

# Microbiële diversiteit in aquatische ecosystemen: stand van zaken van het onderzoek in Vlaanderen

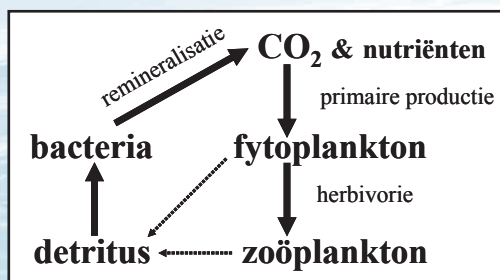
<sup>1</sup> Katholieke Universiteit Leuven, Campus Kortrijk, Lab. Biologie  
<sup>2</sup> Universiteit Gent, Lab. Protistologie & Aquatische Ecologie  
<sup>3</sup> Institut für Terrestrische Ökologie, Zürich, Switzerland  
<sup>4</sup> Katholieke Universiteit Leuven, Lab. Aquatische Ecologie

Het onderzoek naar de diversiteit van bacteria in aquatische ecosystemen kreeg een extra impuls na de ontwikkeling van moleculaire technieken zoals PCR, DGGE analyse en DNA sequentieanalyse, en de algemene toepassing ervan in een aquatische omgeving, inmiddels ongeveer 15 jaar geleden. Dit artikel wil een overzicht geven van de stand van zaken van het onderzoek naar de diversiteit van aquatische bacteria in ondiepe meren in Vlaanderen en hun relatie tot het ecosysteem. Monitoringstudies in diverse natuurgebieden leverden een gedetailleerd beeld van de ruimtelijke en seizoenselijke verschillen in bacteriële gemeenschappen in Vlaamse ondiepe meren. Multivariate analyse van deze monitoringdata en experimenten met natuurlijke microbiële gemeenschappen lieten toe het relatieve belang van 'bottom-up' (omgevingscondities) en 'top-down' (predatie) processen op de diversiteit van microbiële gemeenschappen in the schatten.

## Wat is de rol van aquatische bacteria?

In tegenstelling tot op het land worden de belangrijkste ecosysteemprocessen in het water uitgevoerd door microscopische organismen (Figuur 1). Het ééncellige fytoplankton vervult bijvoorbeeld de rol van planten terwijl het nauwelijks grotere zoöplankton de rol vervult van de grazers of herbivoren. De rol van schimmels of fungi op het land als opruimers van dood materiaal of detritus wordt in het water vervuld door aquatische bacteria. Aquatische bacteria breken dood detritus afkomstig van andere organismen af tot CO<sub>2</sub>. Tijdens dit proces remineraliseren ze anorganische nutriënten zoals stikstof en fosfor die gebonden zijn aan het organisch materiaal en maken ze deze opnieuw beschikbaar voor het fytoplankton. In deze tekst willen we een overzicht geven van het onderzoek naar de biodiversiteit van deze aquatische bacteria in Vlaanderen. Dit onderzoek werd uitgevoerd in een samenwerking tussen de Universiteit Gent (Lab. voor Protistologie & Aquatische Ecologie) en de Katholieke Universiteit Leuven (Lab. voor Aquatische Ecologie).

Figuur 1: Overzicht van de voornaamste ecosysteemprocessen en de organismen die hierbij betrokken zijn in een aquatisch ecosysteem.



## Een jong onderzoeksdomein

De studie van de diversiteit van aquatische bacteria is een relatief jong onderzoeksdomein. Dit is vooral te wijten aan het feit dat tot aan het

begin van de jaren 1990 de technieken om de diversiteit van aquatische bacteria te bestuderen beperkt waren. Bacteria bezitten bijzonder weinig bruikbare morfologische kenmerken. Daarom is het onmogelijk om bacteria met behulp van een microscoop te identificeren, laat staan met het blote oog. Tot begin jaren 1990 werden bacteria geïdentificeerd door hun fysiologische eigenschappen te bepalen. Dit vereiste het opkweken van bacteria op diverse artificiële media. Slechts een beperkte fractie van de aquatische bacteria kan echter gekweekt worden op artificiële media. Hierdoor bleef het merendeel van de aquatische bacteria ongekend.

