

Tengeri pikocianobaktériumok Erdély sós tavaiban

Mentes Anikó¹, Keresztes Zsolt Gyula^{2,3,4}, Hegyi Anna¹, Márialigeti Károly¹, Máthé István⁵, Somogyi Boglárka³, Vörös Lajos³, Felföldi Tamás¹

¹ELTE Mikrobiológiai Tanszék, 1117. Budapest, Pázmány Péter sétány 1/c. (tamas.felfoldi@gmail.com)

²BBTE Kísérleti Biológiai Tanszék, Ro-400084. Kolozsvár, Kogălniceanu utca 1.

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

⁴Edutus Főiskola, Műszaki Intézet; 2800. Tatabánya, Stúdió tér 1.

⁵EMTE Biomérnöki Tanszék, Ro-530104. Csíkszereda, Szabadság tér 1.

Kivonat:

A nyílt tengeri és óceáni ökoszisztémákban zajló elsődleges termelés jelentős részét (akár 80%-át is) a *Prochlorococcus* és *Synechococcus* pikocianobaktérium nemzetségek tagjai végzik. A globális szinten jelentős *Synechococcus* fő filogenetikai csoportjai (kládok) sok esetben eltérő élőhely-preferenciával jellemezhetők. A *Synechococcus*ok fellelhetők kontinentális vizekben is, ezek azonban jellemzően a tengerekben és óceánokban előforduló csoportoktól filogenetikailag teljesen elkülönülő kládokba sorolhatók. E kisméretű cianobaktériumok csoportjainak azonosítása molekuláris biológiai módszerekkel történik a megkülönböztető morfológiai bélyegek limutáltsága miatt. Kutatásunk során három erdélyi sós tó, a tordai Tarzan-tó, a désaknai Cabdic-tó és a szovátai Medve-tó vízmintáit vizsgáltuk a pikocianobaktérium közösség összetételének részletesebb megismerése céljából a riboszómális RNS operon nem kódoló szakaszának (ITS) és a 16S rRNS gént összehasonlító bázissorrend elemzésével. Kimutattuk, hogy mindhárom tó planktonikus *Synechococcus* közösségét főként tengeri és óceáni környezetekből leírt filotípusok alkották. Ezért valószínűsíthető, hogy Erdély sós tavainak jelentős részében nem a kontinentális vizekben általánosan előforduló pikocianobaktérium csoportok dominálnak.

Kulcsszavak:

sós tavak, Erdély, pikocianobaktériumok, *Synechococcus* nemzetség, 16S riboszómális RNS gén, ITS.

Bevezetés

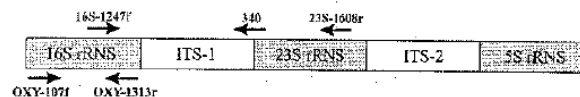
A szabadon élő *Synechococcus* pikocianobaktériumok a nyílt tengerek és óceánok legtöbb régiójában jelen vannak (Rocap és mtsai, 2002; Zwirgmaier és mtsai, 2008). A *Synechococcus*ok és közeli rokonai a *Prochlorococcus*ok az ezekben az ökoszisztémákban történő elsődleges termelés meghatározó részéért felelősek, így a szén-ciklusban való részvételük globális fontossága miatt a kutatók egyre nagyobb érdeklődést mutatnak irántuk (Fuller és mtsai, 2003; Ahlgren és Rocap, 2012).

A *Synechococcus*ok ökológiailag és filogenetikailag is diverzek. Előfordulnak kontinentális édes- és sós vizekben is, azonban ezeket az óceáni és tengeri társaiktól eltérő filogenetikai csoportokba sorolják (Rocap és mtsai, 2002; Crosbie és mtsai, 2003; Felföldi és mtsai, 2009 és 2011).

E kisméretű cianobaktériumok faji szintű meghatározása körülményes (Castenholz és Norris, 2005). A morfológiai bélyegek elemzése nem elegendő az alacsonyabb rendszertani kategóriák definiálásához, ezért egyre inkább előtérbe kerülnek a molekuláris biológiai módszerekkel végzett filogenetikai elemzések. A pikocianobaktériumok faji szintű csoportjainak megalkotása sokszor azért sem lehetséges, mivel nagyon nehéz tiszta tenyészetüket létrehozni. Emiatt az elkülönülő, monofiletikus leszármazási vonalakat különböző kóddal ellátott filogenetikai csoportokként, ún. kládokként jelölik (Castenholz és Norris, 2005). A helyzetet tovább bonyolítja, hogy kevés adat áll rendelkezésünkre, továbbá egy-egy molekuláris biológiai vizsgálat nem mindig azonos DNS szakasz elemzése alapján történik (Ahlgren és Rocap, 2012).

