



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Caracterització de partícules i dels bacteris associats, a la costa del mar Mediterrani

Institut de Ciències del Mar (CSIC)



Facultat de Biologia

Autor: Mireia Llorente Rodríguez

Tutor extern: M. Montserrat Sala

Tutor intern: Josefina Martínez

Data de presentació: 30 de Juny 2014

Grau: Biologia

Agraeixo a tot el personal de l'ICM l'acollida i el tracte rebut així com el bon ambient de treball i la cooperació de la que he pogut gaudir. En especial, m'agradaria agrair a la Clara Cardelús i l'Eva Ortega per planificar i acompanyar-me en els mostrejos. A la Marta Sebastián per ajudar-me amb els protocols i el treball al laboratori i a en Ramon Massana per proporcionar-me algunes de les dades referents a bacteris de Blanes. Finalment, agraeixo plenament a la Montse Sala, tutora externa, per la seva paciència i dedicació a l'hora de guiar-me en el meu treball.

Abstract

Sources of organic matter in coastal areas can be both autochthonous (phytoplankton) and allochthonous (river inflow, groundwater, atmospheric deposition). The great variability in the structure and composition of this organic matter creates different ecological niches that favor increased microbial diversity in the system.

Blanes Bay, where the study area is located, is considered a good example of oligotrophic coastal ecosystem that is also relatively little affected by human influence. Moreover, the extensive information and documentation recorded continuously since 1998 allows us to obtain valuable time series.

Based on monthly samples we studied the structure of organic matter and how this affects the composition of the microbial community. DAPI staining and CARD-FISH method, were applied to study the structure of the particles found in the water, and the composition of the bacteria present in both free-living and associated to particles.

In this study, we can draw the following main conclusions:

- The concentration of particles varies throughout the year with peaks of blue particles at the beginning of spring, and yellow particles peaks in late spring and autumn.
- Bacterial colonization has its maximum in spring (0.5 - 0.7%) and occurs mostly in blue (organic) particles regardless of size.
- Generally free-living bacteria are much more abundant than attached bacteria to particles.
- The composition of the attached microbial community is much more diverse than that of free-living bacteria, where there is a high heterogeneity.

ÍNDEX

1	Introducció i objectius	1
2	Material i mètodes	5
2.1	Mostreig	5
2.2	Paràmetres ambientals	5
2.3	Abundància de partícules i bacteris associats	6
2.3.1	Fixació de mostres per DAPI	6
2.3.2	Filtració i tinció de les mostres de DAPI	6
2.3.3	Recompte DAPI	7
2.4	Abundància de grups bacterians específics	9
2.4.1	Fonament de la tècnica. FISH i CARD-FISH	9
2.4.2	Fixació de mostres per CARD-FISH	10
2.4.3	Filtració de mostres per CARD-FISH	10
2.4.4	Aplicació CARD-FISH	11
2.4.5	Recompte de les mostres de CARD-FISH	13
3	Resultats	14
3.1	Paràmetres ambientals	14
3.2	Concentració de partícules i bacteris associats	15
3.3	Concentració de partícules i factors d'influència	17
3.4	Abundància de grups bacterians específics	20
4	Discussió	22
4.1	Hi ha més partícules i agregats (majoritàriament orgànics) després dels blooms hivernals de fitoplàncton?	22
4.2	Hi ha més partícules i agregats (majoritàriament inorgànics) després de fortes precipitacions?	23
4.3	La composició de les comunitats microbianes és diferent en funció de si són de vida lliure o estan adherides?	24
4.4	La composició de les comunitats microbianes és diferent segons l'època de l'any?	26
5	Conclusions	27
6	Bibliografia	28

1 Introducció i objectius

Tradicionalment la matèria orgànica s'ha dividit de manera arbitrària en POM *Particulated Organic Matter* i DOM *Disolved Organic Matter*, no obstant, en realitat se sap que existeix en un continu de mides. La gran variabilitat en l'estructura i la composició d'aquesta crea doncs, diferents nínxols ecològics que propicien un augment en la diversitat microbiana del sistema.

Les partícules orgàniques no vives tenen un paper clau en el transport vertical d'elements i representen una base i un aport nutricional important per als organismes que conformen la neu marina (Mostajir *et al.*, 1997).

Al seu torn, tota la producció i utilització de la matèria orgànica es troba regulada segons l'efecte de diversos moduladors ambientals (nutrients, llum, temperatura).

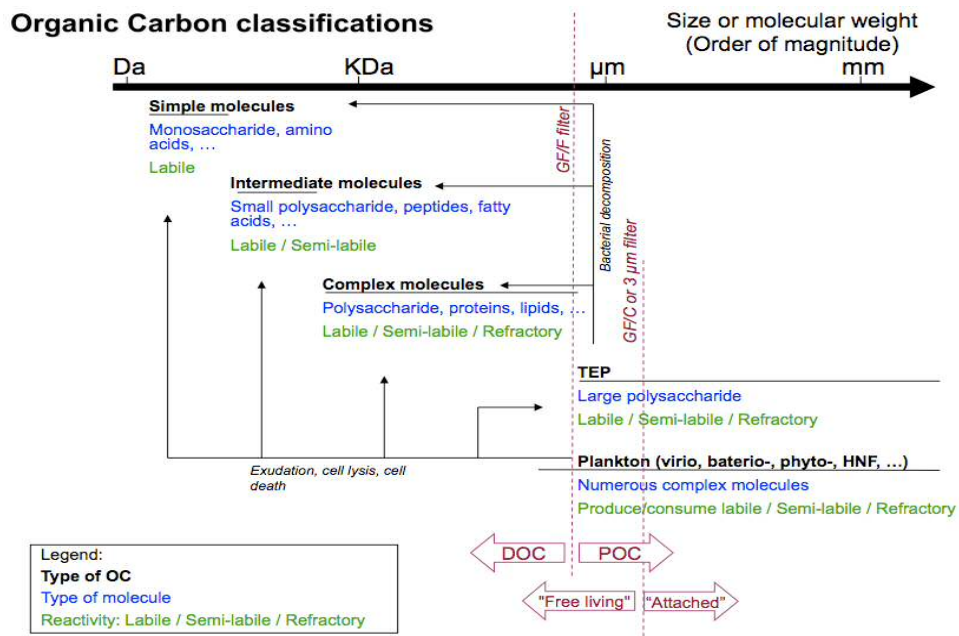


Figura 1. Classificació de la matèria orgànica segons els ordres de magnitud

A les zones costaneres les fonts de matèria orgànica poden ser tant autòctones (fitoplanctònica) com al·lòctones (aports fluvials, aigües subterrànies, deposicions atmosfèriques).

No obstant, per començar a explicar els fluxos de tota aquesta matèria orgànica cal centrar-nos en la primera font i parlar de producció primària, la meitat de la qual té lloc als oceans (Azam & Malfatti, 2007).

La producció primària en els sistemes marins té lloc a la regió pelàgica gràcies a la fotosíntesi que fa el fitoplàncton. Des d'aquest pot transferir-se per la xarxa tròfica cap a nivells superiors, pot caure al bentos com a POM i, remineralitzar-se contribuint a la bomba biològica de carboni, o pot perdre's com a DOM. La fracció de producció primària que acaba com a DOM (al voltant del 50%) només pot ser utilitzada pels bacteris que incorporant-la a la seva biomassa, la transformen en POM i la retornen a la xarxa tròfica.

Fins al 1974 però, no es té en compte el control dels microorganismes sobre una fracció important del flux energètic dels ecosistemes pelàgics (Pomeroy *et al.*, 1974). Gràcies a la hipòtesi que planteja Pomeroy, avui dia se sap que els fluxos mediat per bacteris poden suposar entre el 0 i més del 100% de la producció primària del sistema, pel que segons la disponibilitat de nutrients, els bacteris poden actuar com a consumidors o com a productors (Azam *et al.*, 1993).

D'aquesta manera trobem que a banda de l'efecte dels moduladors ambientals, l'activitat biològica dels organismes en sí també juga un paper important en la regulació dels fluxos de la matèria orgànica (Azam *et al.*, 1993).

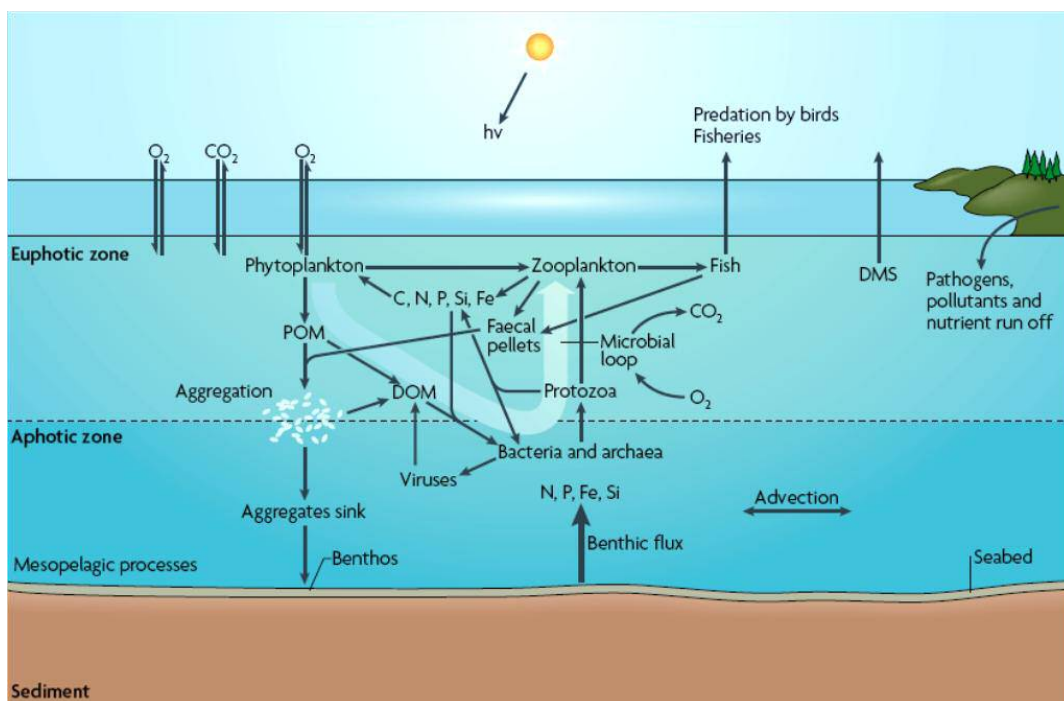


Figura 2. Diagrama de fluxos de la matèria orgànica en l'ecosistema marí.

Per a la realització d'aquest projecte es treballa a partir de mostrejos mensuals a la badia de Blanes, al nord-oest del mar Mediterrani.

