

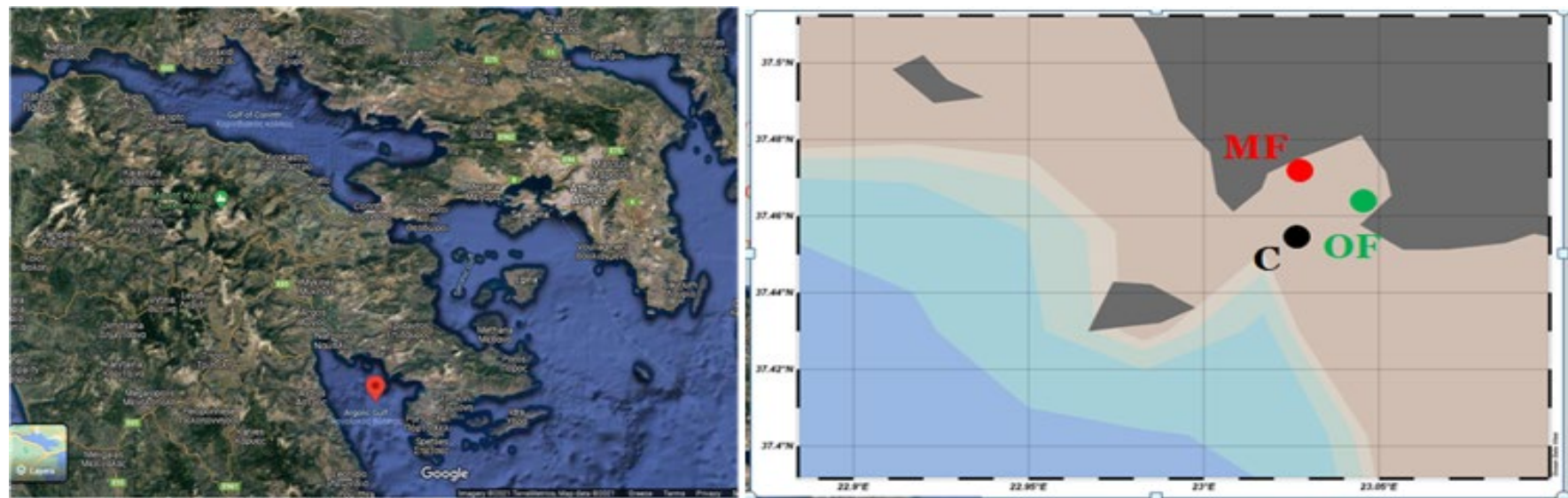
Μελέτη του ημερήσιου κύκλου των πλαγκτονικών μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβάλλον υδατοκαλλιεργειών

Περίληψη

Η ημερήσια μεταβλητότητα στη σύνθεση προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κοινοτήτων μελετήθηκε υπό την επίδραση της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας χρησιμοποιώντας ανάλυση DNA μεταγραφικοδοκιοποίησης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε 3 χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της ημέρας (πρωί, μεσημέρι, βράδυ), από ένα σταθμό μάρτυρα, ένα σταθμό με ένα κλωβό και ένα σταθμό με πολλούς κλωβούς ψαριών. Η αυξημένη υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα οδήγησε σε αλλαγές στη σύνθεση των ελεύθερων και προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτικών κοινοτήτων, με ευκαιριακά στελέχη να «αντικαθιστούν» στελέχη που δεν είναι προσαρμοσμένα σε υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών κοντά στους κλωβούς. Η ημερήσια μεταβλητότητα βρέθηκε σε προσκολλημένους σε σωματίδια προκαρυώτες και πιθανώς να σχετίζεται με την άμεση εξάρτησή τους από σωματιδιακή οργανική ύλη που παράγεται και απελευθερώνεται σε διαφορετικούς ημερήσιους ρυθμούς από το φυτοπλαγκτόν και τις υδατοκαλλιεργείες. Το μεσοζωοπλαγκτόν και οι πικο- και νανο-ευκαρυώτες και μύκητες επηρεάστηκαν από την υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα. Αρκετά φύλα ζωοπλαγκτού που πραγματοποιούν ημερήσια κατακόρυφη μετανάστευση εμφάνισαν μέγιστη συνεισφορά στα επιφανειακά ύδατα τη νύχτα. Τα μικρά διάτομα συνεισέφεραν λιγότερο στους σταθμούς με υδατοκαλλιεργεία, ενώ τα δινομαστιγώματα συνεισέφεραν λιγότερο σε όλους τους σταθμούς τη νύχτα. Η περαιτέρω εξερεύνηση των παρατηρούμενων χωροχρονικών προτύπων θα βελτιώσει την κατανόησή μας για τον κύκλο των θρεπτικών ουσιών και τη λειτουργία υδατοκαλλιεργειών-περιβάλλοντος.