A vizsgálatunk tárgyát három erdélyi sós tó, a tordai Tarzan-tó, a désaknai Cabdic-tó és a szovátai Medve-tó vízmintáinak molekuláris elemzése képezte a planktoni-

kus pikocianobaktérium közösség összetételének részletesebb megismerése céljából. A korábbi mikroszkópos vizsgálatok eredményei ugyanis azt mutatták, hogy a nagy sókoncentráció ellenére ezek a szervezetek különösen nagy számban fordulhatnak elő az Erdélyi-medence sós tavaiban (Keresztes, 2012).



1. ábra. A *Synechococcus*ok riboszómális RNS operonjának szerkezete. A nyilak a PCR és szekvenálás során használt primerek hozzávetőleges pozícióját jelölik. Az ábra nem méretarányos.

Anyag és módszer

A mintavétel körülményeit, valamint a minták fizikokémiai paramétereinek meghatározását és a fitoplankton vizsgálatok módját már korábbi munkák során közöltük (1. táblázat; Hegyi és mtsai, 2012; Keresztes és mtsai, 2012). A vízmintákból a közösségi DNS-t az UltraClean Water DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories) segítségével vontuk ki. A 16S rRNS gént és az ITS-1 régiót (1. ábra) PCR segítségével, az OXY-107f és OXY-1313r (Fuller és mtsai, 2003) illetve a 16S-1247f és 23S-1609r primereket (Rocap és mtsai, 2002) alkalmazva szaporítottuk fel. A klónozást és a bázissorrend elemzéseket megelőzően a PCR termékeket EZ-10 Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic) segítségével tisztítottuk meg. A klónkönyvtár készítést a kék-fehér szelekcion alapuló pGEM-T és pGEM-T Easy Vektor Systemmel (Promega) végeztük el a gyártó utasításait követve. A klónok csoportosítása esetében a DNS amplifikációja két lépésben, először M13 primerpárral (Sambrook és Russell, 2001), majd a klónozás előtt használt primerekkel történt. Az így kapott DNS fragmentekkel restriktions emésztést végeztünk, amely során *AluI* és *Hin6I* (Fer-

1. táblázat. A vizsgált minták főbb jellemzői

Tó neve (klónok jele)	Mintavétel ideje	Mintavételi mélység (m)	NaCl (%)	pH	T (°C)	DO (mg/L)	Chl (µg/L)	PC AB (10 ⁴ sejt/mL)	PEU AB (10 ⁴ sejt/mL)
Medve-tó ●	2010.04.30.	2,0	6,8	7,9	26,8	2,8	17,2	113,8	0
Cabdic-tó ○	2010.07.22.	0,1	5,5	8,9	28,2	10,5	104,0	730,2	0
Tarzan-tó ●	2011.02.08.	2,5	3,4	7,3	8,2	2,1	9,0	44,1	5,4

Rövidítések: T – hőmérséklet, DO – oldott O₂ tartalom, Chl – klorofill-a koncentráció, PC AB – pikocianobaktérium abundancia, PEU AB – piko-eukarióta alga abundancia

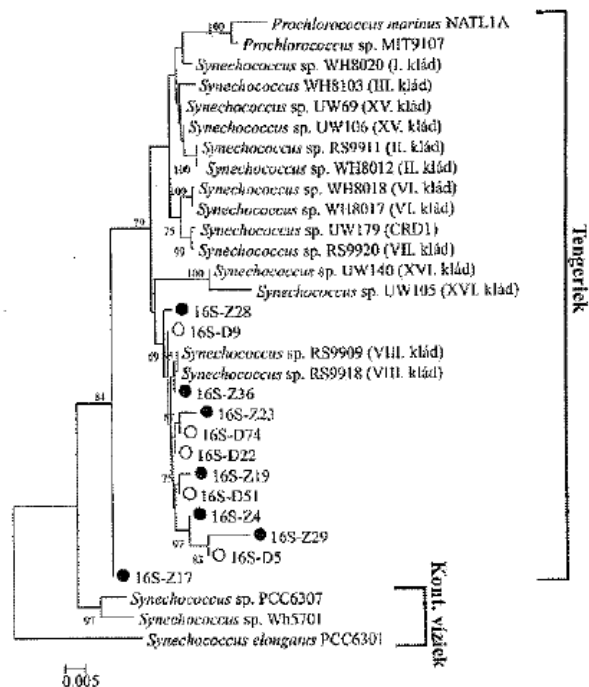
mentas) endonukleázok felhasználásával a DNS-t 3 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Ezt 80 perces elektroforézis követte 80 V-on 2 (m/V) %-os agaróz gélben. A restrikciós mintázatok alapján kiválasztott klónok szekvenálását M13 (Sambrook és Russell, 2001) és 340 (*l. ábra*; Laloui és mtsai, 2002) primerekkel végeztük el. A szekvenáló reakciót és a kapilláris elektroforézist a Biomi Kft. (Gödöllő, Magyarország) és az LGC Genomics (Berlin, Németország) végezte. A kromatogramokon a Chromas program (Technelysium) segítségével az automatikus leolvasás hibáit manuálisan korrigáltuk. A 0 szekvenciákat a BLAST program segítségével (Altschul és mtsai, 1997) a GenBank DNS adatbázissal hasonlítottuk össze. A filogenetikai analízist a MEGA 5 szoftverrel (Tamura és mtsai, 2011) végeztük.