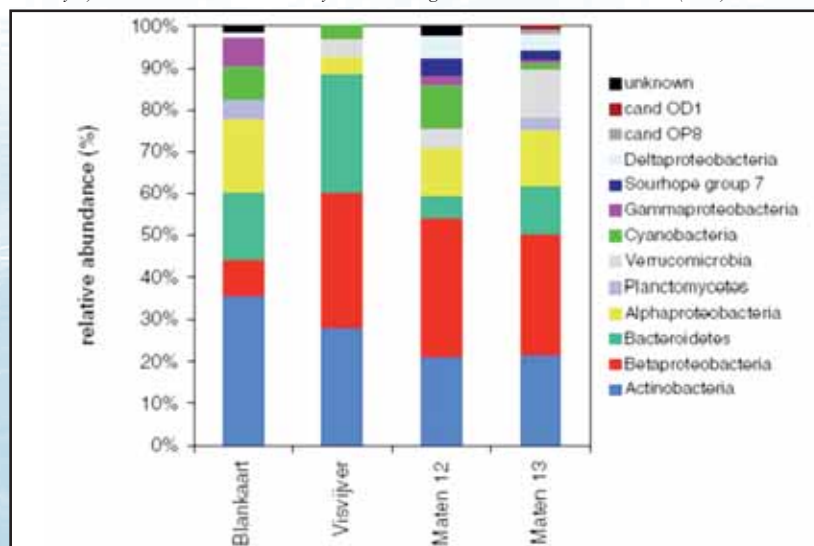
In begin jaren 1990 ontwikkelde de Nederlander Gerard Muyzer genetische technieken voor het bestuderen van de diversiteit van aquatische bacteria (Muyzer et al. 1993). Deze technieken werden tot dan toe vooral gebruikt in de medische sector. Ze maken gebruik van de code in het DNA voor het onderscheiden en identificeren van de verschillende soorten bacteria in een watermonster. Bacteria en hun DNA worden bemonsterd door een bepaalde hoeveelheid water te filteren over een filter met kleine poriëngrootte (0,2 µm). Het DNA op deze filter wordt geëxtraheerd en met behulp van PCR ("Polymerase Chain Reaction") wordt een bepaald fragment van het DNA afkomstig van bacteria vermenigvuldigd. Dit fragment is vaak een stukje uit de DNA code voor het ribosomale DNA. Men kiest hiervoor een stukje uit de ribosomale DNA code dat duidelijk verschilt tussen verschillende soorten bacteria maar dat binnen dezelfde soort identiek is. Men kan deze keuze maken omdat van vele (kweekbare) bacteriestammen genen werden gesequeneerd, en men derhalve weet welke stukken DNA veel variatie vertonen tussen en binnen soorten. De verschillende fragmenten worden vervolgens door middel van elektroforese gescheiden van elkaar. Hierdoor kan het totaal aantal verschillende soorten bacteria in een bepaald monster bepaald worden. De elektroforetische techniek

die hiervoor vaak gebruikt wordt is DGGE of "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". De individuele DNA fragmenten kunnen ook gecloneerd en gesequencet worden ("clone library" analyse). De bekomen sequenties kunnen vervolgens vergeleken worden met sequenties van gekende bacteria in een centrale databank ("GenBank"). Hierdoor kan de identiteit van de bacteria die aanwezig waren in het watermonster achterhaald worden. Door de ontwikkeling van deze moleculaire genetische technieken in het begin van de jaren 1990 werd het onderzoek naar de diversiteit van aquatische bacteria wereldwijd in een stroomversnelling gebracht.