Aquest indret és considerat un bon exemple d'ecosistema costaner oligotròfic i a més es troba relativament poc afectat per la influència humana. D'altra banda l'extensa informació i documentació registrada de manera contínua des de 1998 permet obtenir valuoses seqüències temporals (Gasol *et al.*, 2012).



Figura 4. Àrea d'estudi. Blanes, Costa Catalana

La badia de Blanes està dominada per un corrent de circulació sud-oest que allunya l'aigua del riu Tordera, pel que les aportacions fluvials d'aquest només tenen efectes rellevants després de fortes pluges (Guadayol *et al.*, 2009). En profunditat, un canó submarí proper facilita l'entrada d'aigua des d'altra mar.

Com en moltes altres regions costaneres, trobem una marcada estacionalitat.

Els estius càlids i amb vents febles faciliten l'acumulació de matèria orgànica (Vila-Reixach *et al.*, 2012) generant una deficiència de nutrients amb limitació per P, que afecta el creixement microbià (Pinhassi *et al.*, 2006). Els hiverns en canvi, solen ser freds i rics.

L'estudi present s'engloba dins un dels projectes realitzats a l'ICM conjuntament amb les dades i el treball de diversos grups d'investigadors.

El projecte STORM *Structure of Organic Matter in the coastal ocean: biogeochemical and ecological implications*, tracta de conèixer i descriure com l'estructura del carboni orgànic determina la dinàmica d'aquest i alhora, la diversitat microbiana i el metabolisme en el sistema costaner. Així els objectius a grans trets del projecte STORM són:

- a. Identificar les fonts de matèria orgànica a la zona costanera
- b. Descriure l'estructura de la matèria orgànica
- c. Estudiar com l'estructura de la matèria orgànica afecta les comunitats microbianes
- d. Observar l'efecte dels moduladors en la utilització de la matèria orgànica

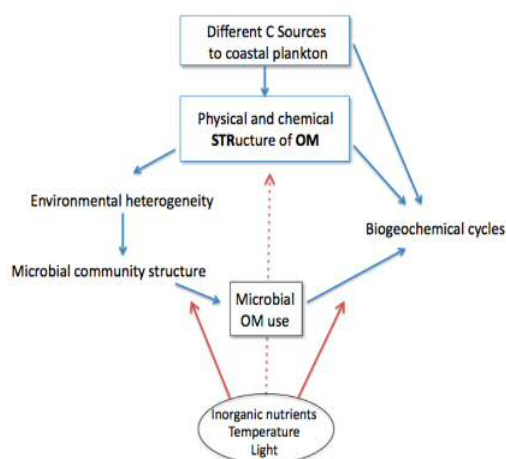


Figura 3. Diagrama d'estudi del projecte STORM

Partint de la constatació que l'estructura de la matèria orgànica varia al llarg del cicle estacional, s'hipotetitza que:

- Hi haurà més partícules i agregats (majoritàriament orgànics) després dels blooms hivernals de fitoplàncton quan aquest mor o està senescent i excreta matèria orgànica
- Hi haurà més partícules i agregats (majoritàriament inorgànics) després de fortes precipitacions degut a l'arrossegament de material costaner i/o fluvial

A nivell més específic de comunitats microbianes, i partint de la diversitat de nínxols ecològics que comporta la presència de partícules i agregats, també s'hipotetitza que:

- La composició de les comunitats microbianes serà diferent en funció de si són de vida lliure o estan adherides
- La composició de les comunitats microbianes variarà al llarg de l'any segons l'estacionalitat

2 Material i mètodes

2.1 Mostreig

Recol·lecció mensual de mostres d'aigua marina de la badia de Blanes, al Nord-oest del Mar Mediterrani (41° 40' N; 2° 48' E). Per a aquest estudi s'han utilitzat les mostres obtingudes des de febrer del 2012 fins a juny del 2013.

Nota: Degut a la realització d'una campanya de llarga durada, no hi ha dades del mes de Maig del 2012.



Figura 5. Localització de la zona de mostreig. Badia de Blanes, Mediterrani NO.

Els mostrejos es realitzen a 0.5 milles (0.804 Km) de la costa amb aigua de superfície pre-filtrada per una malla de 200 µm, i s'utilitzen bidons rentats de polipropilè de 20 L.

2.2 Paràmetres ambientals

Durant els mostrejos s'obtenen també mesures dels paràmetres ambientals de temperatura i salinitat i es fa una mesura de la fondària amb el disc de Secchi.

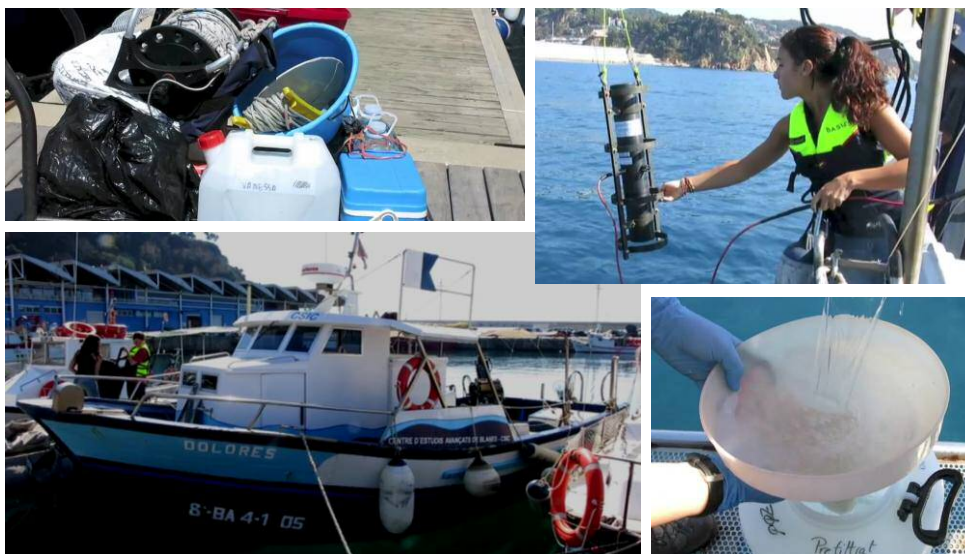


Figura 6. Mostreig. Recol·lecció de mostres i presa de dades amb el CTD.

2.3 Abundància de partícules i bacteris associats

Per a obtenir les dades d'abundàncies bacterianes i de partícules, s'han tractat les mostres mitjançant la tinció DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (Porter and Feig, 1980). Aquesta tècnica segueix una sèrie de passos que consisteixen en una fixació inicial, la filtració de les mostres, la tinció dels filtres i una posterior observació al microscopi d'epifluorescència.

Nota: tant el DAPI com el fixador glutaraldehyd són tòxics i irritants pel que cal tenir una cura especial a l'hora de dur a terme el procés.

2.3.1 Fixació de mostres per DAPI

Fixar 135 ml de mostra amb 15 ml de glutaraldehyd al 10% (fixador al 10% del volum final). Incubar durant 1h (no sobrepassar les 24h) a 4°C en condicions de foscor.

2.3.2 Filtració i tinció de les mostres de DAPI

S'utilitza un sistema de filtració que consisteix en unes torres de metall on s'hi aboca la mostra i unes reixetes connectades a una bomba de succió.



Figura 7. Sistema de filtració.

Sobre les reixetes, col·locar els pre-filtres d'acetat de cel·lulosa de 0.8 μm (AA, 25 mm) i mullar-los lleugerament amb aigua MilliQ.

Sobre els pre-filtres, col·locar els filtres de policarbonat negre (25 mm) amb la cara brillant cap amunt.

Muntar les torres amb els cilindres de metall i filtrar de mica en mica el volum de mostra fixada que correspongui. Es preparen mostres amb filtres de diferents porus: 0.2 μm (20 ml), 0.8 μm (20 ml), 3 μm (150 ml), 5 μm (150 ml) i 10 μm (150 ml). En aquest cas s'utilitzaran només els de 0.2 i 3 micres.

En els últims 5 ml a filtrar, aturar la bomba de succió i afegir als cilindres on hi ha la mostra 50 μl de DAPI (0.5 mg ml^{-1}). Incubar en fosc durant 5 min per a que les cèl·lules quedin tenyides i seguir filtrant fins que el filtre quedi sec.

Un cop acabada la filtració, muntar els filtres de policarbonat negre sobre portaobjectes mantenint la cara brillant cap amunt. Afegir una gota d'oli d'immersió al centre i col·locar un cobreobjectes pressionant lleugerament per a que l'oli es reparteixi.

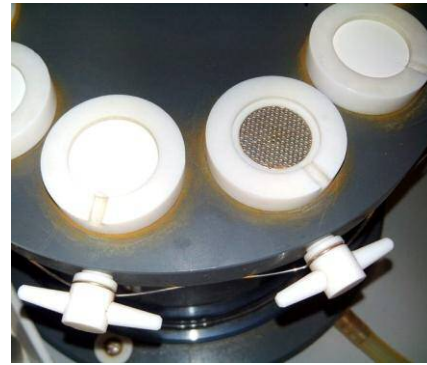


Figura 8. Reixetes i torres de metall.

Les mostres preparades es guarden a -20°C en condicions de fosc fins a ser observades amb llum UV al microscopi d'epifluorescència.

2.3.3 Recompte DAPI

Per a obtenir les dades d'abundància bacteriana i de partícules s'han realitzat recomptes dels filtres de 3 μm a partir de camps fotogràfics obtinguts amb el microscopi d'epifluorescència utilitzant llum UV.

Per a cada mostra s'ha diferenciat entre partícules grogues (considerades majoritàriament inorgàniques) i partícules blaves (orgàniques) on s'han englobat també organismes (Mostajir *et al.*, 1995). Dins els organismes també s'ha diferenciat, segons la presència de clorofil·la, entre fotòtrofs (la immensa majoria d'autòtrofs de superfície utilitzen llum) i heteròtrofs.

S'ha mesurat cada partícula en longitud i amplada (Sheldon *et al.*, 1972) (Mostajir *et al.*, 1997), i s'ha indicat si hi ha colonització bacteriana i el nombre de bacteris en cada cas.