Eredmények és értékelésük

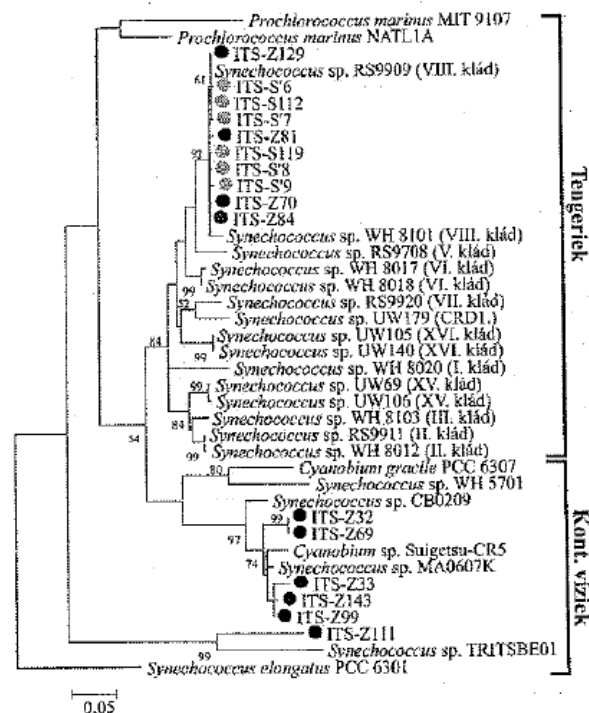
Összesen 131 16S rRNS és 175 ITS klón restrikciós emésztési mintázata alapján 12 illetve 16 klón szekvencia analízist végeztük el. Mindhárom tó esetében a legtöbb klón a *Synechococcus* sp. RS9909 és RS9918 izolátumokkal mutatott legnagyobb hasonlóságot (2. és 3. ábra). Ezeket először az Akabai-öbölből írták le, és a nyílt tengerekben és óceánokban előforduló *Synechococcus* pikocianobaktériumok VIII. kládjába sorolták mindkettőt (Fuller és mtsai, 2003; Zwirgmaier és mtsai, 2008). Nem sok adat áll rendelkezésre erről a két izolátumról, azonban a VIII. klád más képviselőiről néhány tanulmányban szó esik. A *Synechococcus* VIII. tengeri kládjába sorolt RS9917 izolátum szintén az Akabai-öbölből származik és a teljes genomjának szekvenciája rendelkezésre áll, genomjának mérete 2,58 Mbp, GC tartalma 64,8 mol% (Dufresne és mtsai, 2008). Egy másik, a *Synechococcus* óceáni előfordulását vizsgáló kutatás során a VIII. klád tagjait kizárólag hiperszalin lagúnákban mutatták ki (Huang és mtsai, 2012). Valamennyi VIII. kládba tartozó izolátum fikocianin pigment-dominanciával rendelkezik (Fuller és mtsai, 2003), ami jól egyezik a mikroszkópos megfigyelésekkel, hiszen a vizsgált tavakban kizárólag ilyen típusú pikocianobaktériumok fordultak elő (Keresztes, 2012).