Εισαγωγή

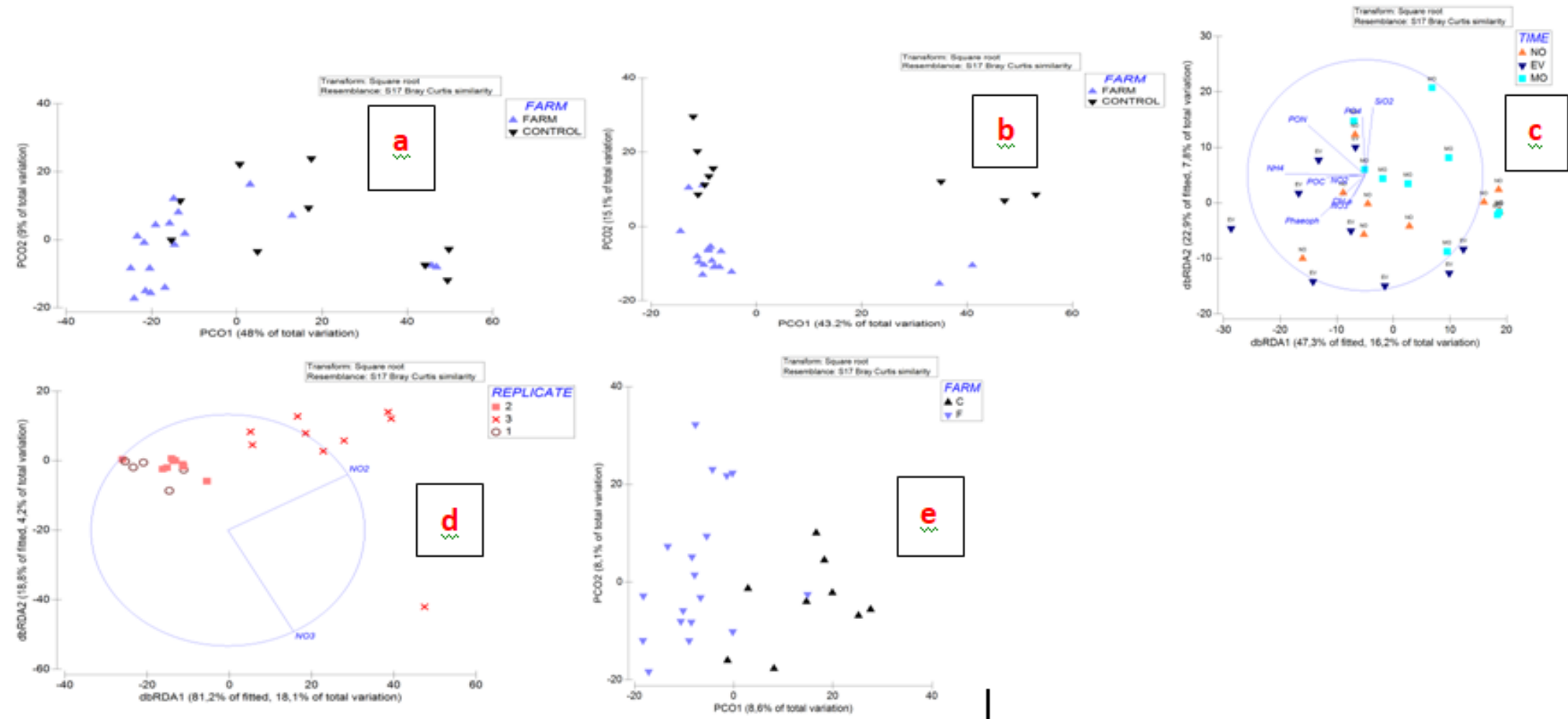
Οι μικροβιακές κοινότητες είναι εξαιρετικά δυναμικές και αλλάζουν σε διάφορες χωροχρονικές κλίμακες. Αρκετά βιολογικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζουν διακυμάνσεις σε ημερήσιους, μηνιαίους, εποχιακούς και ετήσιους κύκλους. Οι ημερήσιες διακυμάνσεις οφείλονται κυρίως στις αλλαγές στην ένταση του φωτός και στο μήκος κύματος, αλλά και σε αλλαγές στη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και χλωροφύλλης, στη θερμοκρασία, στη διάρκεια της ημέρας και στην παρουσία άλλων οργανισμών. Για παράδειγμα, η ποικιλομορφία της προκαρυωτικής κοινότητας, ο μεταβολισμός και η ποσότητα των μεταγράφων που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση ήταν υψηλότερα κατά τη διάρκεια της νύχτας (Gilbert et al., 2010· Vislova et al., 2019) και παρομοίως, τα βακτήρια που προσκολλώνται σε σωματίδια βρέθηκαν πιο ενεργά και άφθονα κατά τη διάρκεια της νύχτα στη Μεσόγειο (Ghiglione et al., 2007; Ruiz-González et al., 2012). Η παραγωγή φωτοσυνθετικής χρωστικής και η κυτταρική διαίρεση κορυφώθηκαν τη νύχτα σε μια τοποθεσία στον Ειρηνικό (Becker et al., 2021; Hu et al., 2018). Έχουν παρατηρηθεί διάφορα μοτίβα για τα βλεφαριδωτά στη Μεσόγειο (Pérez et al., 2000). Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι να περιγράψει τις ημερήσιες διακυμάνσεις σε όλες τις μικροβιακές ομάδες για πρώτη φορά σε περιβάλλον υδατοκαλλιεργείας με ανάλυση DNA μεταγραφικοδοκιοποίησης. Μελετήσαμε την προκαρυωτική και την ευκαρυωτική ποικιλομορφία σε τρία χρονικά σημεία μέσα στην ημέρα και προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε τις μεταβολές της ποικιλομορφίας με διαλυμένα και σωματιδιακά θρεπτικά που εισρέουν από τις υδατοκαλλιεργείες.