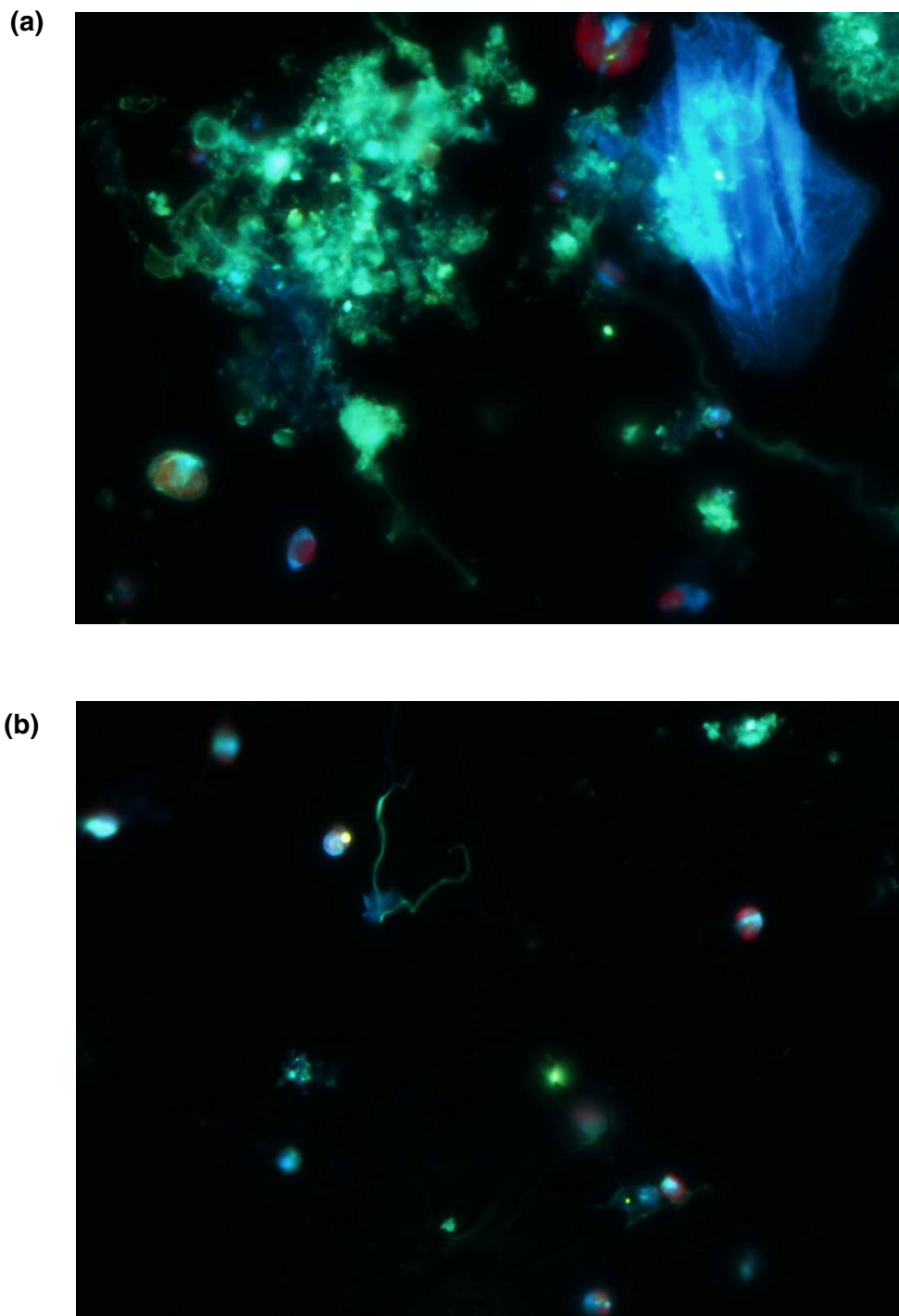


Figura 9. Imatges de DAPI al microscopi d'epifluorescència. (a) Febrer del 2013 i (b) Setembre del 2012.

A partir dels recomptes s'han obtingut dades de partícules ml^{-1} (incloent organismes i sense organismes), àrea de les partícules $\mu\text{m}^2 \text{ml}^{-1}$, total de bacteris en partícula ml^{-1} , bacteris partícula $^{-1}$ i bacteris $\mu\text{m}^2 \text{partícula}^{-1}$.

2.4 Abundància de grups bacterians específics

A fi d'apropar-nos a la diversitat de la comunitat microbiana present a la badia de Blanes, s'ha realitzat un estudi utilitzant mostres representatives de cada estació de l'any triades a partir dels resultats obtinguts amb la tinció per DAPI: Juliol del 2012 (estiu), Octubre del 2012 (tardor), Febrer del 2013 (hivern) i Maig del 2013 (primavera). Les mostres d'aigua s'han recollit durant els mostrejos seguint el protocol descrit anteriorment i s'hi han estudiat els bacteris tant en vida lliure com associats a partícules.

Per a obtenir les dades d'abundància de grups bacterians específics, s'han tractat les mostres amb la tècnica de CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization) (Amann *et al.*, 2008). Aquest mètode és utilitzat per a la identificació, quantificació i caracterització de poblacions microbianes filogenèticament definides.

2.4.1 Fonament de la tècnica. FISH i CARD-FISH

FISH es basa en la utilització de sondes d'oligonucleòtids que s'uneixen al RNAr i poden estar adherides a fluorocroms o a enzims com el de peroxidasa de rave, per facilitar-ne la detecció.

Les molècules de RNAr que s'utilitzen com a diana tenen certes característiques que les fan altament vàlides per a la tècnica de FISH:

- Totes les cèl·lules necessiten ribosomes per a la traducció proteica i com que cada cèl·lula conté nombrosos ribosomes, aquestes molècules objectiu són amplificades.
- La conservació de les seqüències de RNAr és irregular de manera que, jugant amb el disseny d'especificitat de les sondes, es poden detectar des d'espècies fins a grans fílums o dominis.

CARD-FISH és un mètode que incrementa molt la sensibilitat de la tècnica FISH i augmenta la fracció de cèl·lules que podrien ser identificades amb una sonda convencional. Així s'obté un increment de la resposta del 50 fins al 80%.

En CARD-FISH s'utilitza una sonda amb un oligonucleòtid que duu unit covalentment l'enzim peroxidasa de rave '*Horseradish Peroxidase*' (HRP) per a la hibridació *in situ*.

L'amplificació posterior s'aconsegueix utilitzant molècules múltiples de tiramida marcada amb fluorescència (Alexa448), que és radicalitzada per l'enzim, produint un senyal més fort.

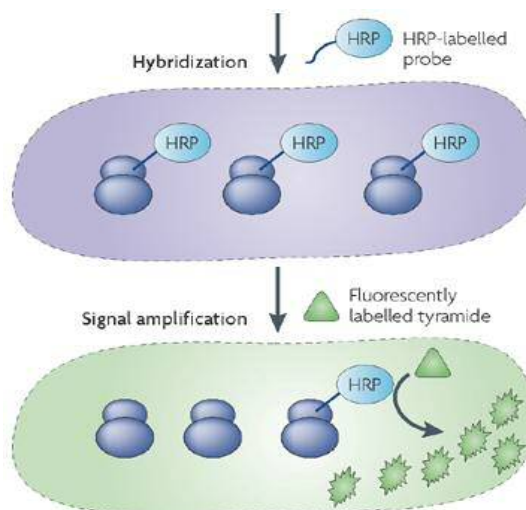


Figura 10. Principi de CARD-FISH.

2.4.2 Fixació de mostres per CARD-FISH

Fixar 9 volums de la mostra amb 1 volum de paraformaldehid, PFA al 10% (fixador al 1% del volum final). Incubar a 4°C durant 24h.

20 ml per al filtre de 0.2 µm → 18 ml mostra + 2 ml PFA

150 ml per al filtre de 3 µm → 135 ml mostra + 15 ml PFA

Amb aquest primer pas, s'estabilitza la morfologia cel·lular i es preserva la integritat prevenint la pèrdua de mostra deguda a lisi cel·lular.

Nota: el fixador PFA és irritant pel que cal tenir una cura especial a l'hora de dur a terme el procés.

2.4.3 Filtració de mostres per CARD-FISH

Muntar les torres de filtració seguint el protocol descrit anteriorment. Per a CARD-FISH però, els filtres són de policarbonat blanc. En el nostre cas s'utilitzaran només filtres de 0.2 i 3 micres.

Filtrar la totalitat corresponen de mostra fixada, segons la mida del porus: 0.2 µm (20 ml) i 3 µm (150 ml), i esbandir el filtre amb una xeringa de 5 ml d'aigua MilliQ filtrada per 0.2 µm.

Un cop acabada la filtració, retolar els filtres secs amb un llapis i transferir-los a una placa de petri col·locant separadors de paper blau entre ells.

Els filtres es guarden a -80°C fins a ser utilitzats per a la hibridació.

2.4.4 Aplicació CARD-FISH

CARD-FISH s'ha aplicat segons el protocol descrit per Pernthaler *et al.*, 2004 amb els següents passos:

- **Adhesió 'attachment'**: submergir breument els filtres en una dissolució d'agarosa (0.1% w/w). D'aquesta manera la fina pel·lícula de recobriment assegura no perdre cèl·lules durant els rentats del procés.
- **Permeabilització**: incubar de forma successiva en solucions de lisozim i acromopeptidasa (pas complementari). Amb aquests passos es permeabilitza la paret bacteriana facilitant el pas de la sonda i l'amplificador cap a l'interior de la cèl·lula.
 - o Lisozim (37°C, 1h). Actua sobre els peptidoglicans de la paret bacteriana.
 - o Acromopeptidasa (37°C, 30 min). Assegura una correcta permeabilització alhora que actua també sobre els arqueus.
- **Hibridació**: (300:1, 35°C, 16h). Tallar el filtre en seccions per a les diferents sondes. En aquest cas s'utilitzen quatre sondes HRP (% de formamida):
 - o Gam42a (55%, Manz *et al.*, 1992) Gamma-proteobacteris
 - o CF319a (55%, Amann *et al.*, 1995) Citòfagues
 - o Alt1413 (60%, Eilers *et al.*, 2000) *Alteromonas*
 - o Ros537 (55%, Eilers *et al.*, 2000) *Roseobacter* i *SAR83*
- **Rentat**: Tampó de rentat (37°C, 15 min) i PBS (temperatura ambient, 15 min) tot en fosc. S'elimina l'excés de sonda per a reduir el soroll durant l'amplificació.
- **Amplificació**: tampó d'amplificació + H₂O₂ + substrat Alexa448 (46°C, 15min, fosc). L'enzim HRP reacciona amb la tiramida marcada i produeix senyal.
- **Contratinció DAPI**: muntatge de les seccions en un portaobjectes amb solució de DAPI anti-decolorant (1µg ml⁻¹).