## Ondiepe meren

In Vlaanderen werd vanaf eind jaren 1990 onderzoek uitgevoerd naar de samenstelling van de gemeenschap van aquatische bacteria in ondiepe meren. Ondiepe meren zijn het meest algemene type van meren in laaggelegen gebieden zoals Vlaanderen. Deze meren zijn bijzonder gevoelig voor voedselaanrijking of eutrofiëring. Onder voedselarme omstandigheden worden ondiepe meren gekenmerkt door helder water en een weelderige vegetatie van ondergedoken waterplanten (Scheffer, 1998). De visgemeenschap wordt gedomineerd door predatoren zoals snoek en baars. Deze predatoren vissen houden de populaties van planktivore vissen onder controle. Daardoor kan zoöplankton zoals de *Daphnia* of watervlo dichte populaties opbouwen en de fytoplanktonbiomassa laag houden. Bij eutrofiëring gaan deze ondiepe meren van een heldere toestand over naar een troebele toestand. Visetende vis verdwijnt, waardoor planktivore vis in hoge aantallen kan voorkomen. Deze planktivore vis eet het meeste zoöplankton op, waardoor fytoplankton ongecontroleerd kan groeien. Er treden daarom frequent algenbloeien op, waardoor het water troebel wordt en waterplanten geen kans meer krijgen (zie ook Declerck et al., 2006).

Figuur 2: Samenstelling van de bacteriële gemeenschappen (bepaald aan de hand van een "clone library" analyse) in de vier onderzochte modelsystemen. Overgenomen uit Van der Gucht et al. (2005).



Bij relatief lage nutriëntenconcentraties komen ondiepe meren steeds in een heldere toestand voor, terwijl ondiepe meren met hoge nutriëntenconcentraties vrijwel steeds troebel zijn. Bij tussenliggende nutriëntenconcentraties kunnen ondiepe meren echter zowel in een troebele als heldere toestand voorkomen. De troebele en heldere toestanden worden in dit geval gestabiliseerd door ecologische terugkoppelingsmechanismen (Scheffer et al., 1993; Scheffer 1998; zie ook Declerck et al., 2006). De ecologie en diversiteit van fytoplankton, zoöplankton en vis in heldere versus troebele ondiepe meren was al geruime tijd bijzonder goed gedocumenteerd. Daarentegen was tot voor kort nauwelijks iets gekend over de diversiteit van bacteria in deze ecosystemen.

Om de diversiteit van bacteria in ondiepe meren te onderzoeken werden in Vlaanderen vier modelsystemen geselecteerd. Deze vier modelsystemen waren gelegen in 2 natuurgebieden: De Blankaart in West-Vlaanderen en De Maten in Limburg. De modelsystemen in De Blankaart werden gekenmerkt door bijzonder hoge nutriëntenconcentraties ( $> 100 \mu\text{g}$  totaal fosfaat  $\text{l}^{-1}$ ) terwijl deze in De Maten lagere nutriëntenconcentraties vertoonden ( $< 100 \mu\text{g}$  totaal fosfaat  $\text{l}^{-1}$ ). In elk gebied werden 2 ondiepe meren geselecteerd – een helder en een troebel meer: de heldere Visvijver en de troebele Blankaartvijver in natuurgebied De Blankaart en een heldere en troebele vijver in het natuurgebied De Maten. De twee ondiepe meren in elk natuurgebied zijn telkens gekenmerkt door vergelijkbare nutriëntenconcentraties, verschillen voornamelijk wat betreft hun interne ecologische structuur en niet wat betreft hun voedselrijkdom. De bacteriële diversiteit werd in deze vier modelsystemen gedurende twee jaar in detail opgevolgd. Tegelijkertijd werden een aantal belangrijke parameters opgevolgd die van invloed kunnen zijn op de bacteriële diversiteit, zoals concentraties aan nutriënten, fytoplankton, zoöplankton en predatoren van bacteria. Daarnaast werden in deze modelsystemen bijkomende experimentele studies uitgevoerd om de invloed van predatoren en van dispersie op de bacteriële diversiteit na te gaan.