Εικόνα 1. Ο χάρτης της δειγματοληψίας και οι συντεταγμένες των σταθμών

Υλικά και Μέθοδοι

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση DNA μεταγραφικοδοκιοποίησης σε πολλαπλά δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από περιβάλλον υδατοκαλλιεργειών (Αργολικός κόλπος, Βουρλιάς) τον Ιούνιο-Ιούλιο 2017 στο R/V Philia στο πλαίσιο του έργου TAPAS (<http://tapas-h2020.eu/>). Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε τρεις στιγμές της ημέρας (πρωί, μεσημέρι, βράδυ) σε τρεις σταθμούς: ένας ανεπηρέαστος (Control), ένας με έναν κλωβό (One Farm) και ένας με πολλούς κλωβούς (Multiple Farms). Προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε για τρεις ημέρες. Ενισχύθηκαν περιοχές των γονιδίων 16S και 18S rRNA και της περιοχής ITS για την ανίχνευση των βακτηρίων, ευκαρυωτών και μυκήτων αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν (Illumina/MiSeq) υπέστησαν την κατάλληλη επεξεργασία και ομαδοποιήθηκαν σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) με 98% ομοιότητα μέσω της PEMA v.2.1.4. (Zafeiropoulos et al., 2021), που προσφέρεται από τη συστοιχία υπολογιστών υψηλής απόδοσης Zorbas του ΙΘΑΒΒΥΚ-ΕΛΚΕΘΕ. Σημαντικές διαφορές στη σύνθεση της κοινότητας σε επίπεδο είδους ελέγχθηκαν με PERMANOVA χρησιμοποιώντας τους παράγοντες «υδατοκαλλιεργεία» (Farm, Control), «τύπος υδατοκαλλιεργείας» (C, OF, MF) και «ώρα της ημέρας» (πρωί, μεσημέρι, βράδυ). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCO για την ομαδοποίηση των δεδομένων. Η ανάλυση dbRDA χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν η διακύμανση των βιολογικών δεδομένων εξηγήθηκε από τα αβιοτικά δεδομένα.



