

# ESTUDI DE LA DIVERSITAT DE PICOFLAGEL·LATS HETEROTRÒFICS A LA ZONA DE BLANES MITJANÇANT TÈCNIQUES MOLECULARS I DE CULTIU

Lara Vaqué Mas  
Setembre 2007

Directors: Ramon Massana, Olga Sánchez  
Universitat Autònoma de Barcelona

## Resum

S'ha estudiat la diversitat de picoflagel·lats heterotròfics, d'aigües del nord-oest del mar Mediterrani, mitjançant DGGE, biblioteques de clons i enriquiments. S'ha trobat que la diversitat és alta (índex Shannon 2,227), com en d'altres estudis, però que disminueix en afegir matèria orgànica (extracte de llevat o d'arròs), amb índex de Shannon de fins a 0,731. Per una entrada d'aigua continental rica en nutrients, s'han desenvolupat millor les crisofícies en detriment d'altres organismes habituals al medi marí, com els MAST.

Paraules clau: picoflagel·lats, DGGE, biblioteques de clons, PCR, enriquiments, diversitat

---

## Resumen

*Se ha estudiado la diversidad de picoflagelados heterotróficos de aguas del norte-oeste del mar Mediterráneo, mediante DGGE, bibliotecas de clones i cultivos. Se ha visto que la diversidad es alta (índice de Shannon de 2,227), como en otros estudios, pero que disminuye al añadir materia orgánica (extracto de levadura o de arroz), con índices de Shannon de hasta 0,731. A causa de una entrada de agua continental rica en nutrientes, se han desarrollado mejor las crisofíceas en detrimento de otros organismos habituales al medio marino, como los MAST.*

*Palabras clave: picoflagelados, DGGE, bibliotecas de clones, PCR, cultivos, diversidad*

---

## Summary

*We have studied the diversity of heterotrophic picoflagellates, on the northwest of the Mediterranean Sea, with DGGE, clone libraries and enrichments. We have found a high diversity (Shannon index of 2,227), like in other studies, but it decreased with the addition of organic materia (with both yeast and rice extract) until a Shannon index of 0,731. Other organisms not as habitual in this area as MAST have been better developed: the crysophycea. The possible cause is a contamination of the study area by urban residual waters.*

*Key words: picoflagellates, DGGE, clone libraries, PCR, enrichments, diversity*

---

## Introducció

Els picoeucariotes marins (picoplàncton eucariòtic) són els eucariotes més abundants de la Terra, són úbics de tots els ambients marins (Laybourn-Parry and Parry, 2000) i la seva concentració varia entre  $10^2$  i  $10^4$  cèl·lules per mil·lilitre a la zona fòtica (on arriba la llum solar) (Díez et al, 2001a i b; Massana et al, 2006b; 2004b).

Els picoflagel·lats heterotròfics (PFH) són considerats bàsicament bacterívors, és a dir, s'alimenten de bacteris, i juguen un paper fonamental en la recirculació de nitrogen, fòsfor i carboni a la xarxa tròfica marina. Les seves preses són una font d'aquests nutrients: els PFH obtindran els nutrients quan s'alimentin dels bacteris, i els nivells tròfics superiors els obtindran a través del consum dels flagel·lats, en el que s'anomena el bucle microbià (Azam et al, 1983; Jürgens and Güde, 1990; Laybourn-Parry and Parry, 2000; Massana et al, 2006a).

El poc coneixement sobre els PFH que es tenia fins fa uns anys s'explica per dos motius: el primer perquè els PFH no presenten trets morfològics característics i el segon, a causa de la metodologia emprada: els cultius i l'observació microscòpica. Aquestes tècniques tradicionals, basades en criteris fenotípics, tenen limitacions en descriure la composició picoplanctònica a causa de la mida petita d'aquests i en la falta de caràcters taxonòmics distintius (Moon-van der Staay et al, 2001).

En els darrers anys la incorporació de tècniques de biologia molecular (com les biblioteques genètiques de clons, la DGGE, ...) ha permès l'obtenció d'informació molt valuosa sobre l'estructura genètica d'espècies dels microorganismes marins que no presenten gaire variabilitat morfològica, tot i que són els principals actors en els cicles biogeoquímics dels ecosistemes marins (Countway, 2005; Massana, 2006).