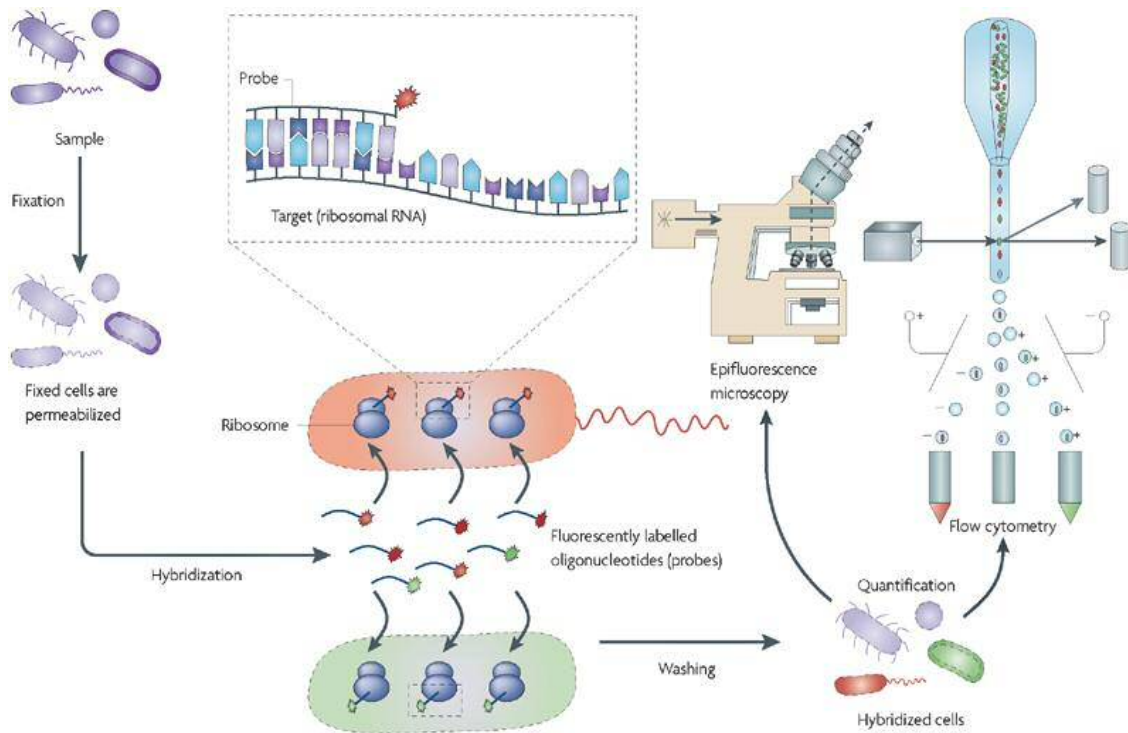


Figura 11. Passos bàsics de la tècnica de FISH.

Les mostres preparades es guarden a -20°C en condicions de fosc fins a ser observades al microscopi d'epifluorescència.

2.4.5 Recompte de les mostres de CARD-FISH

Per a obtenir les dades d'abundància de grups bacterians específics, s'han realitzat recomptes en cadascuna de les seccions dels filtres. Els recomptes s'han realitzat al llarg d'un transecte mitjançant la quadrícula de l'objectiu del microscopi d'epifluorescència, el qual s'ha utilitzat amb llum blava.

Per a cada estació de l'any s'han aplicat les quatre sondes i s'ha diferenciat entre bacteris lliures (filtres de 0.2 μm) i bacteris associats a partícules (filtres de 3 μm), de manera que s'han generat 32 condicions experimentals amb una mostra per a cada cas.

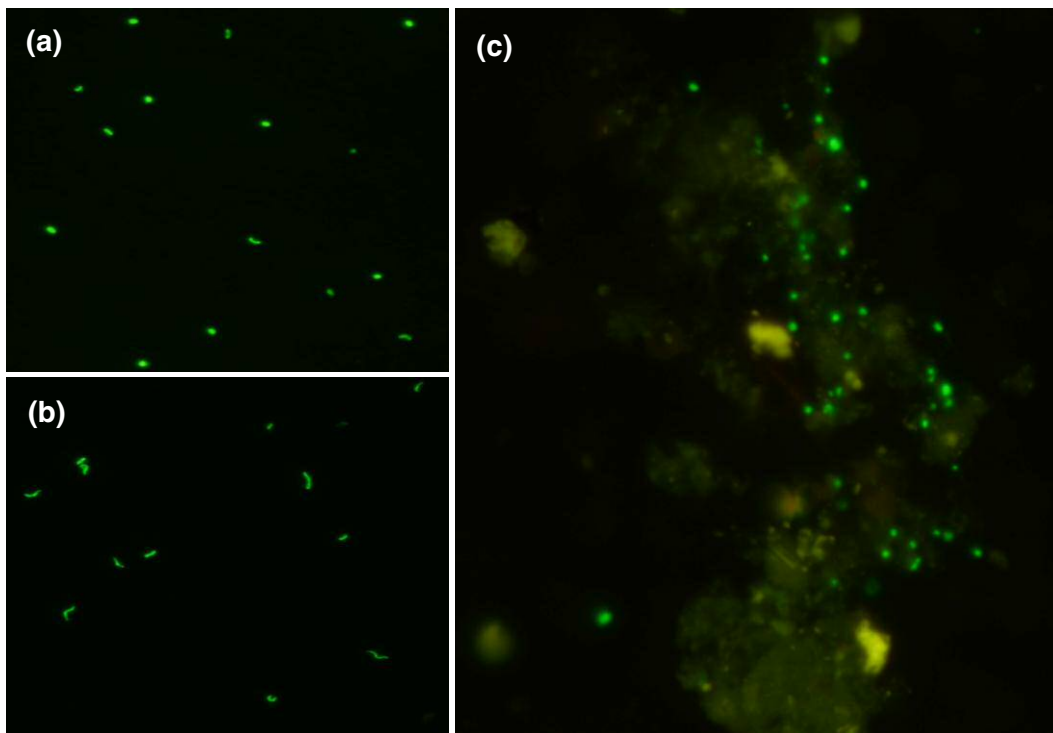


Figura 12. Imatges de CARD-FISH al microscopi d'epifluorescència. Gamma-proteobacteris lliures (a) Maig del 2013 i (b) Juliol del 2012. (c) Citòfagues associades a partícules Febrer del 2013.

A partir dels recomptes s'han obtingut dades de bacteris ml^{-1} (lliures i associats a partícules), percentatges de cada grup respecte el total de bacteris i percentatges d'associats i lliures dins un mateix grup.

3 Resultats

3.1 Paràmetres ambientals

Durant el període d'estudi, la temperatura de l'aigua (Fig. 8a) va oscil·lar entre els 12 i els 25°C amb un pic marcat durant els mesos d'estiu.

Pel que fa la salinitat (Fig. 8b) no hi ha una clara estacionalitat, tot i que s'observaria una tendència a la baixa durant la primavera i la tardor coincidint amb els mesos de més precipitació.

Les mesures amb el disc de Secchi (Fig. 8c) varien entre els 8 i els 20 m amb els valors més alts a l'estiu quan les precipitacions són escasses i els possibles aports fluvials serien poc importants.

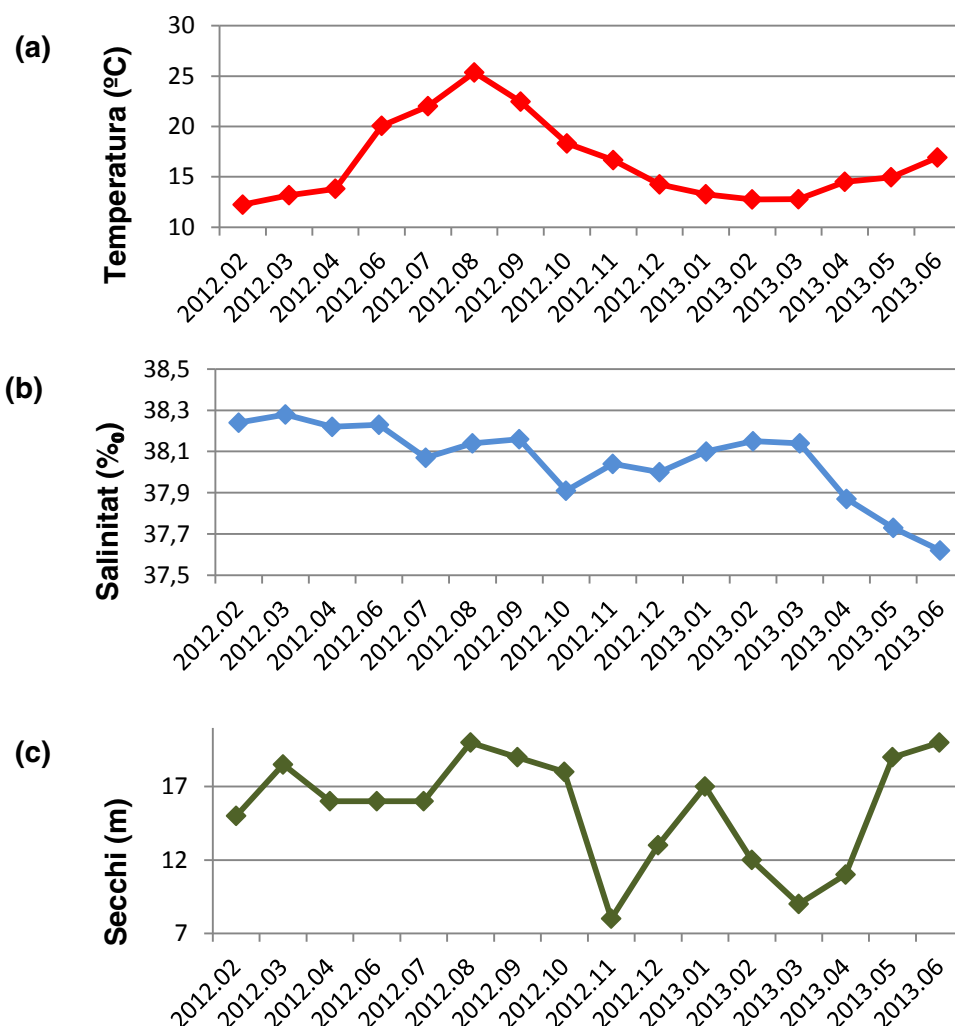


Figura 13. Temperatura (a) salinitat (b) i fondària del disc de Secchi (c) de l'aigua de la badia de Blanes durant el període d'estudi.

3.2 Concentració de partícules i bacteris associats

La concentració d'agregats i partícules blaves (orgàniques) (Fig. 14a) es mou entre les 2000 i les 4000 partícules ml^{-1} amb un pic més alt al mes d'Abril de 2012, que es repeteix a l'any següent tot i que d'una forma no tan marcada.

La línia que representa la concentració de partícules sense incloure organismes mostra una tendència bastant similar a la que inclou també els organismes. En alguns mesos com ara Juny i Juliol de 2012 les línies més separades indicarien una contribució important dels organismes sobre el total de partícules observades.

Les variacions en l'àrea total de les partícules (Fig. 14b) van des dels 0.05 fins als 0.25 $\text{mm}^2 \text{ml}^{-1}$, amb un pic al Gener de 2013 on se superen els 0.30 $\text{mm}^2 \text{ml}^{-1}$. Així, els mesos centrals d'estiu i especialment d'hivern tindrien pics amb partícules més grosses (70 i 125 μm^2 respectivament), mentre que a la primavera i a la tardor les partícules orgàniques tindrien una mida més petita (30 μm^2 aproximadament).

