

Συμβιωτικά κυανοβακτήρια σε σπόγγους της Ανατολικής Μεσογείου: προκαταρκτικά αποτελέσματα

Κωνσταντίνου, Δ.¹, Βουλτσιάδου, Ε.¹, Γεροβασιλείου, Β.¹, Γκέλης, Σ.¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, kidespoi@bio.auth.gr, elvoults@bio.auth.gr, vgerovas@bio.auth.gr, sgkelis@bio.auth.gr

Περίληψη

Η ποικιλότητα των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων των σπόγγων στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου είναι σχεδόν ανεξερεύνητη. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η παρουσία κυανοβακτηρίων σε ιστούς 25 δειγμάτων σπόγγων από τις ακτές της Χαλκιδικής. Κυανοβακτήρια βρέθηκαν σε 16 είδη σπόγγων (σε εννέα από αυτά για πρώτη φορά), γεγονός που δείχνει ότι η λεπτομερέστερη έρευνα έχει να δώσει ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: Porifera, βακτήρια, βιοποικιλότητα, Αιγαίο

Sponge-associated cyanobacteria of the Eastern Mediterranean: preliminary results

Konstantinou, D.¹, Voultziadou, E.¹, Gerovasileiou, V.¹, Gkelis, S.¹

¹School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, kidespoi@bio.auth.gr, elvoults@bio.auth.gr, vgerovas@bio.auth.gr, sgkelis@bio.auth.gr

Abstract

Diversity of sponge-associated cyanobacteria in the Eastern Mediterranean is almost unexplored. In this report we investigated the occurrence of cyanobacteria in 25 tissue samples of sponges from Chalkidiki (North Aegean Sea). Cyanobacteria were recorded in 16 sponge species (for the first time in nine of them), indicating that further investigation is expected to give interesting results.

Keywords: Porifera, bacteria, biodiversity, Aegean Sea

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλη αύξηση του επιστημονικού ενδιαφέροντος για την ποικιλότητα και την οικολογία των κυανοβακτηρίων που σχετίζονται με σπόγγους (Thacker & Freeman, 2012), με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας απομόνωσης βιοδραστικών ουσιών για την παραγωγή νέων φαρμάκων (Mehbub et al., 2014). Αν και τα κυανοβακτήρια μπορεί να αποτελούν μεγάλο μέρος της μεσοϋλης ενός σπόγγου, η υπάρχουσα γνώση για την ποικιλότητα τους και τη μορφή της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσουν με αυτούς είναι ελλιπής, ενώ μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί σε περισσότερα από 100 είδη σπόγγων, κυρίως από τροπικές περιοχές, κυανοβακτήρια των γενών *Synechococcus* και *Oscillatoria* (Thacker & Freeman, 2012).

Πρόσφατα έχει επισημανθεί η αναγκαιότητα για ολοκληρωμένη διερεύνηση της ποικιλότητας των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων των σπόγγων τόσο με μεθόδους που βασίζονται στην απομόνωση και καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων, όσο και με ανεξάρτητες από την απομόνωση μεθόδους, όπως οι μοριακές μέθοδοι και η μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών των σπόγγων (Thacker & Freeman, 2012).

Το γεγονός ότι τέτοιου είδους ολοκληρωμένες μελέτες είναι ελάχιστες αλλά και η έλλειψη γνώσης για τα συμβιωτικά με σπόγγους κυανοβακτήρια από την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, αποτέλεσαν το κίνητρο για την παρούσα έρευνα που έχει στόχο τη διερεύνηση της ποικιλότητας των κυανοβακτηρίων που συμβιών με διαφορετικά είδη σπόγγων στο Βόρειο Αιγαίο, με μια ολοκληρωμένη προσέγγιση (ανεξάρτητες και μη από την απομόνωση μέθοδοι). Στη

συγκεκριμένη εργασία, παρουσιάζονται οι πρώτες ενδείξεις για την παρουσία συμβιωτικών κυανοβακτηρίων σε διαφορετικά είδη σπόγγων από διαφορετικά ενδιαιτήματα.