A Cabdic-tó (16S-D klónok) planktonikus *Synechococcus* közösségének 16S rRNS gén alapján történő részletesebb vizsgálata kizárólag a VIII. klád jelenlétét mutatta (2. ábra), a Tarzan-tóból (16S-Z klónok) viszont ezen túl egy új, 16S rRNS gén alapú filogenetikai csoportot sikerült kimutatni. A Tarzan-tó esetében az ITS szekvencia analízis alapján is (ITS-Z klónok) találtunk egyéb *Synechococcus* csoportokat a VIII. klád tagjai mellett (3. ábra). Ezeknek a klónoknak a legközelebbi rokonai egy lengyelországi tóból és japán sós tóból izolált törzsek voltak (Jasser és mtsai, 2011). Ezzel szemben a Medve-tóból (ITS-S klónok) az ITS szekvencia alapján kizárólag a tengeri VIII. kládot mutattunk ki.

A klónok vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy Erdély sós tavaiban elsősorban nem a kontinentális vizekben általánosan előforduló pikocianobaktériumok dominálnak, hiszen mindhárom tó planktonikus *Synechococcus* közösségét főként (>92% az összes vizsgált klón arányában) tengeri és óceáni környezetekből leírt filotípusok alkották.



2. ábra. A 16S rRNS gén alapján létrehozott *Synechococcus* klónok filogenetikai helyzetét bemutató neighbor-joining módszerrel szerkesztett dendrogram (minták jelölése, ld. 1. táblázat)



3. ábra. Az ITS szekvencia szakasz alapján létrehozott *Synechococcus* klónok filogenetikai helyzetét bemutató maximum likelihood módszerrel szerkesztett dendrogram (minták jelölése, ld. 1. táblázat)

Következtetések

A kontinentális vizekben jelen levő tengeri cianobaktériumok megléte a szél (anemochoria) vagy az állatok általi (zoochoria) terjedéssel is magyarázható. A Kárpát-medence a Kárpátok kiemelkedésével és a pliocén-kori Pannon-tenger kiszáradásával jött létre (Antal, 1985), így felmerülhet az a lehetőség is, hogy ősi tengeri sótöm-

zsökből is származhatnak az itt található pikocianobaktériumok, hiszen a mintázott tavak esetében ezek a sósrétegek képezik a tó fenekét. A *Synechococcus*ok terjedését azonban kevés tényező korlátozza, ezért potenciálisan széleskörűen előfordulnak. A pikocianobaktériumok jelenlétét kimutatták a troposzférában (8-15 km magasságban) is, amely rávilágít ezen algák hidrológiai ciklus révén való terjedésére (DeLeon-Rodriguez és mtsai, 2012).

Az adott helyeken az ökológiai hatásoktól függően más *Synechococcus* genotípusok fordulnak elő (Felföldi és mtsai, 2012; Ahlgren és Rocap, 2012). Logikus a magyarázat, hogy miért élnek kontinentális vizekben tengeri *Synechococcus*ok, mert az általunk vizsgált Erdélyi-sóvidék tavai a tengerhez hasonló só-összetétellel (NaCl) rendelkeznek (Hegyi és mtsai, 2012; Keresztes és mtsai, 2012). Hasonló jelenségről, vagyis tengeri pikocianobaktérium filotípusok kontinentális vizekben megfigyelhető előfordulásáról, beszámoló közlemény a szakirodalomban eddig nem látott napvilágot.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást részben a Sapientia Alapítvány Kutatási Programok Intézete (209/37/2009), a Human Resources Development Program (POS-DRU 88/1.5/S/60185) és CNCISIS/UEFISCDI TE306/70 programok támogatták. Somogyi Boglárka és Felföldi Tamás munkáját a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János kutatói ösztöndija segítette. Keresztes Zsolt Gyula munkáját a Collegium Talentum (Tatabánya) és a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program (A2-CT-FOK-12-0008) támogatta.