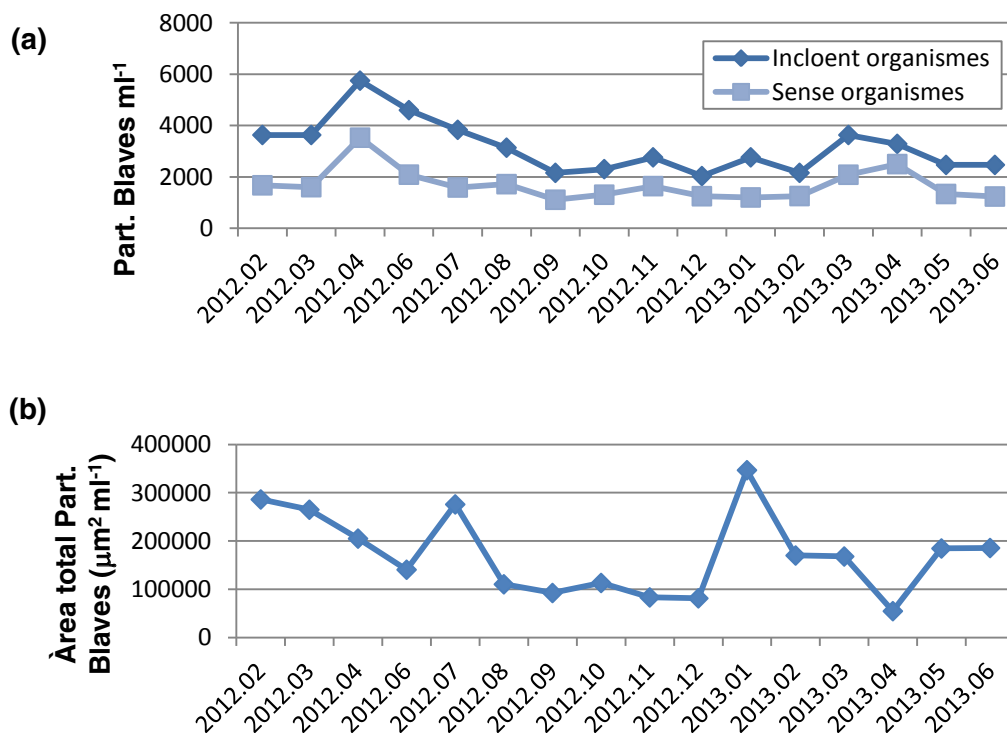


Figura 14. Concentració amb i sense organismes (a) i àrea total (b) de partícules blaves.

La concentració de partícules grogues (majoritàriament inorgàniques) (Fig. 15a) és més variable que la de partícules blaves. Les partícules grogues són en general més nombroses, amb valors que es mouen entre les 1000 i les 6000 partícules ml^{-1} amb un pic més alt al mes de Novembre de 2012 on gairebé s'assoleixen unes 8000 partícules ml^{-1} . A aquest, el segueix un segon pic corresponent a la primavera de 2013.

Pel que fa l'àrea total de partícules (Fig. 15b) trobem que en aquest cas és més estable que en les blaves, i varia entre els 0.05 i els 0.17 $\text{mm}^2 \text{ml}^{-1}$, amb un pic de fins a 0.40 $\text{mm}^2 \text{ml}^{-1}$ al Novembre de 2012 que coincideix amb la mostra on la concentració és major.

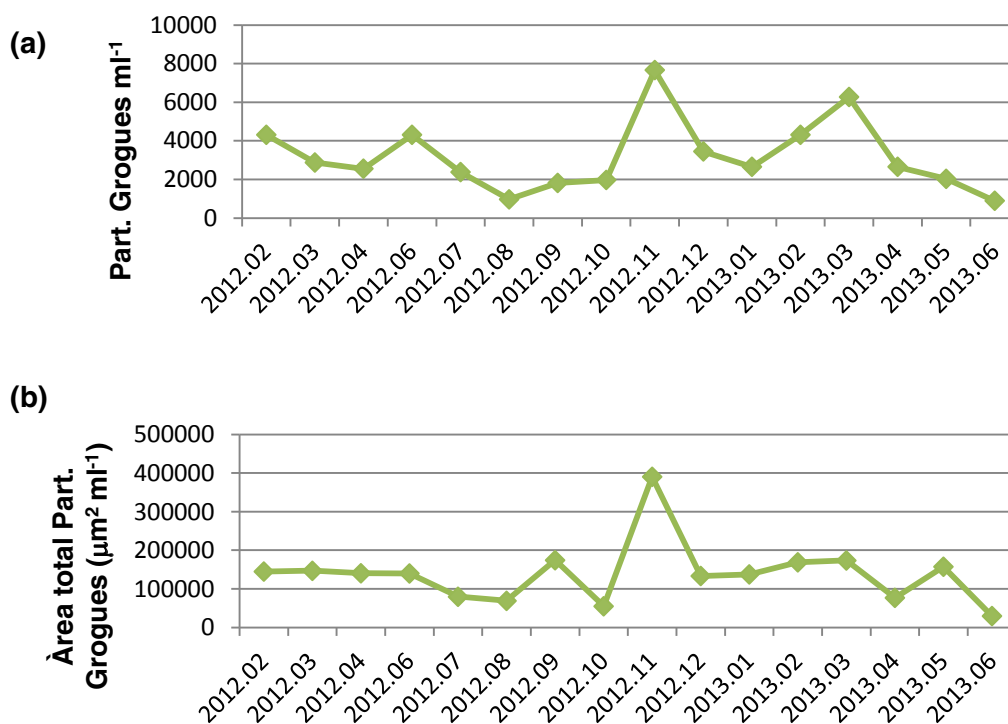


Figura 15. Concentració (a) i àrea total (b) de partícules grogues.

En els gràfics que es mostren a continuació, (Fig. 16a 16b i 16c) s'observa clarament com la presència de bacteris en partícules és molt més elevada en blaves (orgàniques) que en grogues (majoritàriament inorgàniques).

No obstant, a banda de les diferències en les magnituds el perfil d'abundància en els dos casos és similar (Fig. 16c). Els nivells de colonització bacteriana al llarg del cicle anual es mantenen entre els 300 i els 1300 bacteris en partícula ml^{-1} en el cas de les blaves, i entre els 0 i els 250 bacteris en partícula ml^{-1} en el cas de les grogues. A la primavera es dona un pic important durant el qual s'assoleixen valors de 3200 bacteris en partícula ml^{-1} en blaves i de 2000 bacteris en partícula ml^{-1} en grogues.

Si es comparen les dades de colonització bacteriana (Fig. 16a 16b i 16c) amb les de concentració de partícules (Fig. 14a i 15a) i àrea total (Fig. 14b i 15b), es podria entreveure una tendència similar amb el nombre de partícules mentre que l'àrea d'aquestes no influiria en el grau de colonització.

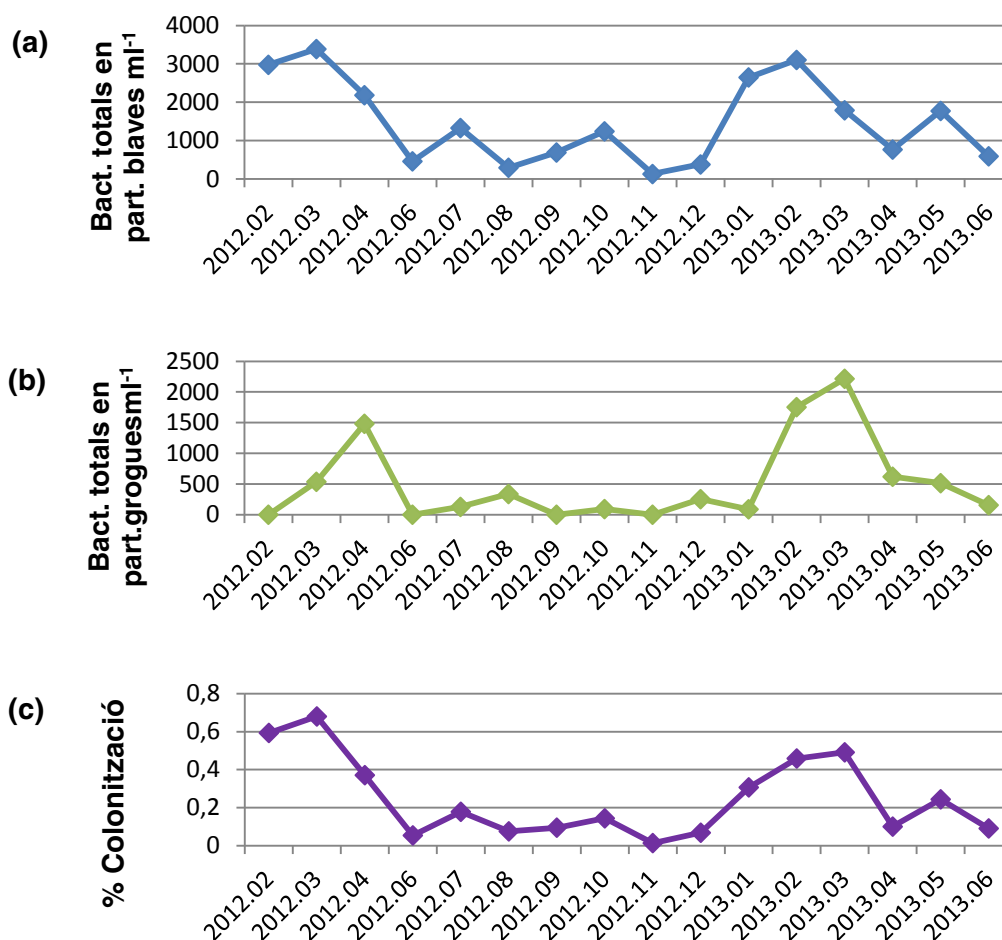


Figura 16. Bacteris totals en partícula ml^{-1} (a) blaves i (b) grogues. (c) colonització, proporció de bacteris associats respecte el total.

3.3 Concentració de partícules i factors d'influència

Durant el cicle anual s'observa una proporció de partícules de cada classe bastant equilibrada de manera global tot i presentar variacions importants en alguns moments.

En els mesos freds, durant la tardor i l'hivern, predominarien les partícules grogues especialment al mes de Novembre on representen més del 70% del total. En els mesos càlids, durant la primavera i l'estiu, el domini seria per a les partícules blaves amb un màxim a l'Agost on representen prop del 75% del total.