2. Υλικά και μέθοδοι

Συλλέχθηκαν συνολικά 25 δείγματα σπόγγων με αυτόνομη κατάδυση (SCUBA), στην περιοχή Πόρτο Βαλίτσα (Κασσάνδρα Χαλκιδικής), την πλησιέστερη περιοχή με μεγάλη ποικιλότητα ειδών σπόγγων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από δύο βενθικές κοινότητες που αναπτύσσονται σε διαφορετικές ζώνες βάρους, τη βιοκοινότητα των φωτόφιλων φυκών (5-10 m) και την κοραλλιγενή ή βιοκοινότητα των σκιοφίλων φυκών (15-20 m). Οι σπόγγοι φωτογραφήθηκαν *in situ* και στη συνέχεια αποσπάστηκε μικρό τμήμα τους (περίπου 2X3 cm) με κοπίδι (διαφορετικό για κάθε δείγμα) και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια. Τα δείγματα για τις πρώτες εργαστηριακές αναλύσεις, που έγιναν εντός 6 ωρών, διατηρήθηκαν στους 4°C. Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η ταξινόμηση των σπόγγων καθώς και η παρατήρηση των ιστών τους για την εξέταση της παρουσίας κυανοβακτηρίων. Για την ταξινόμηση των σπόγγων ετοιμάστηκαν παρασκευάσματα ιστολογικών τομών και σκελετικών στοιχείων και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Για την καταγραφή των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν 1-2 τομές ιστού σπόγγου από κάθε δείγμα που αφού επανειλημμένα ξεπλύθηκαν με διηθημένο και αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι ήταν απαλλαγμένες από τα κυανοβακτήρια του θαλασσινού νερού. Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axio imager z2 (Carl Zeiss, Germany), με χρήση φθορισμού (Alexa Fluor 546), εξοπλισμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Axio Cam MRc5 για τη λήψη μικροφωτογραφιών. Η αφθονία των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων δίνεται μόνο κατ' εκτίμηση.

3. Αποτελέσματα

Από τα 25 δείγματα σπόγγων που εξετάστηκαν, βρέθηκε να φιλοξενούν συμβιωτικά κυανοβακτήρια τα 22. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών 25 δειγμάτων σπόγγων παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την κατανομή, τους μορφότυπους και την αφθονία των κυανοβακτηρίων (Πίνακας 1). Τα συμβιωτικά κυανοβακτήρια κατανέμονταν επάνω στους σπόγγους με τρεις διαφορετικούς τρόπους: διακριτά συσσωματώματα, πολύ πυκνά και αλληλεπικαλυπτόμενα συσσωματώματα που κάλυπταν πλήρως τον ιστό (επικάλυψη), ή μονήρεις οργανισμοί. Στην πλειονότητα των δειγμάτων, τα συμβιωτικά κυανοβακτήρια είχαν κοκκοειδή μορφή (τύπου *Synechococcus/Synechocystis*), ενώ ελάχιστα είχαν νηματοειδή μορφή (τάξη *Oscillatoriales*).

Τα δείγματα των σπόγγων που συλλέχθηκαν ταξινομήθηκαν σε 18 είδη που κατανέμονται σε 9 από τις 13 τάξεις των δημόσπογγων. Κυανοβακτήρια παρατηρήθηκαν σε 16 από τα είδη που εξετάστηκαν. Μεγαλύτερη αφθονία συμβιωτικών κυανοβακτηρίων φάνηκε πως είχαν τα είδη *Aplysina aerophoba*, *Chondrilla nucula*, *Hexadella racovitzai*, *Agelas oroides*, *Axinella verrucosa*, *Oscarella* sp., *Haliclona fulva*, *Axinella cannabina* και *Stryphnus ponderosus*. Συμβιωτικά κυανοβακτήρια δεν παρατηρήθηκαν καθόλου στα είδη *Chondrosia reniformis* και *Sarcotragus foetidus*. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση της αφθονίας των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων στα δείγματα των σπόγγων που εξετάστηκαν σε σχέση με τον τύπο ενδιαιτήματος και το βάθος συλλογής τους. Ωστόσο, σε ορισμένα είδη παρατηρήθηκαν διαφορές σε δείγματα με διαφορετική μορφή (*A. oroides*) ή χρώμα (*H. racovitzai*), ενώ βρέθηκαν κυανοβακτήρια και σε δείγμα νεκρού ατόμου του είδους *A. oroides* (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κατανομή (Ε: επικάλυψη, Σ: συσσωματώματα, Μ: μονήρη), μορφότυπος (Κ: κοκκοειδή, Ν: νηματοειδή) και κατ' εκτίμηση αφθονία συμβιωτικών κυανοβακτηρίων (+: λίγα, ++: αρκετά, +++: πολλά) ανά είδος σπόγγου και βιοκοινότητα.