## Material i Mètodes

### Mostreig

El mostreig es va dur a terme a l'Observatori Microbià de la Badia de Blanes (OMBB), a la costa catalana, al nord oest del Mediterrani (41° 40' N, 2° 48' E) el mes de maig del 2006. La zona es troba a 800 m de la costa i té un fons de sorra a uns 20 m de fondària. L'aigua de mar es prefiltra a la barca amb una malla de 200µm, per tal d'eliminar partícules en suspensió i els organismes de talles superiors a la malla, i es guarda en ampolles de 25 l de plàstic per un temps no superior a les dues hores, mentre es transporta fins al laboratori, a Barcelona (Schauer et al. 2003). Per obtenir la biomassa microbiana menor de 3 µm (fracció picoplanctònica), es filtren entre 5 i 15 l d'aigua de mar gravitacionalment a través d'un filtre de Policarbonat (Millipore, EUA) de 3 µm de mida de porus. Per a aquelles mostres que s'hagi d'extreure l'ADN, es farà una segona filtració amb un filtre Sterivex (Duapore, Millipore, EUA) de 0,2 µm. En ambdós casos, l'equip Sterivex s'omple amb 1,8 ml de lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl i 0,75 M sucrosa) i es guarda a -80°C fins a la seva extracció.

### Experiment

Un cop l'aigua està filtrada i només conté microorganismes entre 0,2 i 3 µm, es creen les cinc condicions d'enriquiment en ampolles de plàstic, amb dues rèpliques per a cada una: no afegint res (O), incorporant extracte de llevat al 0,1 i 1% (L i M, respectivament), extracte d'arròs (R), i una concentració coneguda de nutrients C:N:P = 106:16:1 (P). Per a la condició O, en temps zero, s'agafen uns 200 µl per a extreure'n els àcids nucleics (veure apartat següent). Posteriorment s'incuben totes les ampolles en fosc durant 8 dies, i cada dia s'analitza la quantitat de PFH que hi ha. En el pic de màxim creixement de flagel·lats, basant-se en comptatges de DAPI realitzats prèviament (del Campo et al, dades no publicades), s'agafen uns 200 µl de cada una de les cinc condicions d'enriquiment per a extreure'n els àcids nucleics. El pic màxim de PFH per a l'enriquiment O va ser el dia 3 (a partir d'ara O3), per al L el 5è dia (L5), per a l'M 7 dies (M7), l'R als 5 dies (R5) i el P al cap de 7 dies (P7).

### Extracció d'àcid nucleic

Primerament s'afegeix lisozim, fins obtenir una concentració final d'1 mg/ml, i s'incuben els filtres a 37°C durant 45 minuts. Després s'addiciona sulfat dodecil de sodi (concentració final 1%) i proteïnasa K

(concentració final 0,2 mg/ml) i s'incuben els filtres a 55°C durant 60 min. Els lisats s'extreuen dues vegades mitjançant extraccions amb igual volum de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1), descartant la fase orgànica i conservant la fase aquosa, que és la que conté els àcids nucleics; el fenol residual s'elimina amb una extracció d'igual volum de cloroform:isoamil alcohol (24:1). Finalment, els extractes de d'àcid nucleic són purificats, dessalats i concentrats amb un Centricon-100 (membrana especialment dissenyada per retenir els àcids nucleics), i després es guarden a -80°C fins que no s'analitzin.

### PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per a la DGGE, s'usen 10 ng d'ADN i els encebadors específics per a l'ADN ribosòmic (ADNr) 18S d'eucariotes EukA i EukGC-516r (Díez et al, 2001b), que amplifiquen un fragment d'aproximadament 560 parells de bases. La reacció (de 50 µl) de PCR conté: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; el tampó de PCR que se subministra amb l'enzim; cada dNTP (A, T, C, G) a una concentració de 200 µM; cada encebador a una concentració de 0,5 µM i 1,25 unitats de *Taq* DNA polimerasa (Promega, EUA). Les reaccions tenen lloc en un termociclador (Thermo Electron Corporation, EUA) amb els cicles següents: desnaturalització inicial a 94°C durant 130 segons, seguit per 35 cicles de desnaturalitzacions a 94°C durant 30 segons, acoblament a 56°C i 45 segons, i extensió a 72°C durant 130 segons. Al final s'afegeix un últim cicle a 72°C durant 10 minuts per completar l'extensió de les cadenes.