## Bacteriële gemeenschappen van ondiepe meren

Studies in rivieren en diverse types van meren toonden aan dat een aantal soorten of soortgroepen van bacteria vrijwel steeds terug te vinden zijn in zoetwatersystemen, ongeacht de geografische regio (Zwart et al. 2002). Een groot aantal van deze zogenaamde typische zoetwaterclusters van bacteria werden ook in Vlaamse ondiepe meren waargenomen (Van der Gucht et al. 2005), en ongeveer tweederde van de waargenomen soorten bacteria behoorden tot deze typische zoetwaterclusters. Slechts een kleine minderheid van de waargenomen bacteria betroffen soorten die voordien nog niet waargenomen waren in zoetwaterhabitaten en die enkel gekend waren van bodems of van mariene systemen. Ondiepe

meren blijken dus bacteriële gemeenschappen te herbergen die sterk gelijken op gemeenschappen die ook in andere zoetwatersystemen voorkomen.

De bacteriële gemeenschappen vertoonden duidelijke verschillen tussen de vier modelsystemen (Figuur 2). Vooral de troebele Blankaartvijver bleek een afwijkende soortensamenstelling te hebben, met relatief veel *Actinobacteria* en relatief weinig *beta-Proteobacteria*, en een globaal lagere diversiteit aan bacteria. Deze afwijkende gemeenschap is wellicht te wijten aan de bijzonder hoge fytoplanktonbiomassa en troebelheid van het meer. Daarnaast werden er ook duidelijke verschillen waargenomen tussen de heldere en troebele meren, en deze verschillen waren zeer vergelijkbaar in beide natuurgebieden. Troebele meren bleken gekenmerkt door de aanwezigheid van *Cyanobacteria*, een groep van fotosynthetische bacteria die ook wel tot het fytoplankton gerekend worden en die vaak problemen vormen in troebele ondiepe meren. In heldere meren worden deze *Cyanobacteria* vaak weggeconcentreerd door eukaryote fytoplanktonsoorten. Heldere meren bleken dan weer gekenmerkt door een groter aantal soorten uit de groep *Bacteroidetes*. Soorten uit de groep *Bacteroidetes* zijn gekend als afbrekers van polymeren zoals cellulose. Wellicht kan hun aanwezigheid in heldere meren verklaard worden door de dichte vegetatie van waterplanten, wat een hoge celluloseproductie met zich meebrengt. Deze studie was beperkt tot slechts 2 heldere en 2 troebele meren. Verder onderzoek is echter nodig

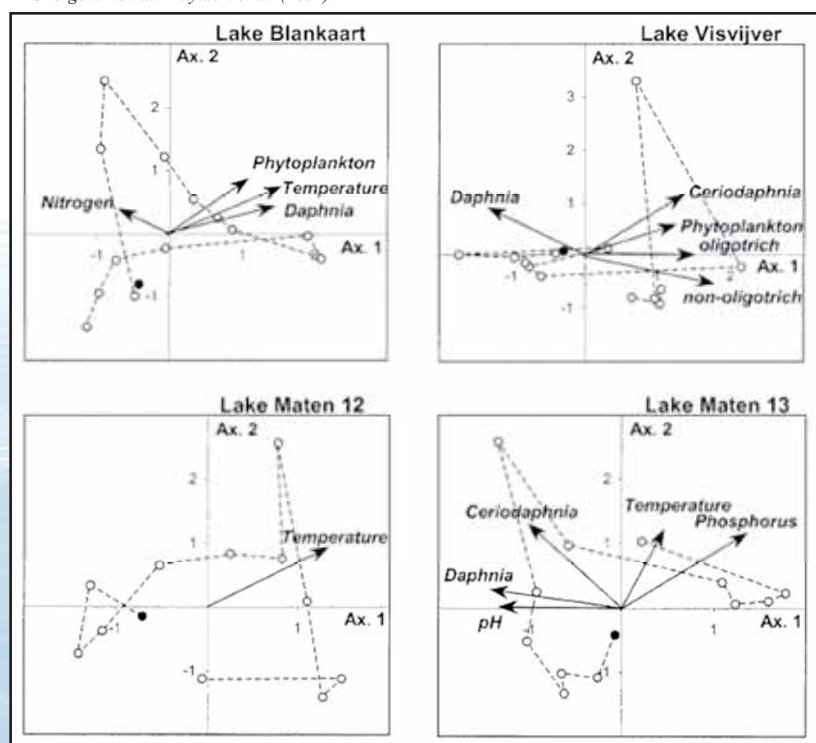
om na te gaan of deze patronen zich herhalen in andere heldere of troebele ondiepe meren.