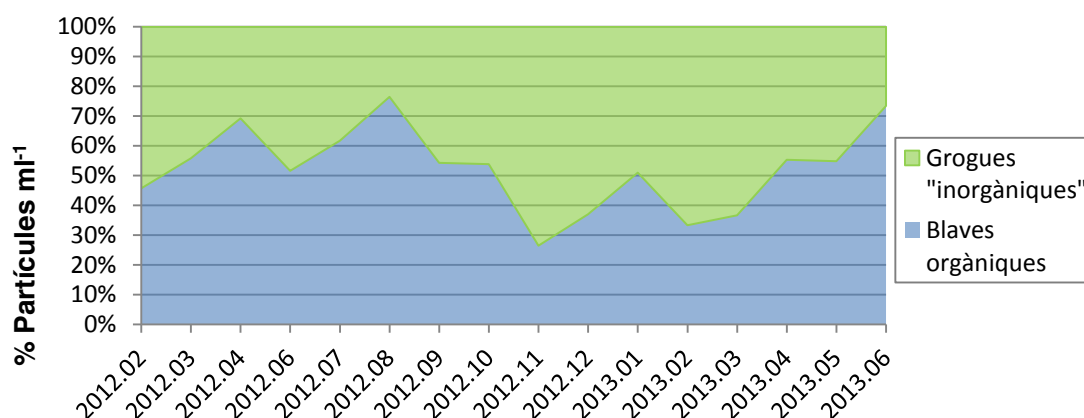


Figura 17. Percentatge de partícules ml^{-1} blaves i grogues respecte el total.

En les figures presentades a continuació s'han intentat trobar, mitjançant un anàlisi estadístic de Regressió múltiple, correlacions entre la variable estudiada de Partícules ml^{-1} i diversos regresors com ara: els valors dels paràmetres ambientals obtinguts durant el mostreig i les dades de clorofil-la i de bacteris proporcionades per altres investigadors del centre.

L'estudi per a les partícules grogues (Fig. 18b) mostra una correlació significativa entre la variable i els regresors ($p\text{-valor} < 0.05$) i on el model proposat permet explicar més del 85% de la variabilitat ($R^2(\text{ajustat})$). Els paràmetres amb efectes rellevants són la profunditat del disc de Secchi i l'abundància bacteriana ($p\text{-valor} < 0.05$).

Per a les partícules blaves (Fig. 18a) en canvi, el model proposat no és tan efectiu ($p\text{-valor} > 0.05$) i només explicaria prop del 37% de la variabilitat ($R^2(\text{ajustat})$). Tan sols la clorofil-la mostraria efectes significatius.

Análisis de Regresión Múltiple

(a) Variable dependiente: Blue particles ml

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
CONSTANTE	-45632,4	59466,1	-0,767369	0,4606
Temperatura °C	145,164	87,077	1,66708	0,1265
Secchi m	7,49989	73,9846	0,101371	0,9213
Salinitat CTD	1167,86	1555,0	0,751039	0,4699
Chl total	2950,92	1114,25	2,64836	0,0244
Bacteris cel ml	0,00010946	0,00143516	0,0762699	0,9407

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	8,79262E6	5	1,75852E6	2,74	0,0825
Residuo	6,4287E6	10	642870,0		
Total (Corr.)	1,52213E7	15			

R-cuadrado = 57,7651 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 36,6477 porcentaje
Error estándar de est. = 801,792
Error absoluto medio = 568,07
Estadístico de Durbin-Watson = 1,39973 (P=0,0204)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,246591

Análisis de Regresión Múltiple

(b) Variable dependiente: Yellow particles ml

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
CONSTANTE	42825,2	52158,6	0,821058	0,4308
Temperatura °C	93,6292	76,3766	1,22589	0,2483
Secchi m	-507,926	64,893	-7,82713	0,0000
Salinitat CTD	-801,941	1363,91	-0,587971	0,5696
Chl total	1459,88	977,322	1,49375	0,1661
Bacteris cel ml	-0,00416957	0,0012588	-3,31233	0,0078

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	4,5065E7	5	9,013E6	18,22	0,0001
Residuo	4,9458E6	10	494580,0		
Total (Corr.)	5,00108E7	15			

R-cuadrado = 90,1105 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 85,1658 porcentaje
Error estándar de est. = 703,264
Error absoluto medio = 475,193
Estadístico de Durbin-Watson = 2,57707 (P=0,0232)
Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,30106

Figura 18. Regressió múltiple entre concentració de partícules (a) blaves i (b) grogues, i regresors ambientals, clorofil·la i bacteris.

3.4 Abundància de grups bacterians específics

Bacteris associats a partícules (Fig. 19a). L'abundància dels grups estudiats respecte el total de bacteris associats és diversa i varia segons l'estacionalitat.

El grup amb una abundància relativa més gran és el de Citòfagues que, a més, domina durant tot l'any amb un pic màxim de més del 20% a la tardor. Durant les estacions més càlides, la proporció de Gamma-proteobacteris se situa propera a la majoritària, representant un 15% mentre que a l'època més freda la proporció de Citòfagues es dispara. *Roseobacter* i *Alteromonas* són els gèneres de menys abundància amb valors generalment per sota del 5%.

Bacteris lliures (Fig. 19b). Citòfagues torna a ser el grup de més abundància i *Alteromonas* el de menys. Gamma-proteobacteris i *Roseobacter* presenten valors més similars que en partícules.

Cal destacar que en aquest cas, l'abundància relativa més alta no arriba al 1.6% fet que reflexa l'elevada complexitat de la comunitat microbiana.

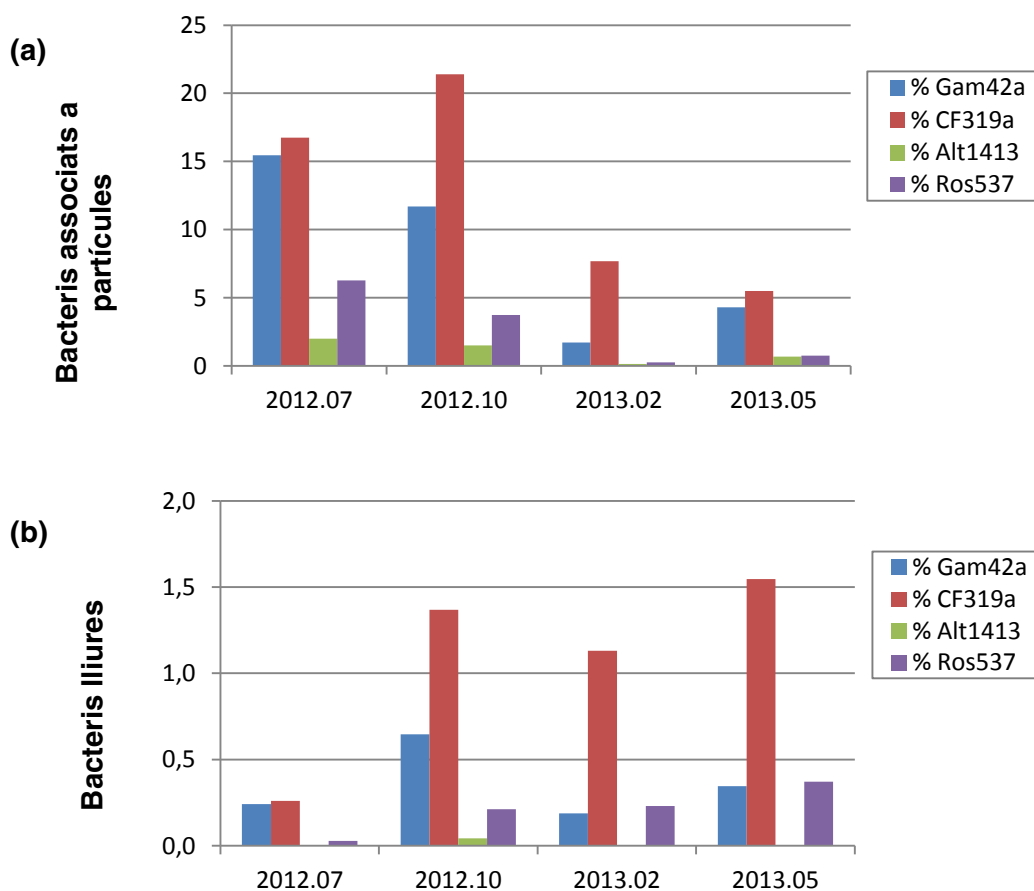


Figura 19. Abundàncies relatives de bacteris associats a partícules (a) i lliures (b).

La proporció de bacteris lliures i associats a partícules per a cada grup específic comparteix un perfil similar en tots els casos excepte en *Alteromonas*.

Majoritàriament, la fracció lliure representa més del 90% del total de bacteris del grup essent principalment important en Citòfagues i Gamma-proteobacteris (Fig. 20b i 20a). Per a *Roseobacter* (Fig. 20d) la fracció lliure és també molt elevada però a diferència del cas anterior, aquesta disminueix fins a poc més del 70% al mes de Juliol. La proporció de bacteris associats a partícules guanya pes a l'estiu en tots els grups.

En el cas d'*Alteromonas* (Fig. 20c) la fracció de bacteris associats a partícules té una representació important amb valors propers al 35% del total del grup. Sorprenentment, per al mes d'estiu s'ha obtingut una proporció d'associats del 100% mentre que a l'octubre aquesta disminueix fins al 5%.

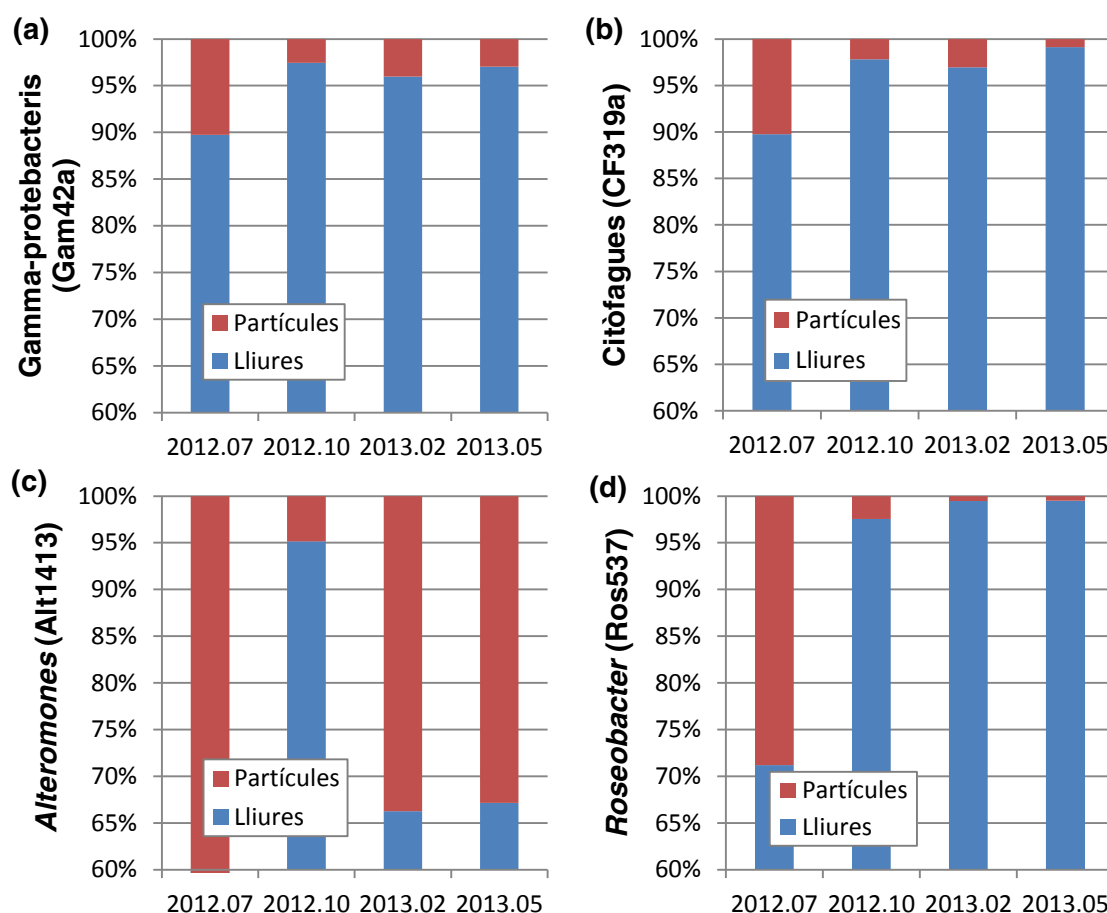


Figura 20. Proporció de bacteris lliures i associats a partícules per a cada grup analitzat. (a) Gamma-proteobacteris, (b) Citòfagues, (c) *Alteromonas* i (d) *Roseobacter*.