Per a les biblioteques de clons s'amplifica el gen ADNr 18S (de 800 parells de bases), amb els encebadors específics EukA i EukB (la seqüència es detalla a Díez et al, 2001b). La barreja de PCR (100 µl) conté: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; el tampó de PCR que se subministra amb l'enzim; cada dNTP (A, T, C, G) a una concentració de 200 µM; cada encebador a una concentració de 0,5 µM i 1,25 unitats de *Taq* DNA polimerasa (Promega, EUA). Les reaccions tenen lloc al termociclador amb els cicles següents: una desnaturalització inicial a 94°C durant 3 minuts, 30 cicles de desnaturalitzacions a 94°C i 45 segons, acoblament a 55°C durant un minut, extensió a 72°C i 3 minuts, i una extensió final a 72°C durant 10 minuts.

Per comprovar els resultats de la PCR, es realitza una electroforesi amb una alíquota del producte de la PCR en un gel d'agarosa a l'1%, es tenyeix amb bromur d'etidi (aquest colorant s'intercala entre les bases dels àcids nucleics i els fa visibles a la llum UV). Es resultats es visualitzen en un aparell de captació d'imatge i es quantifica utilitzant *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA).

### DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La DGGE s'ha dut a terme al sistema DGGE-2000 (CBS Scientific Company, EUA), tal com s'ha descrit anteriorment (Muyzer et al, 1997). L'electroforesi s'ha realitzat amb un gel de poliacrilamida al 6% i de 0,75 mm de gruix (la proporció d'acrilamida i bisacrilamida era 37,5:1) submergit en un tampó de TAE 1x (40 mM Tris, 40 mM àcid acètic, 1 mM EDTA, a pH 7,4) i a una temperatura de 60°C. Aproximadament, entre 800 i 1000 ng de producte de PCR es carrega a cada pou individual del gel i es deixa córrer 16 hores a 100 volts. El gradient de la DGGE s'elabora barrejant solucions de 45 i 65% d'agents desnaturalitzants. El gel es tenyeix amb SybrGold (Molecular Probes, Invitrogen, EUA) durant 45 minuts, s'esbandeix amb el tampó de TAE 1x i es visualitzen els fragments d'ADN amb llum ultraviolada (UV) en un equip de captació d'imatge, Chemidoc (Bio-Rad, EUA), acoblat a un ordinador. Amb el programa Quantity One (Bio-Rad, EUA) s'obtenen imatges d'alta resolució que permeten detectar les bandes de DGGE, quantificar la seva intensitat i identificar la mateixa posició a través del gel.

### Biblioteques de clons

Per la construcció i anàlisi de les biblioteques genètiques de l'ADNr 18S es va seguir la metodologia descrita a Díez et al, 2001a. Després d'haver fet la PCR els productes de PCR es netegen amb l'equip de

purificació QIAGEN PCR (Qiagen, EUA) i són clonats amb l'equip de clonatge TOPO-TA (Invitrogen, EUA), seguint les recomanacions del fabricant. El producte clonat (és a dir, el nostre insert dintre del plasmidi) és introduït a les cèl·lules competents mitjançant transformació per xoc tèrmic. Un cop transformades, les cèl·lules es sembren en plaques amb medi sòlid LB-agar on també s'ha afegit l'antibiòtic kanamicina, i es deixen créixer a 37°C tota la nit. Les colònies blanques que creixin, es transfereixen a una placa de 96 pous amb medi líquid LB i glicerol al 7% (que actua com a crioprotector), i després es guarda a -80°C; es pot utilitzar successives vegades.

### Seqüenciació

Els productes de PCR de cada clon són purificats amb l'equip de purificació QIAquick (QIAGEN, EUA) i quantificats en un gel d'agarosa. Posteriorment es procedeix a la reacció de seqüenciació, en què s'utilitzen entre 10 i 20 ng del producte de PCR purificat, l'encebador 528f, l'equip de seqüenciació Bigdye Terminator Cycle v2.0 (PE Biosystems, EUA) i un seqüenciador automàtic ABI PRISM model 377 v3.3 (PE Biosystems, EUA).

### Anàlisi de seqüències

Les seqüències obtingudes es comparen amb una base de dades pública, utilitzant l'algoritme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al, 1997) per determinar l'afiliació filogenètica.