### 'Bottom-up' versus 'top-down' controle van bacteriële gemeenschappen

In de vier modelsystemen werden duidelijke seizoensverschiuvingen in de samenstelling van de bacteriële gemeenschappen waargenomen. Aan de hand van multivariate statistische technieken werden deze verschiuvingen in de soortensamenstelling gerelateerd aan omgevingsfactoren (Muylaert et al. 2002). Deze omgevingsfactoren kunnen ingedeeld worden in twee grote groepen: 'bottom-up' en 'top-down' factoren. 'Bottom-up' factoren beïnvloeden rechtstreeks de groei van bacteria; deze factoren omvatten temperatuur, pH, anorganische nutriënten, gesuspendeerd materiaal en de biomassa van het fytoplankton. Fytoplankton scheidt tijdens het primaire productie proces een deel van de fotosynthetische producten uit onder de vorm van opgelost organisch materiaal, en dit opgelost organisch materiaal vormt een belangrijk substraat voor aquatische bacteria. 'Top-down' factoren omvatten predatoren van bacteria. In aquatische ecosystemen zijn dit voornamelijk ééncellige protozoa zoals heterotrofe flagellaten en ciliaten, maar ook zoöplankton zoals de watervlo *Daphnia*.

De multivariate statistische analyses toonden aan dat seizoensverschiuvingen in de bacteriële gemeenschap zowel gerelateerd waren aan 'bottom-up' factoren (temperatuur, nutriënten, fytoplankton en pH) als aan 'top-down' factoren (ciliaten en *Daphnia*) (Figuur 3). Terwijl in troebele meren de seizoensvariatie voornamelijk door 'bottom-up' factoren bepaald werd, speelden zowel 'bottom-up' als 'top-down' factoren onafhankelijk van elkaar een rol in de heldere meren. Dit is niet verrassend, aangezien heldere meren gekend zijn als systemen waar 'top-down' controle bijzonder sterk is. Door een sterke 'top-down' controle beïnvloedt de top van de voedselketen de basis in heldere ondiepe meren: predatore vis controleert planktivore vis en zoöplankton controleert fytoplankton. Onze resultaten tonen aan dat deze 'top-down' controle ook terug te vinden is op het niveau van het microbiële voedselweb. Troebele meren zijn systemen waar 'top-down' controle weggevallen is, waardoor de fytoplanktonbiomassa voornamelijk 'bottom-up' gereguleerd wordt door nutriënten en licht. Onze resultaten suggereren dat dit ook geldt voor bacteria.

Figuur 3: Multivariate analyse ("correspondence analysis" of CA) die de seizoensverschiuvingen in de bacteriële gemeenschappen in de 4 modelsystemen in 1999 weergeeft. Het eerste monster dat verzameld werd in het seizoen is weergegeven als een zwart punt, de overige monsters zijn weergegeven als witte punten, waarbij de gebroken lijn de tijdsreeks voorstelt. De pijlen zijn een voorstelling van de correlaties tussen de assen en omgevingsvariabelen die significant variatie in de gemeenschapstructuur verklaarden. Overgenomen uit Muylaert et al. (2002).



