

TITULO: Aproximación a la diversidad del bacterioplancton mediante el análisis del RNA de bajo peso molecular

PALABRAS CLAVE: Ecología, diversidad, virus, bacterias, algas, RNA electroforesis, gremios, bacterias fototróficas, fisiología

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Carlos Pedrós-Alió

INSTITUCION: Instituto de Ciencias del Mar, CSIC

DIRECCION: Passeig Nacional s/n, 08039-Barcelona TEL.: 93 / 310-6450 /
prof. número ext.

RESUMEN:

La diversidad del bacterioplancton es totalmente desconocida debido a la imposibilidad de determinar las especies *in situ*. Sin embargo, el conocimiento de esta diversidad es necesario tanto desde un punto de vista teórico (para saber si se comporta igual que la de animales y plantas), como aplicado (por ejemplo, para poder realizar predicciones sobre las consecuencias de la liberación de microorganismos manipulados genéticamente en el medio). Nuestro objetivo es aproximarnos a dicha diversidad a través del análisis del RNA en distintas comunidades. La técnica se basa en un aislamiento no selectivo del RNA total y su posterior separación mediante electroforesis en geles, bajo condiciones apropiadas para la separación de los RNA de bajo peso molecular: rRNA 5S y tRNA (Höfle 1990). Este estudio dará respuesta a una serie de cuestiones ecológicas relativas a la diversidad del bacterioplancton. Por una parte se analizará tal diversidad en ambientes marinos y de agua dulce simultáneamente con la del fitoplancton. Se comprobará si la presencia de virus está correlacionada con una diversidad baja. Se analizarán gradientes de salinidad y de productividad para comprobar si la diversidad se comporta según lo esperado de la teoría ecológica. Finalmente, se estudiará el caso concreto de las bacterias fototróficas del azufre por varias razones: permiten comprobaciones gracias a las diferencias morfológicas entre especies, son muy abundantes en la naturaleza, y permiten el análisis de la diversidad dentro de un gremio y de las razones fisiológicas que explican la composición en especies de un gremio.

TITLE: An approach to bacterioplankton diversity through the analysis of low molecular weight RNA

KEYWORDS: Ecology, diversity, virus, bacteria, algae, RNA, electrophoresis, guilds, phototrophic bacteria, physiology

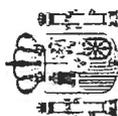
HEAD OF THE PROJECT: Carlos Pedrós-Alió

INSTITUTION: Marine Sciences Institute, CSIC

ADDRESS: Passeig Nacional s/n PHONE: 343-310-6450

SUMMARY:

Diversity of bacterioplankton is totally unknown. This is due to the fact that *in situ* species identification is not possible. An understanding of diversity, however, is necessary both from theoretical (does it behave like the diversity of animals and plants?) and applied (in order to make predictions about the fate of genetically engineered microorganisms released into the environment) points of view. Our objective is to approach the diversity of bacterioplankton using the RNA band patterns in different communities. This technique consists of a non selective isolation of total RNA, followed by separation by gel electrophoresis under conditions which separate the low molecular weight RNAs: 5S rRNA and tRNA (Höfle 1990). This approach will provide answers to a series of ecological questions related to diversity. Diversity of bacterioplankton will be analysed together with that of phytoplankton in a series of freshwater and marine ecosystems. We will check whether the abundance of viruses is correlated with low diversity of prey. Diversity will be determined in environmental gradients of productivity and salinity to check whether bacterioplankton diversity behaves according to ecological theory. Finally, sulfur phototrophic bacteria will be used as a case study. This group has been chosen because it offers several advantages for our purposes: species can, in general, be differentiated morphologically, they are very abundant in nature, and several species can coexist in a guild and, thus, we can check whether this coexistence is due to slight differences in physiology as predicted by theory.



"Bacteria, with only about 4000 described species, remain a terra vitae incognita because of the astonishingly small amount of research devoted to their diversity, as opposed to the genetics and molecular biology of select species."