## Resultats

La diversitat de PFH s'analitza, primerament, fent una DGGE de tots els enriquiments (amb dues rèpliques per a cada un d'ells), i amb la mostra O0 (que correspon a aigua de mar sense incubar) i se'n fa una fotografia. Aquesta, mostra les 11 mostres corregudes en un mateix gel, amb les bandes corresponents (veure Figura 1).

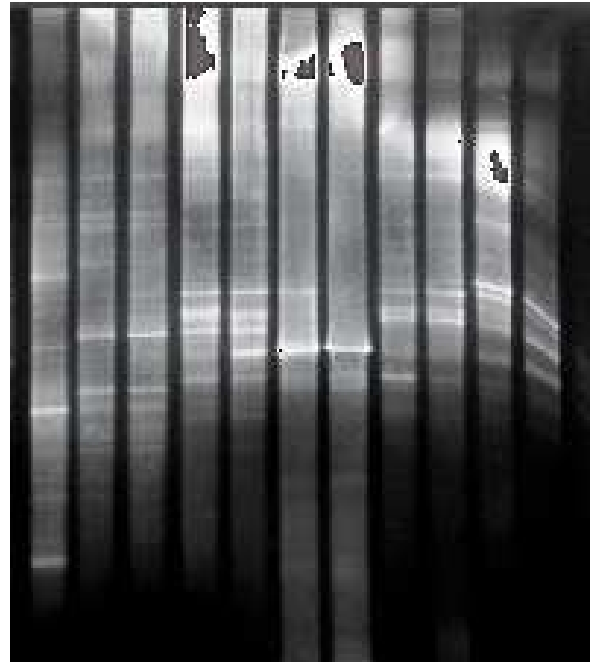
L'anàlisi del gel dona un total de 145 bandes repartides en 39 posicions diferents; el nombre de bandes per mostra varia entre 6 (M7) i 19 (O0 i O3), sent la mitjana de 13. Hi ha bandes que només es troben en un enriquiment, per exemple a la mostra O0 hi ha 16 bandes úniques (la 3, 6, 10, 12, 16, 21, 23, 28, 31-35 i 37-39), a la M n'hi ha només una (la 36), a la P n'hi ha quatre (la 5, 17, 24 i 29), i les altres no en tenen. Alhora, també hi ha bandes on apareixen a totes les condicions, com són la 2 i la 14.

Per obtenir informació filogenètica dels PFH, es realitzen biblioteques de clons a partir de l'ADNr 18S de cada un dels cinc enriquiments. Analitzant-les, trobem que a la biblioteca O3 hi ha 21 clons positius que pertanyen a 11 organismes diferents, entre els quals 8 encara no s'han cultivat (veure Taula 1): M4\_18BD7, UEPAC41p3, UEPAC48p3, NAMAko-14, BL010320.6, CD8.15, G03N10 i E222. Els 21 clons estan compresos en quatre grups filogenètics: Prasinofícies, Crisofícies, Cercozous, Nous Alveolats II i Nous Estramenòpils Marins (MAST), sent les crisofícies el grup més abundant (veure Figura 2). MAST correspon a *marine stramenopile*, descrits per primera vegada per Massana et al, 2004a.