Irodalom

- Ahlgren NA, Rocap G. 2012. Diversity and distribution of marine *Synechococcus*: multiple gene phylogenies for consensus classification and development of qPCR assays for sensitive measurement of clades in the ocean. *Front. Aquat. Microbiol.* 3: 213.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Antal S. 1985. Földtan IV: Magyarország szerkezeti és regionális földtana. Budapest. Műszaki Kiadó. ISBN 963-10-6607-X.
- Castenholz RW, Norris TB. 2005. Revisionary concepts of species in the Cyanobacteria and their applications. *Algal. Stud.* 117: 53-69.
- Crosbie ND, Pöckl M, Weisse T. 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5716-5721.
- DeLeon-Rodriguez N, Latham TL, Rodriguez-R LM, Barazesh JM, Anderson BE, Beyersdorff AJ, Ziemba LD, Bergin M, Nenes A, Konstantinidis KT. 2012. Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storm, and atmospheric implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 2575-2580.
- Dufresne A, Ostrowski M, Scanlan D, Garczarek L, Mazard S, Palenik B, Paulsen I, de Marsac N, Wincker P, Dossat C, Ferriera S, Johnson J, Post A, Hess W, Partensky F. 2008. Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria. *Genome Biol.* 9: R90.
- Felföldi T, Somogyi B, Márialigeti K, Vörös L. 2009. Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the Carpathian Basin (Centr.Europe). *J. Limnol.* 68: 385-395.
- Felföldi T, Somogyi B, Márialigeti K, Vörös L. 2011. Notes on the biogeography of non-marine planktonic picocyanobacteria: re-evaluating novelty. *J. Plankton Res.* 33: 1622-1626.
- Felföldi T, Somogyi B, Keresztes ZsGy, Márialigeti K, Vörös L. 2012. A tudományos közlemények megbízhatóságának problémái a kontinentális vizekben élő legkisebb cianobaktériumok példáján. *Hidrol. Közl.* 92: 25-26.
- Fuller NJ, Marie D, Partensky F, Vaulot D, Post AF, Scanlan DJ. 2003. Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2430-2443.
- Hegyi A, Felföldi T, Máthé I, Jurecska L, Palatinszky M, Barkács K, Márialigeti K. 2012. A Medve-tó mikrobaközösségeinek vizsgálata molekuláris módszerekkel. *Hidrol. Közl.* 92: 38-40.
- Huang S, Wilhelm SW, Harvey HR, Taylor K, Jiao N, Chen F. 2012. Novel lineages of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in the global oceans. *ISME J.* 6: 285-297.
- Jasser I, Królicka A, Karnkowska-Ishikawa A. 2011. A novel phylogenetic clade of picocyanobacteria from the Mazurian lakes (Poland) reflects the early ontogeny of glacial lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 89-98.
- Keresztes ZsGy. 2012. Studies on picophytoplankton biodiversity in some Romanian salt lakes. PhD disszertáció. BBTE, Kolozsvár.
- Keresztes ZsGy, Felföldi T, Somogyi B, Székely Gy, Dragoş N, Márialigeti K, Bartha Cs, Vörös L. 2012. First record of picophytoplankton diversity in Central European hypersaline lakes. *Extremophiles.* 16: 759-769.
- Laloui W, Patinska KA, Rippka R, Partensky F, Tandeau de Marsac N, Herdman M, Iteman I. 2002. Genotyping of axenic and non-axenic isolates of the genus *Prochlorococcus* and the OMF-*Synechococcus* clade by size, sequence analysis or RFLP of the Internal Transcribed Spacer of the ribosomal operon. *Microbiol. (UK)* 148: 453-465.
- Rocap G, Distel DL, Waterbury JB, Chisholm SW. 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1180-1191.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Chapter 8: *In vitro* amplification of DNA by the polymerase chain reaction, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 8-115.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Zwirgmaier K, Jardillier L, Ostrowski M, Mazard S, Garczarek L, Vaulot D, Not F, Massana R, Ulloa O, Scanlan DJ. 2008. Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environ. Microbiol.* 10: 147-161.

Marine picocyanobacteria in Transylvanian saline lakes

Mentes, A. – Keresztes, Zs. Gy. – Hegyi, A. – Márialigeti, K. – Máthé, I. – Somogyi, B. – Vörös, L. – Felföldi, T.

Abstract: Members of the picocyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus* contribute up to 80% to the planktonic primary production in open ocean ecosystems. In many cases, the globally significant main phylogenetic groups (clades) of *Synechococcus* denote ecologically distinct units. Members of the genus *Synechococcus* can be found in continental freshwaters and saline aquatic habitats as well, but freshwater phylotypes can be grouped into phylogenetically completely distinct clades apart from those typically occurring in the open ocean. Taxonomic identification of these small cyanobacteria is based on molecular biological techniques, because their distinctive morphological features are limited. Our aim was to characterize the picocyanobacterial community of saline lakes in the Transylvanian Basin (Lake Tarzan in Turda, Lake Cabdic in Ocna Dej and Lake Ursu in Sovata) by means of molecular biological tools: comparative sequence analysis of a non-coding region in the rRNA operon (ITS) and the 16S rRNA gene. It has been shown that the *Synechococcus* community of all the three lakes was dominated by phylotypes characteristic to oceans and seas. It seems that Transylvanian salt lakes have distinct picocyanobacterial communities compared to those occurring in other continental waters.

Keywords: saline lakes, Transylvania, picocyanobacteria, genus *Synechococcus*, 16S ribosomal RNA gene, ITS.