4 Discussió

En el present treball, s'ha volgut estudiar l'estructura de les partícules i de les comunitats bacterianes associades en un ecosistema marí costaner.

Per a la realització de l'estudi s'han pres mostres periòdiques d'aigua de la badia de Blanes. Posteriorment, aquestes han estat tractades amb tinció DAPI i per la tècnica de CARD-FISH a fi d'obtenir dades sobre abundància i característiques de les partícules, així com concentracions de bacteris lliures i associats totals, i dels principals grups estudiats.

Amb els resultats generats a partir del tractament de les dades, s'ha mirat d'establir correlacions, tendències i similituds per a conèixer la dinàmica del sistema i poder donar resposta a les qüestions plantejades inicialment.

4.1 Hi ha més partícules i agregats (majoritàriament orgànics) després dels blooms hivernals de fitoplàncton?

La concentració de partícules blaves (orgàniques) i la seva proporció respecte el total, presenten un lleuger augment durant els primers mesos de l'any. La concentració de partícules blaves assoleix el seu màxim cap als mesos de Març – Abril ($3600 \text{ partícules ml}^{-1}$) mentre que els valors mínims d'aquestes es donen des de finals d'estiu fins a l'hivern.

D'altra banda, l'àrea total de les partícules també esdevé màxima a inicis d'any (Gener – Febrer $0.30 \text{ mm}^2 \text{ ml}^{-1}$) mentre que torna a presentar valors més baixos des de finals d'estiu fins a l'hivern.

Es podria dir doncs, que les partícules blaves són més grosses i més nombroses durant l'època posterior als blooms fitoplanctònics. D'aquesta manera, tot això podria indicar una possible entrada de matèria orgànica formada per materials provinents de la necromassa d'organismes planctònics, la desintegració d'agregats fecals, etc.

A Blanes, hi ha estacionalment un bloom de fitoplàncton que té lloc a l'hivern (Gasol *et al.*, 2012). Així la correlació observada entre partícules blaves i clorofil·la recolzaria un origen fitoplanctònic d'aquestes degut, tant als propis organismes com a la contribució de les partícules extrapolimèriques transparents, TEP en la formació d'agregats (Mostajir *et al.*, 1995).

La idea d'una font fitoplanctònica autòctona també es compleix segons les tendències generals observades per Riley, que descriu un cicle estacional biomodal amb pics en les concentracions de partícules i agregats a l'hivern i a l'estiu inicial relacionats amb els estocs de fitoplancton (Riley *et al.*, 1964). Aquest model és rescatat en diverses ocasions (Mostajir *et al.*, 1995), i es lliga les interaccions dels microorganismes amb aquests detritus plantejant que, els agregats orgànics són colonitzats com a substrat per bacteris tornant-se en aliment pel zooplàncton.

Segons aquestes premisses, els pics observats en la concentració de partícules blaves d'aquest estudi i els pics correlatius en la colonització bacteriana de partícules blaves reforçarien la hipòtesi inicial.

Altres estudis, (Mostajir *et al.*, 1997) proposen una classificació de les partícules en funció de la seva mida i composició, que reflexaria orígens diferents. Segons aquesta classificació, les partícules detrítiques (blaves) més grosses, d'entre 5 i 10 μm i amb una ràtio C:N:P de 308:37:1, podrien provenir d'organismes planctònics morts.

En el nostre cas, si bé no hi ha dades de la composició elemental de les partícules, la consideració que se n'ha fet segons la mida, s'avé al proposat per Mostajir en el seu estudi del 1997.

4.2 Hi ha més partícules i agregats (majoritàriament inorgànics) després de fortes precipitacions?

Els pics en la concentració de partícules grogues (majoritàriament inorgàniques) (Mostajir *et al.* 1995, 1997) se centren a la tardor i a l'inici de la primavera fet que podria ser degut a una entrada al·lòctona de matèria durant les estacions més plujoses.

Les dades de regressió indiquen que paràmetres com la fondària del disc de Secchi i la concentració bacteriana tenen efectes significatius sobre la concentració de partícules grogues, mentre que per la clorofil·la no hi ha una correlació evident. Això indicaria que la disminució en la transparència de l'aigua, podria ser deguda a una major presència de partícules grogues.

La correlació obtinguda entre la concentració de partícules grogues i les mesures del disc de Secchi s'explicaria, com es registra en altres estudis (Gasol *et al.*, 2012), per dos períodes d'augment de la turbidesa corresponents a primavera i tardor que serien deguts a les fortes pluges pròpies de l'estacionalitat mediterrània. Així les abundants

precipitacions comportarien una aportació extra de matèria al·lòctona, que es traduiria en una major turbulència de l'aigua.

Els resultats obtinguts per a la correlació entre partícules grogues i bacteris en aquest estudi, es corresponen amb el mostrat en estudis anteriors (Mostajir *et al.*, 1995) on també s'obté una lleugera correlació entre partícules grogues i bacteris a l'inici de la primavera. Mostajir troba també un segon pic de partícules grogues durant els mesos d'Octubre – Novembre però que no guarda relació ni amb els nivells de bacteris ni amb els de clorofil·la.

D'aquesta manera, es planteja la idea d'altres fonts de matèria lligades a factors ambientals; com podrien ser en el cas del present estudi, els aports fluvials deguts a les fortes precipitacions estacionals que es donen a badia de Blanes (Alonso-Sáez *et al.*, 2007).

4.3 La composició de les comunitats microbianes és diferent en funció de si són de vida lliure o estan adherides?

Les abundàncies de grups bacterians específics de l'estudi present mostren, tant per a lliures com per a associats, valors més alts per a Citòfagues a les quals segueixen Gamma-proteobacteris, *Roseobacter* i finalment *Alteromonas* (pertanyents al grup de Gamma-proteobacteris).

Les quatre sondes utilitzades van ser triades amb la finalitat d'aconseguir representar bacteris que poguessin ser trobats associats a partícules, com ara *Alteromonas*. Tot i englobar-se dins els Gamma-proteobacteris, s'ha considerat aquest grup de forma concreta, degut a que se li han trobat gens específics d'adhesió (Eilers *et al.*, 2000).

A diferència del que semblen mostrar els resultats obtinguts, estudis anteriors (Grossart *et al.*, 2005) demostren que els bacteris lliures i els associats a fitoplàncton són significativament diferents els uns dels altres i que a més estan dominats per grups filogenètics diferents. No obstant, cal destacar que amb les sondes utilitzades en el present estudi, tan sols s'arriba a representar l'1,5% del total de la comunitat bacteriana lliure, pel que no es poden establir conclusions específiques de la diversitat de les comunitats a partir d'aquesta comparació.

Els resultats obtinguts però, si que proporcionen informació valuosa sobre la possible contribució de cada grup estudiat, a la comunitat bacteriana.

Pel que fa a bacteris associats, cal destacar que els grups estudiats presenten en alguns casos percentatges molt importants de la comunitat bacteriana total (Citòfagues 20%), mentre que dins els bacteris lliures la proporció representada pels grups estudiats arriba tant sols al 1'5%. Segons això, es podria establir que la comunitat bacteriana associada a partícules està molt més definida i la conformarien un petit nombre de grups bacterians en front la immensa heterogeneïtat de la comunitat bacteriana lliure.

Dins de cada grup específic, es manté també una tendència general amb una major proporció de bacteris lliures (90%). En *Alteromonas*, no obstant, la fracció de bacteris associats a partícules té més pes i en alguns casos, fa decaure la proporció de lliures fins a valors propers al 65%.

De Long *et al.*, 1993 troba que els bacteris pertanyents al grup de les Citòfagues, que destaquen per la capacitat de degradació d'un ampli rang de compostos polimèrics, són més abundants en la neu marina que en l'aigua circumdant. En comparació amb els resultats obtinguts en l'estudi present, si bé és cert que per a bacteris associats a partícules, Citòfagues presenten el percentatge més abundant, aquestes també són majoritàries en bacteris lliures. A més, les diferències exposades per De Long tampoc es reflecteixen en la proporció de bacteris lliures i en partícules obtinguda per a cada grup específic, on en aquest cas la proporció associada a partícules és molt més alta en *Alteromonas*.

En estudis anteriors (Martinez *et al.* 1996), on s'han observat diferents patrons enzimàtics en bacteris aïllats a partir de partícules i a partir de l'aigua circumdant, es conclou que la dominància d'uns grups en concret podria reflectir una selectivitat vers la utilització dels components macromoleculars. Segons això la composició de les comunitats microbianes lliures i associades a partícules variaria en funció de la composició elemental del substrat, ja que els autors no troben diferències significatives entre els perfils d'activitat enzimàtica de bacteris lliures i associats.

Un altre enfoc interessant per a estudis posteriors al present treball, podria consistir en estudiar les diferències entre la comunitat bacteriana associada a partícules i la comunitat bacteriana lliure observant, activitats enzimàtiques dins de cada grup específic. La utilització de diferents substrats es podria quantificar amb una determinació de l'activitat de diversos enzims o a partir de l'observació específica del

grau d'utilització de diversos substrats mitjançant MAR-FISH (Microautoradiografia combinada amb hibridació *in situ* fluorescent) (Fourquez *et al.*, 2012).