### De invloed van predatoren op bacteriële gemeenschappen

De resultaten van het monitoringonderzoek wijzen op een belangrijke 'top-down' controle van bacteria in heldere ondiepe meren. De invloed van predatie op de bacteriële gemeenschap werd daarom experimenteel onderzocht in een helder ondiep meer: de Visvijver in het natuurgebied De Blankaart (Muylaert et al. 2006). Hiervoor

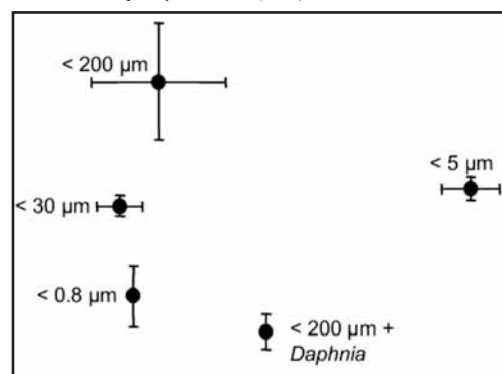
werd een fractionatie-experiment uitgevoerd. In een dergelijk experiment worden predatoren verwijderd door het water te filteren over filters met een poriegrootte die net iets kleiner is dan de gemiddelde grootte van de predator. In de Visvijver werd zoöplankton zoals *Daphnia* en copepoden verwijderd met een filter met poriegrootte 200  $\mu\text{m}$ . Larvale stadia of nauplii van copepoden werden verwijderd met een filter met poriegrootte 30  $\mu\text{m}$ , ciliaten met een filter met poriegrootte 5  $\mu\text{m}$  en heterotrofe flagellaten met filter met poriegrootte 0,8  $\mu\text{m}$ . Water gefilterd over de filter met poriegrootte 0,8  $\mu\text{m}$  bevatte enkel nog bacteria en was vrij van predatoren. Water gefilterd over een filter met poriegrootte 5  $\mu\text{m}$  bevatte enkel bacteria en heterotrofe flagellaten, enzovoort. Voor het experiment werden bacteria in zowel ongefilderd water uit de Visvijver als in water gefilterd over filters met poriegrootte 0,8, 5, 30 en 200  $\mu\text{m}$  gedurende 3 dagen opgevolgd. Het experiment werd uitgevoerd in kooitjes gemaakt van dialysemembraan die geïncubeerd werden in de Visvijver zelf. Dialysemembranen laten opgeloste stoffen zoals opgelost organisch materiaal en nutriënten door maar houden bacteria en grotere organismen tegen. Het gebruik van dialysemembranen zorgde ervoor dat 'bottom-up' condities gelijk waren in de verschillende behandelingen. Uit verschillen in de dichtheden van bacteria in de verschillende behandelingen kon afgeleid worden welke de voornaamste predatoren van bacteria waren in de Visvijver. Aan het eind van het experiment werd de soortensamenstelling van de bacteriële gemeenschap in de verschillende behandelingen onderzocht om na te gaan welke predatoren de sterkste invloed uitoefenden op de bacteriële gemeenschap.

Het experiment werd tweemaal uitgevoerd in hetzelfde jaar, in juli en begin oktober 2000. In juli was *Daphnia* de voornaamste zoöplanktonsoort terwijl in oktober copepoden belangrijker waren. Nauplii van copepoden, ciliaten en heterotrofe flagellaten waren 5 tot 10 keer abundanter in juli dan in oktober. In juli werd predatie van bacteria door *Daphnia*, ciliaten en heterotrofe flagellaten aangetoond, terwijl in oktober enkel predatie door ciliaten en heterotrofe flagellaten voorkwam (*Daphnia* was afwezig). Op het eind van het experiment werden duidelijke verschillen in de bacteriële gemeenschap waargenomen in de verschillende behandelingen (Figuur 4). De soortensamenstelling van de bacteriële gemeenschap bleek het meest afwijkend te zijn in de behandelingen waarin heterotrofe flagellaten de dominante predatoren waren. Dit is niet verwonderlijk, aangezien heterotrofe flagellaten bacteria één voor één opnemen, terwijl de andere groepen filtervoeders zijn. Bovendien zijn bacteria relatief groot ten opzicht van heterotrofe flagellaten, waardoor bepaalde soorten misschien net iets te groot zijn om opgenomen te worden en andere niet. Hierdoor kan er een duidelijke selectie optreden tijdens de predatie. Ciliaten en *Daphnia* oefenden een veel minder uitgesproken invloed uit op de samenstelling van de bacteriële gemeenschap. Dit kan verklaard worden door het feit dat