Είδος σπόγγου	Βιοκοινότητα (βάθος)	Κυανοβακτήρια		
		Κατανομή	Μορφό τυπος	Αφθονία
<i>Agelas oroides</i> (Schmidt, 1864)	Φωτόφιλων	Μ	Ν	+
<i>Aplysina aerophoba</i> Nardo, 1833 – δείγμα 1	φυκών	Ε	Κ	+++
<i>Aplysina aerophoba</i> – δείγμα 2	(5-10 m)	Ε	Κ	+++
<i>Chondrilla nucula</i> (Schmidt, 1862)		Σ	Κ	+++
<i>Chondrosia reniformis</i> Nardo, 1847		-	-	-
* <i>Ircinia oros</i> (Schmidt, 1864)		Ε	Κ	++
<i>Ircinia variabilis</i> (Schmidt, 1862)		Σ	Κ	++
<i>Sarcotragus foetidus</i> (Schmidt, 1862)		-	-	-
* <i>Spirastrella cunctatrix</i> (Schmidt, 1868)		Μ	Κ	+
* <i>Acanthella acuta</i> Schmidt, 1862	Κοραλλιγενής	Σ, Μ	Κ, Ν	+++
<i>Agelas oroides</i> – νεκρό σωληνοειδές άτομο	(15-20 m)	Ε	Κ	++
<i>Agelas oroides</i> – συμπαγής μορφή		Ε, Μ	Κ, Ν	++
<i>Agelas oroides</i> – σωληνοειδής μορφή		Ε, Σ	Κ	+++
* <i>Axinella cannabina</i> (Esper, 1794)		Σ, Μ	Κ	+++
* <i>Axinella damicornis</i> (Esper, 1794)		Μ	Κ	+
* <i>Axinella verrucosa</i> (Esper, 1794)		Ε	Κ	+++
<i>Chondrosia reniformis</i>		-	-	-
<i>Dysidea anara</i> (Schmidt, 1862)		Σ	Κ	++
* <i>Haliclona fulva</i> (Topsent, 1893)		Σ, Μ	Κ	+++
* <i>Hexadella racovitzai</i> Topsent, 1896 – μπεζ χρώμα		Σ	Κ	+++
* <i>Hexadella racovitzai</i> - μωβ χρώμα		Μ	Κ	+
<i>Oscarella</i> sp.		Σ	Κ	+++
<i>Petrosia ficiformis</i> (Poiret, 1789)		Μ	Κ	+
<i>Spirastrella cunctatrix</i>		Σ, Μ	Κ, Ν	+
* <i>Stryphnus ponderosus</i> (Bowerbank, 1866)		Σ, Μ	Κ	+++

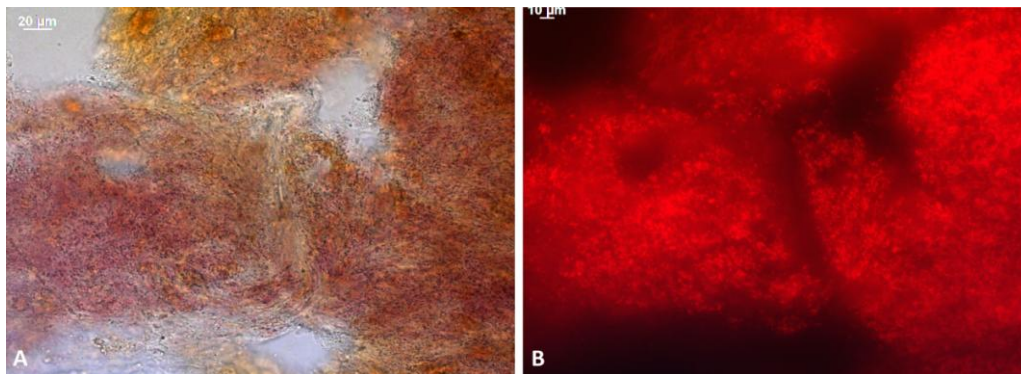
*καταγραφή συμβιωτικών κυανοβακτηρίων για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο είδος

Στην Εικ. 1 παρατίθεται ενδεικτικά, όπως παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο, ιστός του σπόγγου *A. aerophoba* που φαίνεται να φιλοξενεί συμβιωτικά κυανοβακτήρια στο ορατό φως (α) και στο φθορισμό (β). Παρατηρούμε ότι τα κυανοβακτήρια κατανέμονται σε πυκνά συσσωματώματα που κάλυπταν πλήρως τον ιστό του σπόγγου και είχαν κοκκοειδή μορφή.

4. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την παρουσία κυανοβακτηρίων σε μια ποικιλία ειδών σπόγγων, αντιπροσωπευτικών της κλάσης των δημόσπογγων. Η έρευνα της σχετικής βιβλιογραφίας έδειξε ότι για εννέα από τα είδη που εξετάστηκαν (*Acanthella acuta*, *Axinella cannabina*, *Axinella damicornis*, *Axinella verrucosa*, *Ircinia oros*, *Haliclona fulva*, *Hexadella racovitzai*, *Spirastrella cunctatrix* και *Stryphnus ponderosus*) δεν έχουν αναφερθεί συμβιωτικά κυανοβακτήρια μέχρι σήμερα. Πιθανώς αυτό οφείλεται στην ελλιπή έρευνα αφού τα είδη αυτά εξαπλώνονται κυρίως στη Μεσόγειο, μια περιοχή στην οποία έχουν μελετηθεί ελάχιστα τέτοιας μορφής σχέσεις, πόσο μάλλον όταν πρόκειται για ενδημικά είδη της ανατολικής λεκάνης όπως, για παράδειγμα, το *A. cannabina*. Κυανοβακτήρια δεν παρατηρήθηκαν στους σπόγγους *Chondrosia reniformis* και *Sarcotragus foetidus*, για τα οποία επίσης δεν βρέθηκαν ανάλογες βιβλιογραφικές αναφορές. Για τα υπόλοιπα έξι είδη σπόγγων (*Agelas oroides*, *Aplysina aerophoba*, *Chondrilla nucula*, *Ircinia variabilis*, *Dysidea anara*, *Petrosia*

ficiformis) και το γένος *Oscarella* έχει αναφερθεί η ύπαρξη συμβιωτικών κυανοβακτηρίων, και κυρίως κοκκοειδούς μορφής (τύπου *Synechococcus*) σε προηγούμενες μελέτες (Ribes et al., 2012; Diaz et al., 2007; Usher et al., 2004). Σε ότι αφορά την παρουσία κυανοβακτηρίων στο νεκρό άτομο του είδους *A. oroides*, έχει βρεθεί και για άλλα Μεσογειακά είδη σπόγγων ότι η παρουσία τους σε αυξημένες συγκεντρώσεις ίσως σχετίζεται με φαινόμενα θνησιμότητας λόγω θερμοκρασιακών ανωμαλιών (Cebrian et al., 2011).



Εικ. 1. Ιστός του είδους *Aplysina aerophoba* που φιλοξενεί συμβιωτικά κυανοβακτήρια. Φωτεινό πεδίο (A). Φθορισμός (B).

Συμπερασματικά, η μικροσκοπική παρατήρηση των ιστών κοινών ειδών σπόγγων της Μεσογείου έδειξε την ύπαρξη συμβιωτικών κυανοβακτηρίων, σε αρκετά πυκνούς πληθυσμούς κάποιες φορές. Τα προκαταρκτικά αυτά ευρήματα δείχνουν ότι έρευνα με μοριακές μεθόδους αλλά και με απομόνωση και καλλιέργεια στελεχών (που βρίσκεται σε εξέλιξη) μπορεί να δώσουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα για την ποικιλότητα των συμβιωτικών κυανοβακτηρίων των σπόγγων στην περιοχή της Α. Μεσογείου.

6. Βιβλιογραφία

- Cebrian, E., Uriz, M.J., Garrabou J. and Ballesteros E. 2011. Sponge mass mortalities in an warming Mediterranean Sea: Are Cyanobacteria-Harboring Species Worse off? *Plos One*, 6, e20211.
- Diaz, M.C, Thacker, R.W., Rützler, K. and Piantoni C. 2007. Two new haplosclerid sponges from Caribbean Panama with symbiotic filamentous cyanobacteria, and an overview of sponge cyanobacteria associations. In: *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and sustainability. Série Livros*, 28, 31-39.
- Mehbub, M.F, Lei, J., Franco, C. and Zhang W. 2014. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Marine drugs*, 12, 4539-4577.
- Ribes, M., Jiménez, E., López-Sendino, P., Diez, B., Massana, R. et al. 2012. Functional convergence of microbes associated with temperate marine sponges. *Environmental Microbiology*, 14, 1224-1239.
- Thacker R. and Freeman C.J. 2012. Sponge-microbes symbioses: Recent advances and new directions. In: *Advance in Marine Biology*. Becerro, M.A., Uriz, M.J., Maldonado, M. and Turon X. (eds), Elsevier.
- Usher, K.M., Fromont, J., Sutton, D.C. and Toze S. 2004. The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from Australia and the Mediterranean. *Microbial Ecology*, 48, 167-177.