4.4 La composició de les comunitats microbianes és diferent segons l'època de l'any?

Al llarg de l'any, si bé la composició dels grups estudiats de la comunitat microbiana sembla mantenir-se bastant, l'abundància relativa respecte al total sí que es presenta variable. Els resultats d'aquest estudi concordarien doncs amb la idea de que les variacions temporals dels substrats, comportarien variacions en les estratègies d'utilització de la matèria, que es veurien reflectides en diferents perfils bacterians (Martinez *et al.*, 1996).

Dins de cada grup hi ha una tendència general a una major proporció de bacteris associats a partícules durant l'estiu, que durant la resta de l'any, com també observa (Alonso-Sáez *et al.*, 2007). Aquesta major colonització bacteriana a més, coincideix amb un pic observat en l'àrea total de partícules orgàniques, l'origen del qual podria suposar un aspecte interessant a investigar en estudis futurs.

Els canvis observables més significatius vindrien donats per exemple, per *Roseobacter*. Associat a partícules passa de representar al voltant d'un 5% de la comunitat durant l'estiu i la tardor, a menys de l'1% durant l'hivern i la primavera. En vida lliure en canvi, presenta valors més alts a l'hivern i la primavera, mentre que és gairebé absent a l'estiu.

Aquesta última dada, coincideix amb els canvis estacionals descrits per Alonso-Sáez *et al.*, 2007; on es mostra que l'abundància de *Roseobacter* augmenta davant condicions riques en nutrients; com a la primavera, on la disponibilitat és alta o a l'hivern acompanyant els blooms de fitoplàncton.

Un altre canvi significatiu seria la baixada en l'abundància de Citòfagues lliures durant l'estiu, quan gairebé s'igualen a Gamma-proteobacteris, mentre que la resta de l'any presenta valors bastant superiors.

Gamma-proteobacteris lliures presenta valors baixos a la tardor i l'hivern, mentre que associat a partícules pateix un marcat augment a l'estiu que també coincideix amb els canvis exposats per Alonso-Sáez *et al.*, 2007. Cal tenir en compte però que en els resultats mostrats en el present estudi, aquest pic estival no es veu representat en els bacteris lliures.

5 Conclusions

La dinàmica de la concentració de partícules i bacteris entre febrer de 2012 i juny de 2013 a la badia de Blanes és altament complexa i està regulada a diversos nivells per una gran quantitat de factors tant ambientals com propis del sistema.

D'aquest estudi, en podem extreure les següents conclusions principals:

- La concentració de partícules varia durant tot l'any amb pics de partícules blaves a l'inici de la primavera, i de partícules grogues a finals de primavera i a la tardor.

La concentració de partícules grogues sembla estar inversament correlacionada amb la transparència de l'aigua (fondària del disc de Secchi).

La concentració de partícules blaves en canvi, semblaria estar correlacionada amb la concentració de clorofil·la.

- La colonització bacteriana té el seu màxim a la primavera (0.5 – 0.7%) i es dóna majoritàriament en partícules blaves (orgàniques) independentment de la mida d'aquestes.
- Tenint en compte els grups estudiats, la composició de la comunitat microbiana associada a partícules està molt més definida que la de bacteris de vida lliure, on trobem una alta heterogeneïtat.

La proporció dels grups específics de bacteris estudiats representen fins a un 20% del total d'associats a partícules, mentre que per als lliures la representació tan sols arriba al 1.5% en el seu màxim.

- En general, la proporció de bacteris associats a partícules és més alta durant els mesos d'estiu (entre el 10 i el 30%) que durant la resta de l'any (entre l'1 i el 5%).

6 Bibliografia

Allredge, A. & Gotschalk, C. (1990). The relative contribution of marine snow of different origins to biological processes in coastal waters. *Cont. Shelf. Res* 10: 41-58.

Alonso-Sáez, L. & Gasol, J.M. (2007). Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in Northwestern Mediterranean coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 11: 3528-3535.

Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., Gasol, J.M. (2012). Bacterial uptake of low molecular weight in the subtropical Atlantic: Are major phylogenetic groups functionally different?. *Association for the Sciences of Limnology and Oceanography ASLO*, 57 (3) 798-808.

Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sà, E.L., Sánchez, O., González, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedrós-Alió, C., Gasol, J.M. (2007). Seasonality in bacterial diversity in north-western Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *Federation of European Microbiological Societies FEMS*, 60: 98-112.

Alonso-Sáez, L., Vázquez-Domínguez, E., Cardelús, C., Pinhassi, J., Sala, M.M., Lekunberri, I., Balagué, V., Vila-Costa, M., Unrein, F., Massana, R., Simó, R., Gasol, J.M. (2008). Factors controlling the year-round variability in carbon flux through bacteria in coastal marine system. *Ecosystems*, Vol. 11: 397-409.

Amann, R. & Fuchs, B.M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature Reviews in Microbiology* 6: 339-349.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied environmental Microbiology* 56: 1919-1925.

Azam, F., Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews, Focus on Marine Microbiology*, Vol. 5: 782-791.

Azam, F., Smith, D.C., Steward, G.F., Hagström, A. (1993). Bacteria-Organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology* 28:167-179.

- Barber, R. (1966). Interaction of bubbles and bacteria in the formation of organic aggregates in sea-water. *Nature* 211: 257-258.
- Biddanda, B. (1985). Microbial synthesis of macroparticulate matter. *Marine Ecology Prog. Ser.* 20: 241-251.
- Briddanda, B. & Pomeroy, L. (1988). Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in sea water I. Microbial succession. *Marine Ecology Prog. Ser.* 42: 79-88.
- Buchan, A., González, J.M., Moran, M.A. (2005). Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 5665-5677.
- Copin-Montégut, G. & Avril, B. (1993). Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the north-western Mediterranean sea. *Deep Sea Research* 40: 1963-1972.
- Cottrell, M.T. & Kirchman, D.L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the cytophaga-flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1692-7.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 434-444.
- De Long, E.F., Franks, D.G., Alldredge, A.L. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* 38: 924-934.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Amann, R. (2000). Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 3044-3051.
- Ferrera, I., Gasol, J.M., Sebastián, M., Hojerová, E., Koblížek, M. (2011). Comparison of growth rates of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and other bacteroplankton groups in coastal Mediterranean waters. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 21: 7451-7458.

Fourquez, M., Obernosterer, I., Blain, S. (2012). A method for the use of the radiotracer ^{55}Fe for microautoradiography and CARD-FISH of natural bacterial communities. Federation of European Microbiological Societies FEMS, 337: 132-139.

Fowler, S. & Knauer, G. (1986). Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. Prog. Oceanography 16: 147-194.

Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalback, M.S., Steele, J.A. Brown, M.V., Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS, 103: 13104-9.

Gasol, J.M., Massana, R., Simó, R., Marrasé, C., Acinas, S., Pedrós-Alió, C., Pelejero, C., Sala, M., Calvo, E., Vaqué, D., Peters, F. (2012). Blanes bay. ICES Cooperative Research Report No. 313.

Grossart, H.-P., Levold, M.A., Simon, M., Brinkoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, Environmental Microbiology, 7: 860-873.

Karl, D.M., Proctor, L.M. (2007). Foundations of microbial oceanography. Oceanography, Vol. 20, No. 2.

Lehours, A.C., Cottrell, M.T., Dahan, O., Kirchman, D.L., Jeanthon, C. (2010). Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean sea in relation to environmental variables. Federation of European Microbiological Societies FEMS Microbiological Ecology, 74: 397-409.

Lemée, R., Rochelle-Newall, E., Van Wambeke, F., Pizay, M.-D., Rinaldi, P., Gattuso, J.-P. (2002). SEasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in open NW Mediterranean Sea. Aquatic Microbiological Ecology, 29: 227-37.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. Systematic and Applied Microbiology 15: 593-600.

Martinez, J., Smith, D.C., Steward, G.F., Azam, F. (1996). Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. Aquatic Microbial Ecology, Vol. 10: 223-230.

Mostajir, B., Dolan, J.R., Rassoulzadegan, F. (1995) Seasonal variations of pico- and nano-detrital particles (DAPI Yellow Particles, DYP) in the Ligurian sea (NW Mediterranean). *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 9: 267-277.

Mostajir, B., Fagerbakke, K.M., Heldal, M., Thingstad, T.F., Rassoulzadegan, F. (1997). Elemental composition of individual pico- and nano-sized marine detrital particles in the northwestern Mediterranean sea. *Oceanologica ACTA*, Vol. 21 - N^o4.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3094-3101.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. (2004). Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2nd edn 3.11. Akkermans A.D.L. de Bruijn F.J., van Elsas J.D. (eds). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 711-726.

Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., Alonso-Sáez, L., Sala, M.M., Vidal, M., Pedrós-Alió, C., Gasol, J.M. (2006). Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean sea. *Aquatic Microbiological Ecology*, 44: 241-50.

Pomeroy, L.R. (1974). The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, 24: 499-504.

Pomeroy, L.R., Williams, P.J.leB., Azam, F., Hobbie, J.E. (2007). The microbial loop. *Oceanography*, Vol. 20, No. 2.

Porter, K. & Feig, Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.

Preisendorfer, R.W. (1986). Secchi disk science: visual optics of natural waters. *Limnology and Oceanography*, 31: 909-926.

Puddu, A., Zoppinni, A., Fazi, S., Rosati, M., Amalfitano, S., Magaletti, E. (2003). Bacterial uptake of DOM released from P-limited bacterioplankton. *Federation of European Microbiological Societies FEMS, Microbiological Ecology*, 46: 257-68.

Riley, G.A., Wangersky, P.J. & Van Hemert, D. (1964). Organic aggregates in tropical and subtropical surface waters of the north Atlantic ocean. *Limnology and Oceanography* 9: 564-550.

Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C., Massana, R. (2003). Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbiological Ecology*, 31: 163-74.

Sheldon, R.W., Prakash, A., Sutcliffe, W.H. (1972). The size distribution particles in the ocean. *Limnology and Oceanography ASLO*, Vol 17, No. 3, (May, 1972) pp.327-340.

Sintes, E. & Herndl, G.J. (2006). Quantifying substrate uptake by individual cells of marine bacterioplankton by catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization combined with microautoradiography. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 7022-7028.

Vezulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G., Pruzzo, C. (2011). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME Journal* 1-10.

Yokokawa, T. & Nagata T. (2005). Growth and grazing rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 6799-6807.

Azam, F., Long, R.A. "Sea snow microcosmos", [en línia]. *Revista Nature*. Vol. 414 (2001). Adreça URL: < <http://us.macmillan.com/>>.

Institut de Ciències del Mar. CSIC. Adreça URL: <<http://www.icm.csic.es/>>.

Institut de Ciències del Mar. CSIC. Departament de Biologia Marina i Oceanografia. Adreça URL: <<http://wb.icm.csic.es:591/biologia/FMPro?-db=images.fp5&-lay=web&-format=welcome.htm&-script.pfind=update&-findany>>.

Observatori Microbià de la Badia de Blanes. BBMO. Adreça URL: <<http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/bbmo/>>.