Εικόνα 2. Διάγραμμα PCO, όπου φαίνεται η διαφοροποίηση στη σύνθεση των ελεύθερων (a) και προσκολλημένων σε σωματίδια (b) προκαρυωτικών κοινοτήτων και μυκήτων (e). Τα χρώματα αντιπροσωπεύουν τον τύπο των σταθμών. Διάγραμμα dbRDA του γραμμικού μοντέλου των αβιοτικών παραμέτρων προσαρμοσμένων στη σύνθεση των κοινοτήτων των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών (c) και μεσοζωοπλαγκτού (d). Το μήκος και η κατεύθυνση των διανυσμάτων υποδεικνύουν τη σχετική ισχύ και την κατεύθυνση της σχέσης στο διάγραμμα.

Αποτελέσματα

Οι κοινότητες των ελεύθερων προκαρυωτών (επίπεδο είδους) διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ σταθμών Farm και C και μεταξύ C, OF και MF (PERMANOVA, $p < 0.05$). Οι κοινότητες των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών (επίπεδο είδους) διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ Farm και C και στις στιγμές της ημέρας (πρωί, μεσημέρι και βράδυ) (PERMANOVA, $p < 0.05$). Η συμβολή του SAR11 clade κυμαινόταν μεταξύ 19-41% στο C, 5-19% στο OF και 5-6% στο MF, ενώ το αντίθετο μοτίβο παρατηρήθηκε για την οικογένεια Rhodobacteraceae (21-48% στο C, 61-82 στο OF και 78-81% στο MF). Στο κλάσμα των προσκολλημένων σε σωματίδια προκαρυωτών, παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο αλλά είχε ηπιότερη ένταση. Περίπου το 24% της μεταβλητότητας των ελεύθερων προκαρυωτών εξηγήθηκε από τις συγκεντρώσεις PON, NO₃, NO₂ και NH₄, ενώ περίπου το 27% της μεταβλητότητας των προσκολλημένων σε σωματίδια από POC, PON και NH₄ (dbRDA, $p < 0.05$). Οι κοινότητες μεσο-ζωοπλαγκτού, καθώς και οι κοινότητες πικο- και νανο-ευκαρυωτών (επίπεδο είδους) διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των σταθμών C, OF και MF (PERMANOVA, $p < 0.05$), ενώ η ημέρα δειγματοληψίας ήταν επίσης σημαντική. Όσον αφορά το μεσοζωοπλαγκτόν, ενώ η ώρα της ημέρας δεν ήταν σημαντική για ολόκληρη την κοινότητα, αρκετά φύλα ζωοπλαγκτού εμφάνισαν ημερήσιο μοτίβο (π.χ. η συνεισφορά των αρθροπόδων αυξανόταν το βράδυ στις τοποθεσίες MF). Η συνεισφορά των μικρών Δινομαστιγωτών μειώθηκε από το πρωί έως το μεσημέρι και περαιτέρω έως το βράδυ. Τα μικρά Διάτομα εμφάνισαν μέγιστη συνεισφορά το μεσημέρι και βράδυ και χαμηλότερη συνεισφορά στους Farm. Οι κοινότητες των μυκήτων (επίπεδο είδους) διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ των σταθμών C και Farm και μεταξύ C, OF και MF (PERMANOVA, $p < 0.05$). Μεγάλο μέρος των αλληλουχιών (65-85%) δεν ταξινομήθηκαν. Περίπου το 14% της μεταβλητότητας της σύνθεσης των κοινοτήτων των μυκήτων εξηγήθηκε από τον συνδυασμό POC, PON, NH₄, NO₂ και PO₄ (dbRDA, $p < 0.05$).