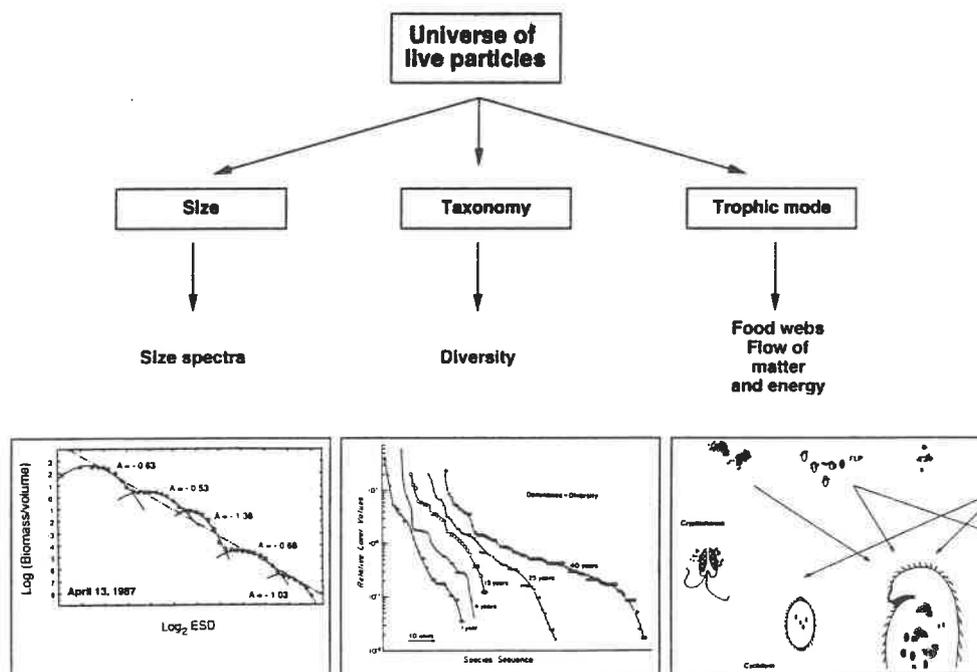
Ehrlich & Wilson (1991) Science 253: 759.

Relación con los proyectos anteriores del grupo de trabajo

Se puede considerar al universo vivo dividido en partículas de biomasa (Fig. 1). Dependiendo de la propiedad de estas partículas que decidamos analizar, la aproximación a su estudio será diferente. Si elegimos el tamaño como propiedad significativa, estaremos estudiando la distribución de las partículas en espectros de tamaño. Si elegimos las características tróficas, nos centraremos en el estudio de los flujos de energía. Por último, si tomamos la taxonomía, el parámetro macroscópico resultante es la diversidad. Nuestra aproximación a la ecología microbiana ha consistido en ensayar estas diferentes aproximaciones en ecosistemas en los que los microorganismos fueran dominantes. Así, en proyectos anteriores, los componentes del presente grupo de trabajo han explorado las posibilidades de los espectros de tamaños (Gasol et al. 1991) y de la ecología trófica (Pedrós-Alió 1991, Pedrós-Alió et al. 1991). Para estos estudios se concentraron esfuerzos en un ecosistema, la laguna de Cisó, que podía estudiarse con suma facilidad (Pedrós-Alió et al. 1986, Gasol et al. 1990) y luego se extendieron parcialmente a otros sistemas: la desembocadura del Río Ebro, la laguna costera de la Massona, los lagos de Vilar y Banyoles, y más recientemente, el mar Mediterráneo.

En el presente proyecto se propone utilizar la tercera vía de aproximación mediante estudios de la diversidad microbiana en diferentes ecosistemas. Debido a que algunos aspectos de dicha diversidad están íntimamente unidos a consideraciones tróficas, se hace necesario incluir una serie de estudios sobre la vía número dos, concretamente sobre el papel de los virus en el plancton. Estos aspectos tróficos dan continuidad al proyecto anterior (PB87-0183, IP: C. Pedrós-Alió) y constituyen un puente con otro proyecto actual (MAR91-0359, IP: M. Alcaraz).

Figura 1.



Importancia de la diversidad

La diversidad es importante tanto desde un punto de vista teórico como aplicado (Sugihara 1980, May 1981, 1986). La particular distribución de individuos en especies que tenga cada comunidad es el resultado de un gran número de interacciones entre los organismos y el medio y entre los organismos entre sí. Por ello, la diversidad es una propiedad sinóptica de las comunidades. Su estudio permite comparar distintas comunidades entre sí sin la necesidad de analizar exhaustivamente los componentes y funcionamiento de cada una de ellas.

