

# EL PICOPLÀNCTON MARÍ, RESERVA D'ORGANISMES I FUNCIONS

Escrit per:

**Ramon Massana Molera**

Institut de Ciències del Mar, CSIC.

Barcelona

El plàncton marí està format pel conjunt d'organismes –de mides, tipus tròfics i afiliacions taxonòmiques variades– que viuen en suspensió en la columna d'aigua. S'ha estimat que el fitoplàncton és responsable de la meitat de la producció primària del planeta. Aquesta enorme producció pot fluir a través de la cadena d'herbívoros (zooplàncton i peixos), circular per la xarxa tròfica microbiana (bacteris i protozous) o sedimentar de la capa fòtica. La importància relativa d'aquestes tres vies, en general modulada per la disponibilitat de nutrients conseqüència de processos hidrodinàmics, té grans repercussions per als recursos pesquers, la bomba biològica del carboni i la regulació del clima. Els microorganismes ( $< 200 \mu\text{m}$ ) són els principals participants del metabolisme del sistema marí, tant del cicle biogeoquímic del carboni (producció i respiració) com dels altres cicles. Gran part d'aquest metabolisme està mitjançat per microor-

ganismes molt petits (de  $0.2$  a  $2 \mu\text{m}$ ) i relativament desconeguts, el picoplàncton (Sherr & Sherr 2000). Es té una idea força bona de l'abundància i activitat d'alguns tipus de picoplàncton que es poden reconèixer fàcilment (bacteris, cianobacteris, protistes fototròfics i heterotròfics, Fig. 1), que es tracten com a grups homogenis que suposadament funcionen de manera similar. Tanmateix, cadascun d'aquests tipus inclou una enorme diversitat, tant filogenètica (diferents espècies) com funcional (cada espècie pot ocupar un nínxol ecològic diferent), que queda sovint amagada sota una notable uniformitat morfològica. En aquest article presentaré i discutiré breument alguns avanços recents sobre la diversitat (dècada dels noranta) i la funció (segle XXI) del picoplàncton marí. Aquests avanços estan aportant un coneixement fonamental per a la millor comprensió del funcionament dels ecosistemes marins (Karl 2002).



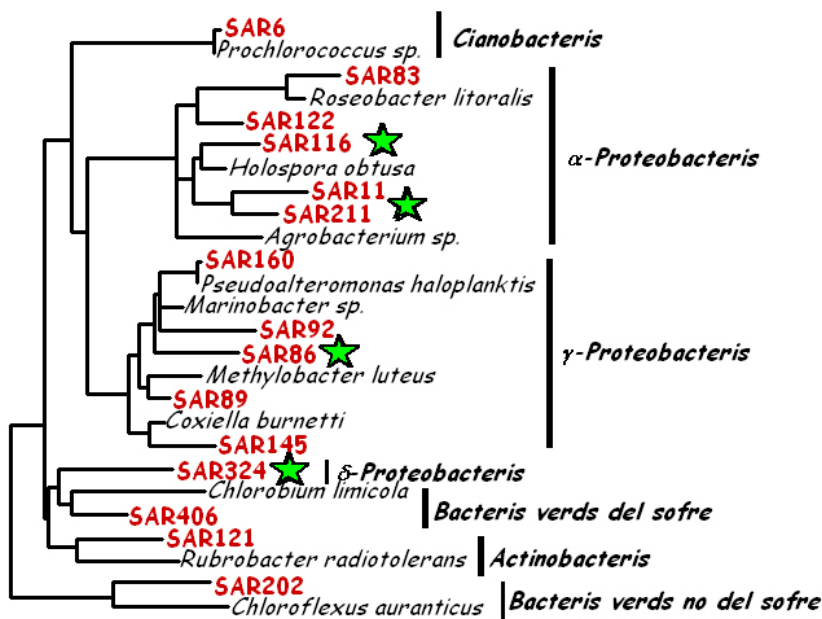
**Figura 1.** Fotografies de representants del picoplàncton marí fetes amb diferents tècniques microscòpiques. A i B) Comunitat natural de bacteris marins observats mitjançant microscòpia d'epifluorescència. Els bacteris de la figura A són semblants entre si (al voltant de 0.5  $\mu\text{m}$  de diàmetre) mentre que els de la Fig. B presenten morfologies diverses (cocs, bacils, filaments). C i D) Cultius observats per contrast de fases de diferents algues unicel·lulars d'aspecte similar: una pelagofícia de 3  $\mu\text{m}$  de diàmetre (C) i una alga verda de 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre (D). E i F) Flagel·lats heterotròfics no identificats observats per epifluorescència (E) i per contrast de fases (F). G i H) Prasinofícies d'1 a 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre observades per microscòpia electrònica de transmissió: Micromonas (G) i Pseudosourfieldia (H).