Συμπεράσματα

Η γνώση της σύνθεσης μιας κοινότητας μικροβιακού πλαγκτού μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τη λειτουργία και την απόδοση ενός δεδομένου περιβάλλοντος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιοχές υδατοκαλλιεργείας που αντιμετωπίζουν σημαντικά προβλήματα βιωσιμότητας στις μέρες μας λόγω των σημαντικών ποσοτήτων θρεπτικών συστατικών που απελευθερώνονται σε καθημερινή βάση. Η μελέτη μας έδειξε ότι η προκαρυωτική κοινότητα (τόσο σε ελεύθερη όσο και σε προσκολλημένη σε σωματίδια μορφή) ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των σταθμών Control και Farm. Τάξα που είναι γνωστά για την ευκαιριακή τους συμπεριφορά (Rhodobacteraceae) επικρατούσαν κοντά στους κλωβούς, ενώ τα ολιγοτροφικά είδη (Pelagibacter) αυξήθηκαν σε συνεισφορά μακριά από τους κλωβούς. Αυξημένη συνολική προκαρυωτική ποικιλομορφία παρατηρήθηκε κοντά σε κλουβιά ψαριών, με έντονα επίπεδα εντός του φύλου Cyanobacteria. Η ώρα της ημέρας φαινόταν να επηρεάζει τους προσκολλημένους σε σωματίδια προκαρυώτες, καθώς και κάποια φύλα ζωοπλαγκτού (αλλά όχι ολόκληρη την κοινότητα). Η ευκαρυωτική κοινότητα διέφερε επίσης ως προς την υδατοκαλλιεργεία. Οι κοινότητες μεσοζωοπλαγκτού διαφοροποιήθηκαν την τρίτη ημέρα δειγματοληψίας, κάτι που πιθανώς σχετίζεται με περιβαλλοντικές παραμέτρους που άλλαξαν (π.χ. κυκλοφορία του νερού και θερμοκρασία). Όσον αφορά τις κοινότητες των μυκήτων, ένα μεγάλο ποσοστό OTUs δεν ταξινομήθηκε. Σε όλα τα σύνολα δεδομένων επικράτησε συσχέτιση με ανόργανες και οργανικές μορφές αζώτου.

Αναφορές

1. Becker, K.W., Harke, M.J., Mende, D.R., Muratore, D., et al. 2021. Combined pigment and metatranscriptomic analysis reveals highly synchronized diel patterns of phenotypic light response across domains in the open oligotrophic ocean. *ISME J.* 15, 520–533. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00793-x>
2. Davis, C., Lohan, M.C., Tuena, R., Cerdan-Garcia, E., Woodward, E.M.S., et al. 2019. Diurnal variability in alkaline phosphatase activity and the potential role of zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* Lett. 4, 71–78
3. Ghiglione, J.F., Mével, G., Pujo-Pay, M., Mousseau, L., Lelarge, P., et al. 2007. Diel and seasonal variations in abundance, activity, and community structure of particle-associated and free-living bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* 54, 217–231. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9189-7>
4. Gilbert, J., Field, D., Swift, P., Thomas, S., Cummings, D., et al. 2010. The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: A “multi-omic” study of seasonal and diel temporal variation. *PLoS One* 5
5. Hu, S.K., Connell, P.E., Mesrop, L.Y., Caron, D.A., 2018. A Hard Day's night: Diel shifts in microbial eukaryotic activity in the North Pacific Subtropical Gyre. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00351>
6. Pérez, M.T., Dolan, J.R., Vidussi, F., Fukai, E., 2000. Diel vertical distribution of planktonic ciliates within the surface layer of the NW Mediterranean. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res.* Pap. 47, 479–5
7. Ruiz-González, C., Lefort, T., Massana, R., Simó, R., Gasol, J.M., 2012. Diel changes in bulk and single-cell bacterial heterotrophic activity in winter surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 57, 29–42. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.1.0029>
8. Vislova, A., Sosa, O.A., Eppley, J.M., Romano, A.E., DeLong, E.F., 2019. Diel Oscillation of Microbial Gene Transcripts Declines With Depth in Oligotrophic Ocean Waters. *Front. Microbiol.* 10. Wang, Y., Sen, B., He, Y., Xie, N., Wang, G., 2018. Spatiotemporal distribution and assemblages of planktonic fungi in the 9. coastal waters of the Bohai Sea. *Front. Microbiol.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00584>
10. Zafeiropoulos, H., Gioti, A., Ninidakis, S., Potirakis, A., Paragkaman, S., et al. 2021. 0s and 1s in marine molecular research: A regional HPC perspective. *Gigascience* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab053>