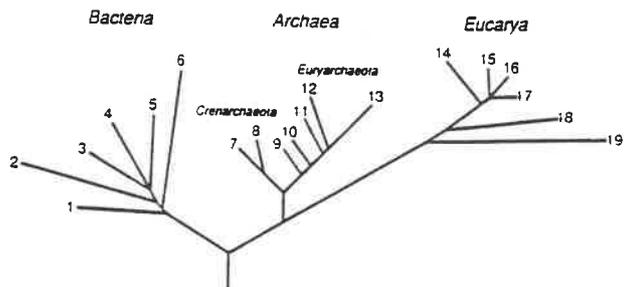
Desde un punto de vista aplicado, esta cualidad de propiedad sinóptica hace que la diversidad pueda utilizarse como diagnóstico, tanto para la evaluación del estado de una comunidad ("monitoring"), como para la toma de decisiones de gestión de dicha comunidad ("management", Magurran 1988, Ehrlich & Wilson 1991). En el campo de las comunidades microbianas, este último aspecto es de vital importancia para la toma de decisiones de gestión sobre la liberación de microorganismos manipulados genéticamente en el medio ambiente (por ejemplo Halvorson et al. 1985, Sussman et al. 1988).

La diversidad y los microorganismos

La diversidad tiene dos componentes: la riqueza de especies y la equitabilidad. La riqueza de especies consiste simplemente en el número total de especies presentes en la comunidad normalizado respecto al número de individuos contado o al espacio muestreado. La equitabilidad se refiere a la regularidad en la distribución de los individuos en cada especie (véase, por ejemplo, Margalef 1974 y Magurran 1988). El primer paso en cualquier estudio de diversidad consiste en asignar a una especie determinada cada individuo presente en la comunidad. En el caso de los microorganismos, sin embargo, esto no es posible. En general, su pequeño tamaño y su relativamente escasa diversidad morfológica hacen imposible la identificación *in situ*. En la mayor parte de los casos es necesario aislar los organismos en cultivos puros y realizar una serie de pruebas bioquímicas, de ultraestructura o inmunológicas para poder llegar a la especie (Atlas 1983). Pero es conocido que solamente un pequeño porcentaje de los microorganismos existentes en la naturaleza pueden ser aislados en cultivo puro. Wayne et al. (1987), por ejemplo, estiman que sólo se han aislado el 20% de las especies de bacterias presentes en la naturaleza. Además, empiezan a aparecer pruebas que indican que las bacterias aisladas en cultivos puros no son las más abundantes en la naturaleza (Giovannoni et al. 1990, Ward et al. 1990, Britschgi & Giovannoni 1991). Ward et al. (1990), por ejemplo, estudiaron la comunidad del tapete microbiano de Octopus Spring en el Parque Nacional de Yellowstone (EE.UU.). Dicha comunidad había sido objeto de numerosos estudios previos por métodos convencionales durante casi 30 años (Brock 1978). Ward et al. aislaron de forma no selectiva los RNA ribosómicos 16S de dicha comunidad y los secuenciaron. Ninguna de las secuencias correspondía a ninguno de los microorganismos conocidos y ninguno de los que se habían aislado por técnicas convencionales apareció entre los rescatados por Ward et al.

Por si todo esto fuera poco, la taxonomía de la mayor parte de los grupos microbianos es aún muy deficiente (Lee et al. 1985, Margulis et al. 1989, Holt 1986-89, Balows et al. 1991). Por ello, se desconoce la composición específica de las comunidades microbianas y solamente se han realizado estudios de diversidad con diatomeas (Patrick 1967, 1975) y fitoplancton (Margalef 1974, Estrada et al. 1988). Sin embargo, en el caso de bacterias, ciliados y flagelados, debido a que la taxonomía depende del aislamiento selectivo de cultivos a partir de muestras, se ignora cuántas especies distintas existen en un mismo ecosistema. De hecho, ni siquiera se sabe el orden de magnitud de esta riqueza en especies (¿una? ¿cien? ¿mil?).

Figura 2.



Objetivo general del proyecto

En el presente proyecto intentaremos una aproximación a la diversidad microbiana utilizando una serie de técnicas y estrategias que nos permitirán dar respuesta a varias preguntas ecológicas, soslayando los numerosos problemas arriba presentados. La aproximación se basa en considerar la diversidad desde el punto de vista genético, utilizando como indicadores los RNA ribosómicos y de transferencia sobre los que se basa el actual paradigma de clasificación de los seres vivos (Woese 1987, Woese et al. 1990, Fig. 2). La técnica que se utilizará es capaz de recuperar dicho material de muestras naturales por procedimientos no selectivos (Höfle 1988, 1989, 1990). Esta aproximación obvia los problemas de aislamiento e identificación *in situ* que presentan los microorganismos. Esta idea central se desarrolla en los apartados E y G del presente proyecto.