En ciències en general, i en ecologia microbiana en particular, canvis en paradigmes han derivat sovint de desenvolupaments tecnològics que permeten explorar parcel·les de la realitat ocultes fins aquell moment. Així, la importància dels bacteris marins es va posar de manifest gràcies a la microscòpia d'epifluorescència, la citometria de flux i mètodes d'estimació d'activitat amb marcadors radioactius. Però potser cap d'aquests mètodes ha arribat tant lluny com l'aproximació molecular, ja que cada organisme porta escrit en el seu genoma la seva càrrega metabòlica, adaptativa i evolutiva. La comparació de les seqüències de gens universals (com l'rRNA de la subunitat petita del ribosoma) ha permès reconstruir la història evolutiva de tots els éssers vius. I el lligam amb l'ecologia microbiana és que es poden utilitzar aquests coneixements filogenètics per a identificar gens aïllats directament de la comunitat natural. Aquesta aproximació es va aplicar per primer cop per a estudiar la diversitat del bacterioplàncton del

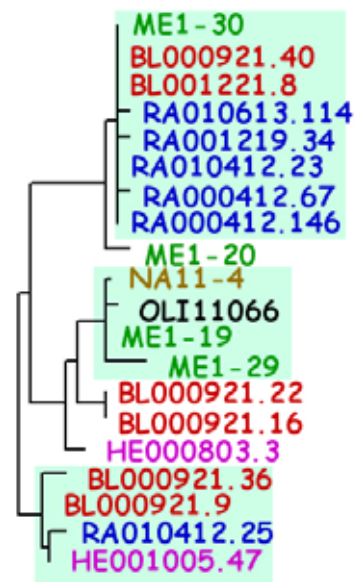
Mar dels Sargassos (Fig. 2) i els resultats foren espectaculars: la majoria de les seqüències que es van trobar no es corresponien amb les de bacteris coneguts (Giovannoni et al. 1990). Poc després es van detectar les arquees marines (DeLong 1992). Fins aquell moment, només s'havien trobat arquees en ambients extrems, de manera que no s'esperava la seva presència en el mar. No només es van trobar arquees marines, sinó que treballs posteriors van demostrar que n'hi havia una abundància insospitada en el plàncton marí. Malgrat els èxits evidents en els estudis de bacteris i arquees, es va haver d'esperar més de deu anys per a obtenir informació similar sobre el picoplàncton eucariòtic marí, i també en aquest grup es va trobar una gran participació d'organismes desconeguts (Díez et al. 2001).

Una de les propietats que semblen ser universals en el picoplàncton és que les seqüències ambientals s'associen formant grups de seqüències molt semblants però rarament idèntiques (Fig. 3).

Aquest fenomen, conegut com microdiversitat, es pot explicar segons models d'especiació per a organismes asexuals que consideren la selecció natural com a força de cohesió (Cohan 2002). Aquestes seqüències semblants però no idèntiques (>99% en el rDNA 16S), correspondrien a organismes que han divergit per deriva genètica neutral però que ocupen el mateix nínxol ecològic i pertanyen a la mateixa espècie (Acinas et al. 2004). Organismes lleugerament més distants serien ja de diferents espècies. El cianobacteri marí *Prochlorococcus* ofereix un bon exemple d'aquest darrer cas, ja que presenta ecotipus (i per tant diferents espècies) adaptats a diferents fondàries amb una similitud típica de 97% en l'rDNA. L'aproximació molecular també permet estudiar la variabilitat de les comunitats naturals al mar. Així s'ha vist que les comunitats del picoplàncton són relativament estables a nivell espacial a la mateixa fondària, i en general segueixen les propietats ambientals i biogeoquímiques de les diferents masses d'aigua.



