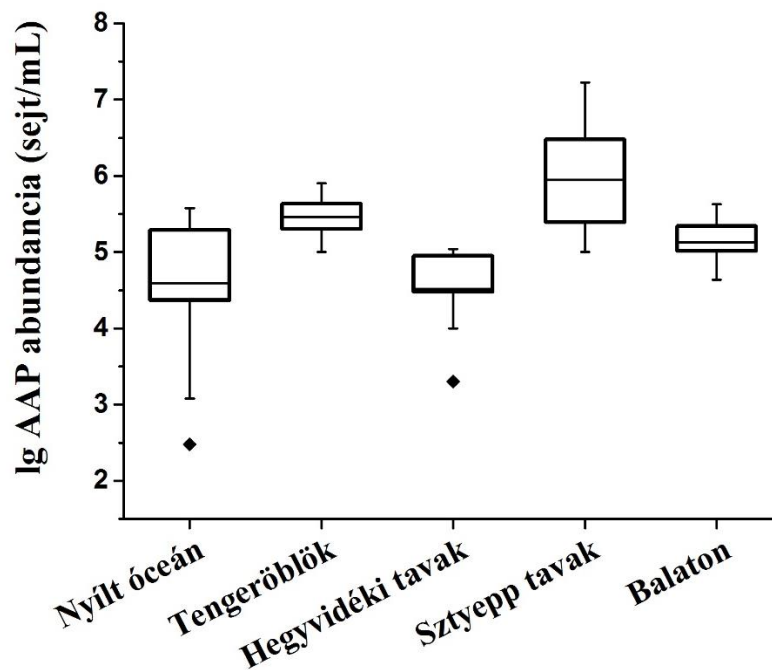
Az AAP szervezetek jellegzetes területi eloszlásának hátterében a tó hossz tengelye mentén megfigyelhető nyugat-kelet irányú trofikus grádiens, valamint a szintén nyugat-kelet irányban csökkenő barna színű oldott szerves anyagok (humanyag) mennyisége állhat. A fotoheterotróf életmódot folytató AAP szervezeteknek ugyanis szükségük van szerves szénforrásra, amelyet vagy az algák és azok bomlástermékei vagy a vízben oldott szerves anyagok szolgáltathatnak. A tó nyugati területein a-klorofill koncentráció jelentősen magasabb volt (11,6-11,8 $\mu\text{g l}^{-1}$), mint a Szemesi-medencében (6,5 $\mu\text{g l}^{-1}$) és a Siófoki-medencében (5-8,6 $\mu\text{g l}^{-1}$; **2. táblázat**). A barna színű oldott szerves anyagok (Pt szín) koncentrációja szintén a nyugati területeken volt magasabb: a Keszthelyi-medencében 11 mg Pt l^{-1} , a Szigligeti-medencében 8 mg Pt l^{-1} értéket mértünk, míg a Szemesi-és a Siófoki-medencén már csak 4-5 mg-ot literenként **2. táblázat**). A nyugati medencékben tehát nagyobb mennyiségben áll rendelkezésre szerves anyag, amely a fototróf baktériumok (AAP) számára alapvető szubsztrátként szolgál.

2. táblázat: Az a-klorofill és a barna színű oldott szerves anyagok (Pt szín) koncentrációja a Balaton medencéiben 2014. augusztusában.

	a-klorofill koncentráció ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Pt szín koncentráció (mg Pt l^{-1})
Siófoki-medence (T)	5	4
Siófoki-medence (F)	8,6	4
Szemesi-medence	6,5	5
Szigligeti-medence	11,8	8
Keszthelyi-medence	11,6	11