Estudios de taxonomía microbiana. Balows, Trüper, Dworkin, Harder & Schleifer (eds. 1990. The Prokaryotes 2ª ed. 3 vols. Springer-Verlag) es una descripción de todos los grupos bacterianos con explicaciones de sus características y métodos de aislamiento y cultivo. Holt, (editor general, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Vols. 1-4, 1984-1989) es considerada la máxima autoridad en taxonomía bacteriana. Lee, Hunter & Bovee (eds. 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. Soc. Protozoologists) es la referencia obligada para los microorganismos eucariontes. Margulis, Corliss, Melkonian & Chapman (eds. 1989. Handbook of Protozoology. Jones & Bartlett) es el equivalente del libro de Balows et al. para los microorganismos eucariontes. Finalmente, Woese (1987. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271 y 1990. *PNAS*, 87: 4576-4579) presenta la moderna taxonomía de los seres vivos basada en los rRNA 16S.

Estudios sobre la diversidad en general. Magurran (1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton U P) constituye una introducción clara y sistemática a la diversidad, incluyendo ejercicios sobre la utilización de diferentes índices. En Margalef (1974. Ecología. Omega) se puede encontrar un tratamiento más profundo de algunos de los aspectos de la diversidad. Contribuciones particularmente iluminadoras a la diversidad como reflejo de la estructura de las comunidades son las de May (1981. En May, R M (ed.), Theoretical Ecology. Principles and Applications. 2nd ed. Sinauer 197-227 y 1986. *Ecology*, 67: 1115-1126) y Sugihara (1980. *Amer. Nat.*, 116: 770-787). Por último Ehrlich & Wilson (1991. *Science* 253: 758-762) hacen un repaso ordenado a las razones por las que es importante el mantenimiento de la biodiversidad, tanto desde un punto de vista teórico como práctico.

Estudios sobre la diversidad microbiana. Los únicos estudios válidos de diversidad en microorganismos fueron llevadas a cabo con fitoplancton (Patrick 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58: 1335-1342 y 1975. En Cody, Diamond (eds.) Ecology and Evolution of Communities. Belknap Press, 445-459). Por ello, la revisión de Atlas (1983. *Adv. Microb. Ecol.*, 7: 1) aporta tan pocas cosas interesantes. A mediados de los 80, Pace y colaboradores propusieron aproximarse al estudio de la diversidad microbiana a través del análisis del RNA en comunidades naturales, mediante técnicas de biología molecular (Olsen et al. 1986. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40: 337-365; Pace et al. 1986. *Adv. Microb. Ecol.*, 9: 1-55). Después de siete años estas técnicas siguen siendo prometedoras a largo plazo, pero los resultados que han dado, a corto plazo, son decepcionantes y parciales debido a su gran complejidad (Giovannoni et al. 1990. *Nature*, 345: 60-63; Ward et al. 1990. *Nature*, 345: 63-65). La técnica que pensamos utilizar fue descrita por Höfle (1988. *J. Microbiol. Methods*, 8: 235-248), quien la utilizó sobre todo con fines quimiotaxonómicos (Höfle, 1990. En Biochemical and molecular approaches in aquatic microbial ecology, Overbeck & Chrost (eds.), Science Tech. Pub.) y más recientemente con fines parecidos a los nuestros (Höfle. 1988. *Arch. Hydrobiol. Beih., Ergebn. Limnol.*, 31: 71-77 y 1989. *Proceedings ISME 5*, Kyoto).

Estudios sobre virus. Torrella & Morita (1979. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:774-778) fueron los primeros en señalar la presencia de altas concentraciones de virus en el mar. Este punto fue resaltado con técnicas más cuantitativas hace apenas un par de años por varios grupos de forma casi simultánea (Bergh et al. 1989. *Nature*, 340:467-468; Proctor & Fuhrman. 1990. *Nature*, 343: 60-62). A estos estudios han seguido algunos trabajos en los que se analizan las técnicas de concentración y recuento de virus (Børsheim, K. Y. et al. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:352-356; Hara et al. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2731-2734; Suttle et al. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 721-726; Paul, J. H. et al. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2197-2204) y algún estudio más ecológico (Bratbak et al. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1400-1405; Suttle et al. 1990. *Nature*, 387:467-469; Heldal & Bratbak. 1991. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72:205-212; Proctor & Fuhrman. 1991. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 69:133-142).