**Figura 2.** Reconstrucció filogenètica que mostra les seqüències del gen rRNA 16S obtingudes directament d'una mostra de bacterioplàncton del Mar dels Sargassos (en vermell) amb seqüències de referència de bacteris cultivats (en negre). Els grups marcats amb un estel verd són nous linatges que no estan representats en cap col·lecció de cultiu. Modificat a partir de Giovannoni et al. 1990.

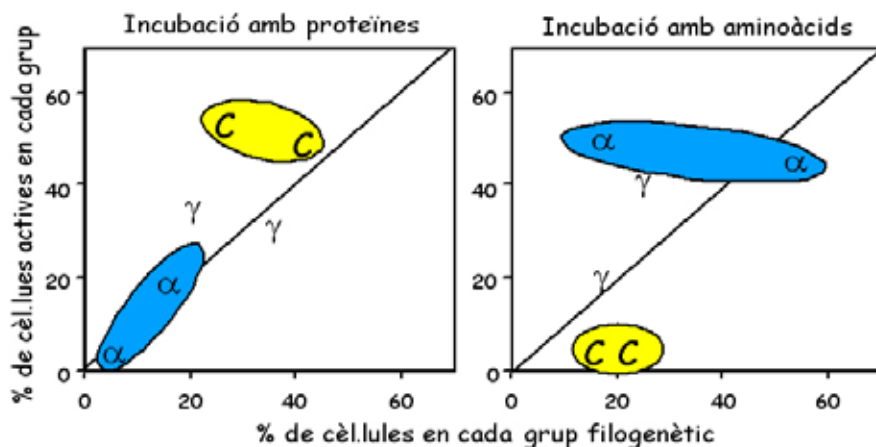


**Figura 3.** Reconstrucció filogenètica de seqüències del gen rRNA 18S de picoplàncton eucariòtic marí molt relacionades entre si que pertanyen al grup MAST-4 (Massana et al. 2002). Les seqüències provenen de sistemes molt distants: el Mediterrani al Mar d'Alborán (ME) i a la costa de Blanes (BL), la costa de la Bretanya (RA), el Mar del Nord (HE), l'Atlàntic Nord (NA) i el Pacífic Equatorial (OLI). Els grups emmarcats en blau corresponen a seqüències amb una alta similitud (>99%) i correspondrien, doncs, a organismes de la mateixa espècie segons el model d'evolució neutral i cohesió per selecció natural (Cohan 2002 i Acinas et al. 2004).