a) O0 OA3 OB3 LA5 LB5 MA7 MB7 RA5 RB5 PA7 PB7



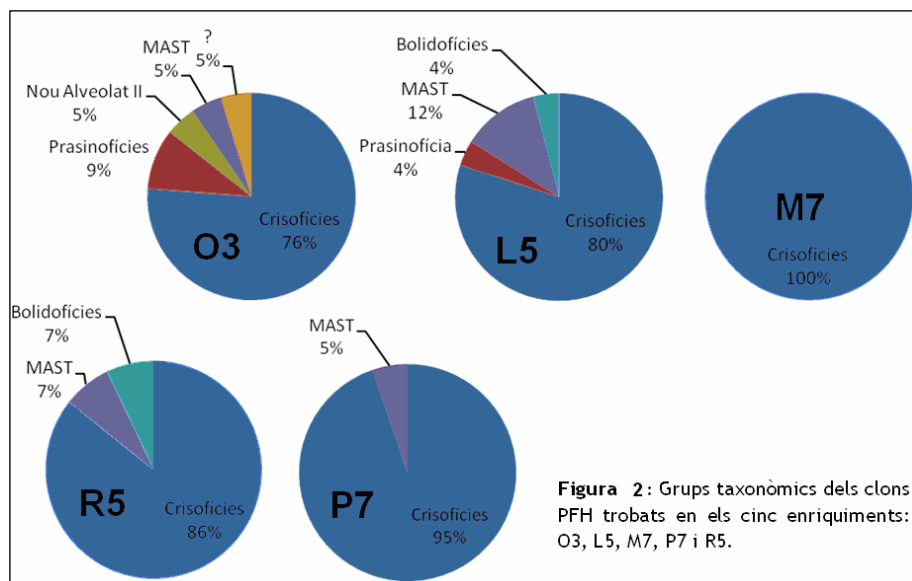
b) O0 OA3 OB3 LA5 LB5 MA7 MB7 RA5 RB5 PA7 PB7



19 19 19 12 12 6 6 14 14 12 12 Número de bandes

**Figura 1:** Fotografies del mateix gel de DGGE per a cada enriquiment, amb les bandes marcades en verd (a) i sense marcar (b). La primera columna correspon a O0, després hi ha dues rèpliques de O3, L5, M7, R5 i P7, respectivament. Les lletres A i B indiquen de quina rèplica es tracta.

A la figura 1a) es mostren en verd les bandes de cada línia, amb el seu número corresponent, fins a un total de 39 posicions diferents. A la figura 1b) es mostra la morfologia de les bandes.



**Figura 2:** Grups taxonòmics dels clons PFH trobats en els cinc enriquiments: O3, L5, M7, P7 i R5.

La biblioteca L5 conté 25 clons positius que corresponen a 11 organismes diferents (veure Taula 1). D'entre aquests, sis no han estat cultivats al laboratori: RA000907.57, C2-E018, IND60.8, UEPAC1p5, LG21-05 i E222. Els organismes d'aquesta biblioteca estan agrupats en 4 grups filogenètics: les crisofícies, els MAST (4, 7 i 8), les prasinofícies i les bolidofícies; sent les primeres el grup dominant (veure Figura 2).

	Total	Crisofícia	MAST	Prasinofícia	Bolidofícia	Nou Alveolat II	Cercozou
<b>O3</b>	21 (11) <b>13 (8)</b>	16 (7) <b>10 (6)</b>	1 (1) <b>1 (1)</b>	2 (1) -	- -	1 (1) <b>1 (1)</b>	1 (1) <b>1 (1)</b>
<b>L5</b>	25 (11) <b>7 (6)</b>	20 (6) <b>4 (3)</b>	3 (3) <b>3 (3)</b>	1 (1) -	1 (1) -	- -	- -
<b>M7</b>	20 (3) -	20 (3) -	- -	- -	- -	- -	- -
<b>R5</b>	14 (4) <b>2 (2)</b>	12 (2) -	1 (1) <b>1 (1)</b>	- -	1 (1) <b>1 (1)</b>	- -	- -
<b>P7</b>	19 (5) <b>1 (1)</b>	18 (4) -	1 (1) <b>1 (1)</b>	- -	- -	- -	- -

**Taula 1:** Clons trobats a cada biblioteca, segons el grup filogenètic al que pertanyen. Entre parèntesi hi ha el nombre de clons diferents de cada categoria. En negreta apareixen els clons no cultivats.

A la biblioteca M7 s'han trobat 20 clons positius corresponents a tres microorganismes diferents (veure Taula 1): *Oikomonas* sp. SA-2.1, *Paraphysomonas imperforata* i *Paraphysomonas foraminifera*, tot i que bàsicament només hi ha *Oikomonas*. Tots tres han estat cultivats al laboratori. En aquesta biblioteca, M7, tots els organismes pertanyen al mateix grup filogenètic: les crisofícies (veure Figura 2).

La biblioteca R5 conté 14 clons positius corresponents a quatre organismes diferents (veure Taula 1): *Paraphysomonas imperforata*, *P. foraminifera*, IND60.8 i NOR46.20. Els dos últims encara no són cultivables al laboratori. *Paraphysomonas* és una crisofícia, mentre que els altres dos clons no cultivables corresponen al grup filogenètic MAST-4 i a les bolidofícies, respectivament (veure Figura 2).