Aerob anoxigenikus fototróf baktériumok mennyisége és szezonális dinamikája

Irodalmi adatok alapján az AAP szervezetek abundanciája a nyílt óceánokban 3×10^2 és 1.94×10^5 sejt ml^{-1} között volt (SCHWALBACH & FUHRMAN, 2005; LAMI *et al.*, 2007). A hegyvidéki tavakban, CUPEROVA *et al.* (2013) hasonló abundancia értékeket tapasztaltak (1×10^3 - 1.3×10^5 sejt ml^{-1}). Magasabb értékeket (1×10^5 - 5.1×10^5 sejt ml^{-1}) közöltek tengeröblökben (WADNER & KIRCHMAN, 2007), valamint a Nyugat- Szibéria déli részén elterülő sós sztyepptavakban, ahol mennyiségük 10×10^5 sejt ml^{-1} és 170×10^5 sejt ml^{-1} között volt (MEDOVÁ *et al.*, 2011) (5. ábra). Az általunk kapott értékeket összevetve az irodalomban közöltekkel azt tapasztaltuk, hogy a Balatonban az AAP szervezetek abundanciája nagyságrendileg a tengeröblökben leírtakhoz hasonló volt. Ennél kisebb értékeket írtak le hegyvidéki tavakban (CUPEROVA *et al.*, 2013), viszont sztyepptavakban magasabb értékeket is közöltek (MEDOVÁ *et al.*, 2011).



5. ábra: A nyílt óceánokban, tengeröblökben, hegyvidéki- és sztyepptavakban közölt AAP abundancia értékek összevetve a Balatonban kapott értékekkel.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az OTKA PD 112449 projekt támogatta, Köszönet illeti Németh Balázst, Dobos Gézát terepi mintavételezés során nyújtott segítségéért, valamint Szabó Tímeát a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségéért.

Irodalomjegyzék

BIEBL, H., M. ALLGAIER, H. LUNSDORF, R. PUKALL, B.J. TINDALL & I. WAGNER-DOBLER, 2005. *Roseovarius mucosus* sp. nov, a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 2377-2383.

- ČUPEROVÁ, Z., E. HOLZER, I. SALKA, R. SOMMARUGA & M. KOBLÍZEK, 2013. Temporal Changes and Altitudinal Distribution of Aerobic Anoxygenic Phototrophs in Mountain Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 6439-6446.
- JIAO, N., Y. ZHANG & Y. CHEN, 2006. Time series observation based InfraRed Epifluorescence Microscopic (TIREM) approach for accurate enumeration of bacteriochlorophyll-containing microbes in marine environments. *Journal of Microbiological Methods* **65**: 442-452.
- KOLBER, Z. S., C. L. VAN DOVER, R. A. NIEDERMAN & P. G. FALKOWSKI, 2000. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407**: 177-179.
- KOLBER, Z. S., F. G. PLUMLEY, A. S. LANG, J. T. BEATTY, R. E. BLANKENSHIP, C. L. VAN DOVER, *et al.*, 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292**: 2492-2495.
- KOBLÍZEK, M., J. MLCOUKOVÁ, Z. KOLBER & J. KOPECKY, 2010. On the photosynthetic properties of marine bacterium COL2P belonging to Roseobacter clade. *Archives of Microbiology* **192**: 41-49.
- LAMI, R., T. M. COTTRELL, J. RAS, O. ULLOA, I. OBERNOSTERER, H. CLAUSTRE, D. L. KIRCHMAN & P. LEBARON, 2007. High Abundances of Aerobic Anoxygenic Photosynthetic Bacteria in the South Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4198-4205.
- MACISAAC, E. A. & J. G. STOCKNER, 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence, In: Kemp, P. F., B. F. Sherr, E. B. Sherr & J. J. Cole (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: 187-197.
- SCHWALBACH, M. S. & J. A. FUHRMAN, 2005. Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnology and Oceanography* **50**: 620-628.
- MEDOVÁ, H., E. N. BOLDAREVA, P. HROUZEK, S. V. BORZENKO, Z. B. NAMSARAEV, V. M. GORLENKO, B. B. NAMSARAEV & M. KOBLÍZEK, 2011. High abundances of aerobic anoxygenic phototrophs in saline steppe lakes. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 393-400.
- SHIBA, T., 1991. *Roseobacter litoralis* gen. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Systematic and Applied Microbiology* **14**: 140-145.
- WIDNER, L. A. & D. L. KIRCHMAN, 2007. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria Attached to Particles in Turbid Waters of the Delaware and Chesapeake Estuaries, *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3936-3944.
- ZEDER, M., E. KOHLER, L. ZEDER, & J. PERNTHALER, 2011. A novel algorithm for the determination of bacterial cell volumes that is unbiased by cell morphology. *Microscopy and Microanalysis* **17**: 799-809.

Érkezett: 2016. október 28
Javítva: 2016. december 01
Elfogadva: 2016. december 06