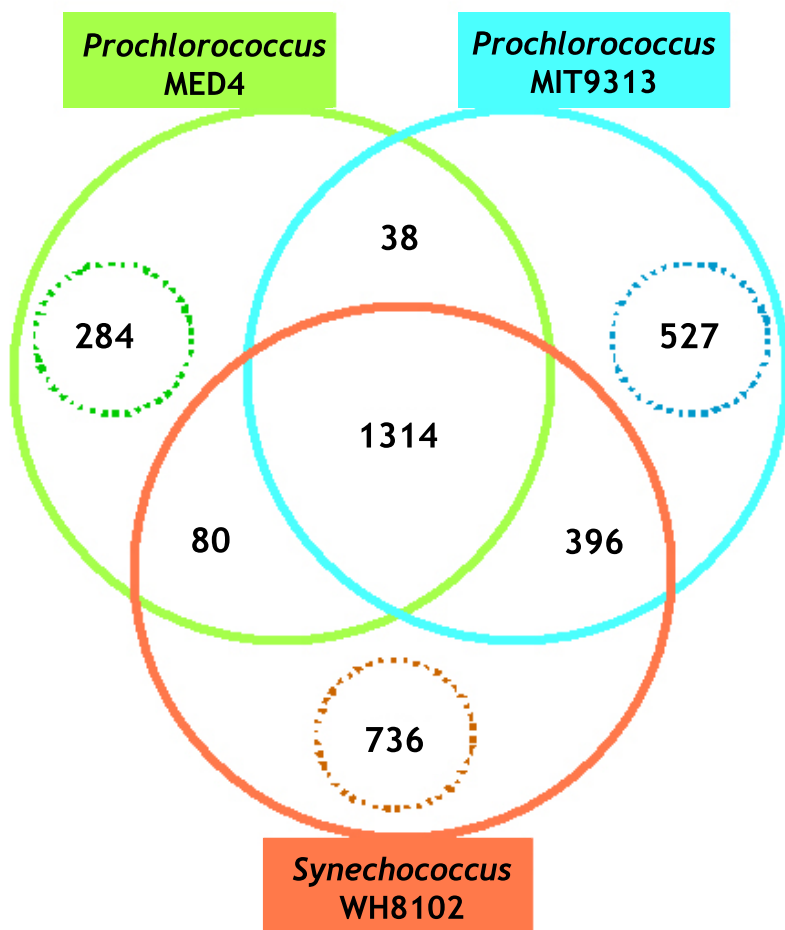
Un cop s'ha vist que el picoplàncton està format per comunitats tant diverses (i sovint amb nous organismes), esdevé fonamental investigar la funció de cadascun dels seus membres. De fet, els intents per relacionar diversitat i funció han estat presents des dels primers estudis de diversitat microbiana, però és només en els darrers anys que s'estan obtenint resultats interessants, sobretot a partir de tres aproximacions complementàries. Primer, és evident que els mètodes clàssics fallen en el cultiu dels organismes típics de les comunitats naturals, i per tant s'han establert noves formes de cultivar amb la filosofia de recrear millor l'ambient natural, típicament pobre en nutrients. S'han tingut èxits insospitats com el primer cultiu d'un representant del grup SAR11, el paradigma del bacteri marí abundant i no cultivat (Rappé et al. 2002). El SAR11 és un bacteri petit, de creixement lent, que no arriba a concentracions elevades i que s'inhibeix en medi de cultiu ric: el típic habitant del medi oligotròfic marí. La segona aproximació per relacionar diversitat i funció consisteix en incubar la comunitat natural amb un precursor metabòlic marcat i després determinar quina població l'incorpora. Mitjançant MICROFISH, una combinació de mi-

croautoradiografia i tinció cel·lular amb sondes moleculars específiques, s'ha establert que la descomposició de la matèria orgànica és una activitat conjunta de diferents poblacions bacterianes (Fig. 4): els a-proteobacteris consumirien aminoàcids mentre que les Cytophagals consumirien proteïnes (Cottrell & Kirchman 2000). S'ha aprofitat la composició atípica dels

lípid de membrana de les arquees (basats en un enllaç èter en comptes d'èster) per a fraccionar els lípid del picoplàncton després d'una incubació



**Figura 4.** Resultats de MICROFISH amb comunitats de bacteris marins incubades amb proteïnes o amb aminoàcids. A l'eix de les "x" es representa el percentatge de bacteris dins de tres grups filogenètics:  $\alpha$ -proteobacteris ( $\alpha$ ),  $\gamma$ -proteobacteris ( $\gamma$ ) i Cytophagals (C). A l'eix de les "y" es mostra la distribució de cèl·lules actives (que han incorporat proteïnes o aminoàcids radioactius) en cada un dels mateixos tres grups filogenètics. Es veu que en la incubació amb proteïnes, la majoria dels bacteris que hi creixen, i la majoria que estan actius, són Cytophagals, mentre que en la incubació amb aminoàcids els  $\alpha$ -proteobacteris són els que creixen i que estan majoritàriament actius. En el cas dels  $\gamma$ -proteobacteris no es detecta cap tendència clara. Modificat a partir de Cottrell & Kirchman 2000.