A la biblioteca P7 s'han trobat 19 clons positius corresponents a 5 microorganismes diferents (veure Taula 1): *Paraphysomonas imperforata*, *P. foraminifera*, *Spumella* 1006, *Spumella* JBA536 i el clon no cultivat BAQA232. *Paraphysomonas* domina aquesta biblioteca. El grup filogenètic majoritari és el de les crisofícies, però també es pot observar el grup dels MAST-1 (veure Figura 2).

Ja s'ha obtingut la composició de picoflagel·lats heterotròfics (PFH) que hi ha a cada condició d'enriquiment, però per poder-los comparar entre sí cal saber la seva diversitat. Una manera és calculant l'índex de Shannon (Shannon, 1948) per a cada enriquiment (veure Taula 2).

	O	L	M	R	P
<b>Índex Shannon</b>	2,227	1,774	0,731	0,707	1,236

**Taula 2:** Índexs de Shannon per a cada condició d'enriquiment (O, L, M, R i P)

## Discussió

L'objectiu d'aquest article és comprendre millor les xarxes tròfiques microbianes, concretament el paper dels PFH al bucle microbià. Per aquest motiu s'ha determinat la diversitat d'aquests organismes a les aigües marines; i s'ha fet mitjançant tècniques moleculars i de cultiu, per poder-les comparar entre sí.

Tota tècnica molecular emprada presenta certes limitacions, però tant la DGGE com les biblioteques de clons permeten determinar la diversitat. Per exemple, en una DGGE hi ha poca informació de la seqüència (les bandes són curtes i variables) i poca resolució en la separació de bandes molt properes. Tot i això, la DGGE és útil per determinar l'afiliació filogenètica extensa, però inadequada si es vol un anàlisi precís. Tot i aquestes limitacions, el número de bandes obtingudes en l'anàlisi de la DGGE mostra la diversitat dels diferents microorganismes.

Les biblioteques de clons s'han convertit en una tècnica molt utilitzada a l'hora d'analitzar la diversitat de microorganismes sense necessitat d'emprar mètodes de cultiu (Sogin 1989; Giovannoni et al, 2000; DeLong et al, 2001). Aquesta metodologia presenta l'avantatge que és relativament senzill amplificar, clonar i seqüenciar mostres ambientals. A més, les seqüències d'ADN mostren informació sobre la riquesa d'espècies, així com de la identitat dels diferents grups filogenètics; i posseeixen suficient variabilitat que permeten diferenciar entre grups filogenètics a nivell d'espècie (o quasi), tot i considerar només seqüències parcials. Per altra banda, són costoses monetàriament, requereixen de molt temps per a realitzar-se i hi ha una limitació pràctica del nombre de biblioteques que es volen dur a terme i seqüenciar.

Primer de tot cal dir que a la DGGE, les dues rèpliques de cada enriquiment (A i B) han sortit idèntiques (veure Figura 1), és a dir, no hi ha hagut problemes amb la tècnica. Per tant, a partir d'ara es consideraran com una sola mostra sense tenir en compte les rèpliques.

Hi ha dues bandes presents a totes les condicions, que indiquen que el fet d'incubar no malmet els organismes, i que aquests es mantenen en l'hàbitat artificial semblant al seu que se'ls hi ha proporcionat.

La diversitat a l'enriquiment O és alta, ja que aquest mostra el màxim de bandes de DGGE (19 bandes) (veure Figura 1), el seu índex de Shannon és el més elevat (2,227) (veure Taula 2) i és on hi ha més grups filogenètics diferents (veure Figura 2). Per altra banda, a mesura que augmenta la concentració de matèria orgànica disminueix la diversitat. Es pot veure comparant els enriquiments L i M. L'M té més matèria orgànica i menor nombre de bandes de DGGE (veure Figura 1), un índex de Shannon menor (0,731 enfront de 1,774 de l'L) (veure Taula 2) i només està format per un grup filogenètic (veure Figura 2). Aquesta disminució de la diversitat va acompanyada d'un augment de la presència de *Paraphisomonas*, sobretot *P. imperforata* (dades no mostrades), podent arribar fins al 98% de picoflagel·lats, però representa menys d'un 1% dels PFH als ecosistemes naturals (Diez et al, 2001a).