zowel de ciliaten die in de Visvijver voorkwamen op het ogenblik van de experimenten (oligotriche *Pelagohalteria*) als *Daphnia* filtervoeders zijn die bacteria uit het water filteren zonder daarbij bepaalde soorten te selecteren.

Dit onderzoek bleef totnogtoe beperkt tot een enkel, helder ondiep meer. Verdere studies in troebele ondiepe meren en andere heldere meren zijn nodig om een beter begrip te krijgen de van invloed die predatoren uitoefenen op de samenstelling van bacteriële gemeenschappen. In andere systemen spelen andere zoöplanktongroepen wellicht een rol. Zo werd aangetoond dat ook *Daphnia* de samenstelling van bacteriële gemeenschappen kan beïnvloeden (Degans et al. 2002).

*Figuur 4: Multivariate analyse ("non-metric multidimensional scaling" of MDS) van bacteriële gemeenschappen (bepaald aan de hand van DGGE analyse) in de verschillende behandelingen aan het eind van een fractionatie-experiment uitgevoerd in de Visvijver in oktober 2000. De gemiddelden van de 3 replica's en de 95% confidentieintervallen zijn weergegeven per behandeling. Zie tekst voor meer uitleg over de verschillende behandelingen. Gebaseerd op Muylaert et al. (2006).*



## Referenties

- Degans H, Zollner E, Van der Gucht K, De Meester L, Jurgens K (2002) Rapid *Daphnia*-mediated changes in microbial community structure: an experimental study. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY* 42: 137-149.
- Muylaert, K; Van der Gucht, K; Vloemans, N; De Meester, L; Gillis, M; Vyverman, W. 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 68: 4740-4750.
- Muylaert, K; Zhao, L; Van der Gucht, K; Cousin, S; Declerck, S; Vyverman, W. 2006. Trophic coupling in the microbial food web of a eutrophic shallow lake (Lake Visvijver, Belgium). *ARCHIV FUR HYDROBIOLOGIE* 166: 307-324.
- Muyzer, G; Dewaal, EC; Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s ribosomal-RNA. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 59: 695-700.

Declerck, S.; Van de Meutter, F.; De Meester, L. 2006. Ondiepe vijvers en meren – Ecologische achtergronden en beheer. *Natuur.focus* 5: 22-29.

Van der Gucht, K; Vandekerckhove, T; Vloemans, N; Cousin, S; Muylaert, K; Sabbe, K; Gillis, M; Declerck, S; De Meester, L; Vyverman, W. 2005. Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY* 53: 205-220.

Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.L., Moss, B. & Jeppesen, E. (1993) Alternative equilibria in shallow lakes. *TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION* 8: 275-279.

Zwart, G; Crump, BC; Agterveld, MPKV; Hagen, F; Han, SK. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences

from plankton of lakes and rivers. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY* 28: 141-155.

*K. Muylaert*

*K.U.Leuven – Campus Kortrijk,  
Lab. Biologie*

*E. Sabbelaan 53, B-8500 Kortrijk*

*Tel: +32 56 24 62 83*

*Fax: +32 56 24 69 99*

*E-mail: koenraad.muylaert@kuleuven-kortrijk.be*

*K. Van der Gucht<sup>1</sup>, S. Cousin<sup>2</sup>, L. De Meester<sup>3</sup>,  
W. Vyverman<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *UGent, Lab. Protistologie & Aquatische Ecologie*

<sup>2</sup> *Institut für Terrestrische Oekologie, Zürich,  
Switzerland*

<sup>3</sup> *K.U.Leuven, Lab. Aquatische Ecologie*