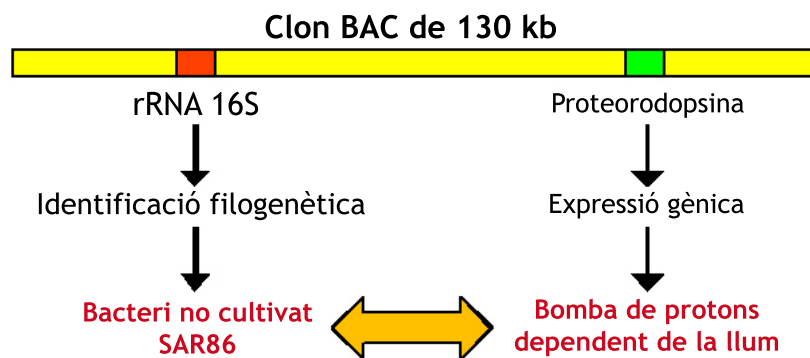
**Figura 5.** Comparació del contingut gènic (número de gens únics i compartits) entre els tres genomes seqüenciats de cianobacteris unicel·lulars marins: *Prochlorococcus* MED4 (1716 gens), *Prochlorococcus* MIT9313 (2275 gens) i *Synechococcus* WH8102 (2526 gens). Més de la meitat dels gens de cada organisme (1314 gens) són comuns pels tres i representen, doncs, gens conservats en tots els éssers vius i en cianobacteris. Els pocs gens compartits entre els dos *Prochlorococcus* són suficients per a diferenciar-los del *Synechococcus*. Hi ha una fracció significativa dels gens de cada organisme que és única (marcada en cercle).

a fons el potencial metabòlic dels organismes. La primera seqüència completa del genoma d'un ésser viu (un bacteri) es va presentar el 1995, i avui dia s'han completat prop de 300 projectes genòmics i n'hi ha més de mil en curs. Entre els genomes seqüenciats n'hi ha uns pocs d'organismes rellevants en el sistema marí, com els cianobacteris *Prochlorococcus* i *Synechococcus* (Fuhrman 2003), i la seva anàlisi comparativa pot ajudar-nos a entendre la seva adaptació i funció a la natura (Fig. 5). Hi ha una fracció important del contingut gènic que és comuna, però també una sèrie de gens que són característics de cada organisme i que portaran la capacitat d'adaptació diferencial. D'aquesta manera, podem explicar la dominància de *Synechococcus* en sistemes costaners i afloraments per ser l'únic capaç d'incorporar nitrat, i la de *Prochlorococcus* en zones oligotròfiques per la seva capacitat d'utilitzar compostos regenerats de nitrogen (amoni, urea i aminoàcids) i la seva major eficiència en la utilització de ferro. També s'ha determinat la base gènica de l'adaptació de diferents ecotipus de *Prochlorococcus* a la superfície (presència d'una fotoliasa) o en fondària (més gens de pigments o gens d'incorporació de nítrid).

Però la genòmica encara ens ofereix més possibilitats, com la d'obtenir informació genòmica directament dels sistemes naturals, sense necessitat de

amb bicarbonat-<sup>13</sup>C. Així, s'ha demostrat que les arquees marines del grup-I són quimioautotròfiques (Wuchter et al. 2003). Una altra possible aproximació consisteix en separar la comunitat mitjançant citometria de flux. D'aquesta manera s'ha vist que en condicions naturals *Prochlorococcus* pot ser mixotròfic i competir amb els bacteris heterotròfics per recursos orgànics com aminoàcids (Zubkov et al. 2004). Està clar que aquests experiments ofereixen múltiples possibilitats d'interrogar la comunitat sobre la funció de cada un dels seus components.

Paral·lelament als cultius i als experiments amb comunitats naturals, la genòmica ens ofereix la possibilitat, impensable poc temps enrera, de conèixer



**Figura 6.** Exemple de l'aplicació de la metagenòmica per a descriure una funció nova d'un bacteri no cultivat. En una biblioteca genètica feta amb un vector BAC, que permet clonar trossos grans de DNA ambiental, es va trobar un clon de 130 kb amb el gen rRNA 16S d'un bacteri no cultivat, el SAR86. La seqüenciació de tot el fragment va revelar un altre gen que s'associava amb les rodopsines, una proteïna que funciona com a bomba de protons o com a receptor sensorial. Aquest gen es va poder expressar en un sistema artificial i efectivament la proteïna generada funcionava com una bomba de protons dependent de la llum.