El biaix de cultiu pot explicar perquè disminueix la diversitat de PFH en presència de matèria orgànica afegida, sobretot d'organismes no cultivats. En addicionar nutrients, els bacteris poden créixer molt i ràpidament, fent que puguin assolir mides més grans que al medi natural. D'aquesta manera, els seus depredadors, els petits flagel·lats, no poden consumir-los; només ho podran fer els més grans, per tant, variarà la composició de les mostres naturals (Giovannoni, 1990; Lim et al, 1999). D'aquesta manera, s'explica perquè els flagel·lats heterotròfics cultivats són escassos a les mostres moleculars (tenen baixa abundància *in situ*) i perquè aquestes mostres recullen organismes no cultivats. Un exemple d'aquest biaix s'obté quan es cultiva amb extracte de llevat, els bacteris augmenten la seva abundància en dos ordres de magnitud, i poden arribar fins a  $10^8$  cèl·lules/ml (Massana et al, 2006a).

També es pot observar com preval la concentració enfront del tipus de matèria orgànica amb els índex de Shannon (veure Taula 2), on els enriquiments M i R tenen un índex molt semblant (al voltant de 0,7) i tenen un 1% d'extracte de llevat i d'arròs, respectivament. A més a més, els enriquiments L i M (ambdós amb extracte de llevat) tenen índexs més diferents: 1,774 i 0,731, respectivament.

Per altra banda, veiem que a l'enriquiment O0 s'hi presenten la majoria de les bandes de DGGE úniques (són aquelles que només es troben en una mostra), concretament n'hi ha 16, mentre que a les altres pràcticament no n'hi ha (veure Figura 1). Això indica que el fet d'incubar aigua marina durant uns dies, encara que sigui sense afegir matèria orgànica (com a l'enriquiment O), altera la composició de flagel·lats que hi podria haver a les mostres.

Observant els clons trobats a cada biblioteca (veure Taula 1) es veu que hi ha més flagel·lats no cultivats a l'enriquiment O (13 clons) que a cap altra biblioteca. També s'han trobat resultats semblants en d'altres estudis recents (Moon-van der Staay et al, 2001; Countway et al, 2005; Massana et al, 2006a i b;), que indiquen que al picoplàncton hi ha organismes que representen noves línies filogenètiques o encara no descrites; alguns dels quals podrien correspondre als clons no cultivats que s'han trobat a les nostres biblioteques.

Les crisofícies són un grup d'organismes que conté flagel·lats fototròfics, mixotròfics i heterotròfics, de gran diversitat, i que tan poden ser cultivades com no cultivades. Un fet important és la dominància d'aquestes crisofícies en tots els enriquiments (veure Taula 1 i Figura 2), amb un mínim del 76% (biblioteca O) fins a arribar al 100% (biblioteca M) de presència dins els PFH. En altres estudis de la zona de Blanes (Massana et al, 2006a i b; Massana et al, 2004b) no és així: dominen els MAST, els nous alveolats i en menor mesura es troben les crisofícies. Hi ha dues hipòtesis que podrien explicar aquest fet. Per una banda, una entrada d'aigua dolça i sediments del riu Tordera, aportant nutrients al mar; i per altra banda, una entrada d'aigua oceànica (rica en nutrients i de salinitat elevada) a través del canó de Blanes. En ambdós casos hi hauria una aportació extra de matèria orgànica a la zona d'estudi. Les crisofícies, tot i ser organismes d'ambients oligotròfics, poden viure en concentracions més altes de nutrients que els MAST (Pringsheim, 1952), per tant, dominaran les crisofícies enfront dels altres organismes (MAST i nous alveolats).

Els MAST són un altre grup d'organismes amb importància dins les biblioteques analitzades (veure Figura 2). Considerant la seva relativa abundància, els MAST podrien ser els responsables del 10% de la remineralització de nutrients de les àrees superiors dels oceans (Massana et al, 2006b). A més a més, també tenen un paper clau en les xarxes tròfiques com a consumidors de bacteris i com a aliment de zooplàncton més gran (Massana et al, 2004b). En totes les biblioteques apareixen (amb excepció de la M); però no tots els MAST hi són presents (hi ha fins a 12 línies filogenètiques diferents), sinó que només apareixen els MAST-1, 4, 7 i 8. Els MAST-1, 4 i 7 representen el 74% de tots els MAST (hem trobat els més abundants) i corresponen a organismes encara no cultivats, amb distribucions globals, trobats tan a mar obert com en ambients costaners i abundàncies significatives a tots els mars i oceans (Massana et al, 2004; 2006a i b). La seva presència és menor que en altres estudis (Massana et al, 2004; 2006a i b), per l'entrada d'aigua oceànica rica en nutrients a través del canó de Blanes, tal com ja s'ha comentat anteriorment.