cultius purs, un camp d'estudi que s'ha anomenat metagenòmica, ecogenòmica o genòmica ambiental. Per una banda, és evident que no és possible obtenir en cultiu tots i cada un dels microorganismes naturals. Per l'altra, el contingut genètic d'una espècie és molt més gran que el que es troba en una soca determinada (com la que es pot seqüenciar), degut a la importància en l'evolució bacteriana de fenòmens de transferència lateral i pèrdua genètica (Rodríguez-Valera 2004). La metagenòmica ens permetrà conèixer d'una manera directa el contingut genètic de

gen van demostrar que la proteorodopsina descoberta funcionava com a bomba de protons dependent de la llum. Una nova forma d'utilització de la llum per a generar energia acabava de ser descrita en un organisme mai cultivat i aquesta nova activitat semblava ser rellevant en el flux de carboni en l'ecosistema marí. Recentment, un estudi basat en la seqüenciació "shot-gun" de la comunitat ha confirmat la importància de les proteorodopsines al mar i ha obert una nova era en la metagenòmica (Venter et al. 2004).

fracció important dels flagel·lats heterotròfics marins (Massana et al. 2002). Els flagel·lats heterotròfics formen un grup central en els ecosistemes marins (bacterívors, herbívors, recicladors de nutrients orgànics i inorgànics), però la seva composició específica és virtualment desconeguda, tal com passava amb els bacteris fa una mica més d'una dècada. Estudis multidisciplinaris centrats en els nous picoeucariotes com els MAST (Fig. 7) comencen a revelar la identitat d'organismes fonamentals per al funcionament de l'ecosistema marí i ajudaran a revelar les diferents ecofisiologies probablement amagades darrera de cada espècie.

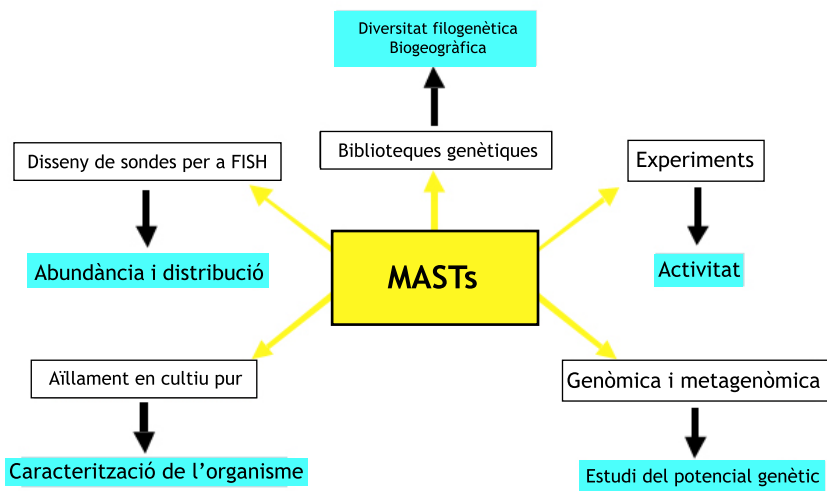


Figura 7. Proposta per a una aproximació multidisciplinària a l'estudi de la fisiologia i ecologia d'un grup nou de picoeucariotes marins coneguts a través de les seqüències del gen rRNA 18S, els MAST (Marine Stramenopiles, Massana et al. 2002). Primerament es faran més biblioteques genètiques per a conèixer en més detall la diversitat filogenètica i la biogeografia. Aquesta informació filogenètica serà utilitzada per a dissenyar sondes dels grups més importants per a ser aplicades en recomptes directes mitjançant la tècnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Les sondes de FISH s'aplicaran per a fer recomptes d'abundància en el mar i també per a veure el comportament de cada grup en diferents tractaments experimentals (per exemple si són depredadors i quines són les seves preses). S'ha d'intentar obtenir algun representant d'aquest grup en cultiu, per a fer-ne un descripció formal. Finalment es faran estudis genòmics (en cas d'obtenir cultius) o metagenòmics (de comunitats naturals) per a esbrinar les capacitats metabòliques d'aquests nous organismes.