Les prasinofícies són algues verdes primitives que no s'haurien de trobar a les nostres biblioteques perquè no poden viure sense la seva font principal d'energia: la llum (Moon-van der Staay et al, 2001). I les nostres mostres s'han incubat a la foscor, inhibint el creixement d'aquests organismes, per tant, la seva presència és accidental.

## Conclusions

La diversitat de PFH és alta a l'enriquiment O, sobretot a l'aigua sense incubar (O0), i va disminuint a mesura que augmenta la concentració de matèria orgànica afegida, independentment del tipus d'extracte de què es tracti (llevat o arròs).



El biaix de cultiu és important: es detecta un augment d'organismes cultivables en presència de matèria orgànica afegida (enriquiments M, L, R i P); i se'n detecten més de no cultivats quan no n'hi ha (O).

La incubació d'aigua marina en fosc altera la composició de microorganismes de la comunitat.

La dominància de crisofícies en detriment dels MAST es deu a l'entrada d'aigua oceànica rica en nutrients a través del canó de Blanes.

L'aparició d'organismes fototròfics com les prasinofícies és accidental.

Els enriquiments ajuden a descobrir les propietats biològiques i els requeriments de creixement, i poden ser utilitzats com a primers passos en d'altres intents de cultivar organismes no cultivats fins ara, però no serà possible determinar el paper ecològic dels organismes desconeguts fins que no hi hagi més seqüències ambientals analitzades, ja que la gran diversitat de PFH ha d'anar lligada a un gran ventall de rols funcionals, i és necessària més investigació per aconseguir-ho.

## Referències

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

Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263

Countway PD, Gast RJ, Savai P, Caron DA (2005) Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubations in the western north atlantic. *J Eukaryot Microbiol* 52:95-106

DeLong EE, Pace NR (2001) Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Syst Biol* 50:470-478

Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh TL, Massana R (2001b) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 67:2942-2951

Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R (2001a) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* 67:2932-2941

Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63

Giovannoni SJ, Rappe M (2000) Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. Dins de: Kirchman DL (ed) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley & Liss. New York, p 47-84

Jürgens K, Güde H (1990) Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Marine Ecology Progress Series* 59: 271-284

Laybourn – Parry J, Parry J (2000) Flagellates and the microbial loop. Dins de: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates. Unity, diversity and evolution*. Taylor & Francis Press, London, p 216-239

Lim EL, Dennet MR, Caron DA (1999) The ecology of *Paraphisomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnol Oceanogr* 44:37-51

- Massana R, Castresana J, Balagué V, Guillou L, Romari K, Groisillier A, Valentin K, Pedrós-Alió C (2004a) Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Appl Environ Microbiol* 70:3528-3534
- Massana R, Guillou L, Terrado R, Forn I, Lovejoy C, Pedrós-Alió C (2006a) Growth of uncultured heterotrophic flagellates in unamended seawater incubations. *Aquat Microb Ecol* 45:171-180
- Massana R, Terrado R, Forn I, Lovejoy C, Pedrós-Alió C (2006b) Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. *Environmental Microbiology* 8:1515-1522
- Massana R, Valagué B, Guillou L, Pedrós-Alió C (2004b) Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 50:231-243
- Massana, R (2006) El picoplàncton marí, reserva d'organismes i funcions. *Omnis cellula* 10:19-24
- Moon-van der Staay SY, De Watcher R, Vaulot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplàncton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409: 607-610
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Dins de: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (ed.) *Molecular microbial ecology manual*, Kluwer Academia, Dordrecht, p 1-27
- Pringsheim EG (1952) On the Nutrition of *Ochromonas*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 93:71-96
- Schauer M, Balagué V, Pedrós-Alió C, Massana R (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat Microb Ecol* 31:163-174
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* 27:379-656
- Sogin ML (1989) Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am Zool* 29:487-499