Per acabar, està clar que en els darrers anys s'han obtingut dades essencials per a conèixer els components del picoplàncton marí i les seves funcions. Sabem quines espècies es troben en el mar i com es distribueixen a través de gradients ambientals. Mitjançant una aproximació multidisciplinària de noves tècniques de cultiu, interrogació de les comunitats naturals i genòmica de cultius i ambiental, comencem a assignar funcions a microorganismes coneguts i desconeguts, i fins i tot s'han descrit funcions que ni imaginàvem. És evident que l'esforç realitzat per a conèixer els components del picoplàncton ens ajuda a entendre millor la seva participació en el funcionament del sistema global. I també és evident que ens trobem només al començament d'una nova manera d'aproximar-nos a les comunitats microbianes. Les bases estan assentades per a un futur que s'entreveu fascinant.

la comunitat natural. Potser la manera més elegant de fer-ho consisteix en clonar fragments grans de DNA ambiental (després d'una extracció amb molta cura) i analitzar els gens de cada fragment. En un dels primers treballs sobre el picoplàncton marí es van obtenir resultats espectaculars (Fig. 6), ja que en un mateix fragment de DNA es va localitzar el gen rRNA d'un bacteri no cultivat (el g-Proteobacteri SAR86) i un gen que codificava un pigment relacionat amb la rodopsina (Béjà et al. 2000). Estudis d'expressió d'aquest

Un tema actual és la caracterització dels organismes responsables de les noves seqüències detectades en les anàlisis moleculars de picoeucariotes marins (Díez et al. 2001). Aquestes noves seqüències, bàsicament dins dels grups filogenètics dels estramenòpils o els alveolats, s'han trobat en tots els sistemes investigats i constitueixen una proporció significativa dels clons analitzats. Resultats recents indiquen que alguns grups de nous estramenòpils (MAST, Marine Stramenopiles) són bacterívors i poden representar una

## REFERÈNCIES

- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt, DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL, Polz MF. 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430:551-554.
- Béja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gatess CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF. 2000. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289:1902-1906.
- Cohan FM. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56:457-487.
- Cottrell MT, Kirchman DL. 2000. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1692-1697.
- DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5685-5689.
- Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R. 2001. 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.
- Fuhrman JA. 2003. Genome sequences from the sea. *Nature* 424:1001-1002.
- Giovanoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.
- Karl DM. 2002. Hidden in a sea of microbes. *Nature* 415:590-591.
- Massana R, Guillou L, Díez B, Pedrós-Alió C. 2002. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4554-4558.
- Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovanoni SJ. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630-633.
- Rodríguez-Valera F. 2004. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol. Lett.* 231:153-158.
- Sherr EB, Sherr BF. 2000. Marine Microbes. An overview, p. 13-46. In D. L. Kirchman (ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, New York.
- Venter JC, and 22 others. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66-74.



### Ramon Massana

és llicenciat i doctor en biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona. La seva trajectòria investigadora es caracteritza per l'estudi de l'estructura de les comunitats microbianes que viuen en suspensió als llacs i als oceans des de diferents perspectives com ara les relacions tròfiques, l'estructura de dimensions o la diversitat filogenètica. Entre 1995 i 1997 va realitzar la seva estada postdoctoral al Marine Science Institute de la Universitat de Califòrnia, Santa Barbara (Estats Units), a l'equip del Dr. E.F.

DeLong, on va centrar-se en l'estudi del paper ecològic dels microorganismes marins mitjançant l'aplicació de tècniques moleculars. El 1997 va incorporar-se a l'Institut de Ciències del Mar (CSIC) de Barcelona, en un principi com a investigador contractat i des de juliol del 2005 com a científic titular del CSIC. Els seus interessos actuals es centren en l'estudi de la diversitat i funció dels microorganismes marins, bacteris, arquees i protistes, amb especial èmfasi en el paper ecològic dels protozoos marins no cultivats detectats només mitjançant tècniques moleculars. Ha participat en nombrosos projectes d'investigació i en diverses campanyes oceanogràfiques. Ha publicat els seus resultats en nombrosos articles internacionals i els ha exposat en diversos congressos científics.