Estudios sobre fisiología de bacterias fototróficas del azufre. Guerrero et al. (1987. *Acta Acad. Abo.* 47: 125-151) es uno de los pocos trabajos en los que se intentan sistematizar las observaciones, presentando hipótesis e intentando explicar la distribución de bacterias fototróficas en distintos ambientes. Beeftink, & Van Gemerden (1979. *Arch. Microbiol.* 121:161-167) es la base de gran número de estudios realizados más recientemente sobre diferentes procesos metabólicos en cultivos continuos en equilibrio. Mas & Van Gemerden (1991. *Arch. Microbiol.*, in press) es el primer trabajo en el que se describe la adaptación de las bacterias fototróficas a la limitación por nutrientes (fosfato). Van Gemerden, (1987. *Acta Acad. Abo.* 47: 13-27) explica en términos fisiológicos, a partir de experiencias de laboratorio, la coexistencia de bacterias fototróficas rojas y verdes observada en determinados ambientes.

OBJETIVOS CONCRETOS (ver instrucciones):

El presente proyecto constituye una aproximación al estudio de la diversidad en comunidades de microorganismos. Debido a las dificultades expresadas en el apartado C, el estudio se ha dividido en una serie de objetivos que se solapan entre sí y que abarcan aspectos que pueden parecer puntuales y desligados, pero que confluyen en la diversidad desde distintos puntos de vista. La justificación de tales objetivos se realizará en el apartado G.

E.1. Aproximación al estudio de la diversidad del bacterioplancton.

E.1.1. Determinación cuantitativa de un índice de diversidad basado en el RNA de bajo peso molecular en distintos ambientes acuáticos. Este índice se basará en el número e intensidad relativa de bandas de RNA de bajo peso molecular en electroforesis en geles de agarosa (Höfle 1988, 1990).

E.1.2. Comprobación de si la diversidad del bacterioplancton cumple las mismas regularidades que la de otros organismos mejor conocidos.

E.1.2.1. Relación entre diversidad y biomasa y entre diversidad y producción bacteriana. En principio, la diversidad debería disminuir al aumentar la producción.

E.1.2.2. Comparación de la diversidad del bacterioplancton con la del fitoplancton. Se espera que covarien.

E.1.2.3. Variación de la diversidad del bacterioplancton a lo largo de gradientes que provoquen cambios de la diversidad. Por ejemplo, gradientes de salinidad y de eutrofia. Esperaríamos que la diversidad disminuyera al aumentar la salinidad y la eutrofia.

E.1.3. Comprobación de la hipótesis según la cual la abundancia de virus en ambientes acuáticos solamente puede mantenerse cuando la diversidad de las presas (bacterio- y fitoplancton) es baja.

E.2. Estudio de la diversidad de un grupo bacteriano específico que permite contrastar el funcionamiento de la técnica utilizada. El grupo elegido es el de las bacterias fototróficas del azufre (más adelante se explican las razones de esta elección).

E.2.1. Caracterización de cepas de laboratorio según el patrón de bandas de RNA de bajo peso molecular. Este objetivo implica una comparación entre cepas de cada especie y entre especies. Con esta información se conseguirá: 1. Saber si la taxonomía convencional basada en la morfología se corresponde con la basada en el RNA. 2. Disponer de una base de datos necesaria para afrontar los objetivos posteriores.

E.2.2. Estudio de los patrones de bandas del RNA en comunidades naturales donde estas bacterias son abundantes. Este objetivo permitirá: 1. Comparar las bacterias presentes en la naturaleza con las de laboratorio (por primera vez se sabrá si se dispone en el laboratorio de las bacterias verdaderamente abundantes en el campo). 2. Hallar la diversidad de un gremio bacteriano en la naturaleza. 3. Realizar, por primera vez, una biogeografía de un grupo de bacterias.

E.2.3. Realizar un estudio equivalente al del apartado 1.3 con este grupo de bacterias.

E.2.4. Comprobar la hipótesis de que la coexistencia de varias especies del mismo gremio (en este caso, el fototrófico anoxigénico, Pedrós-Alió 1989) solamente es posible si existen pequeñas diferencias en la forma en que utilizan sus recursos, es decir en su fisiología. Este objetivo confirmaría de forma experimental las propiedades que se supone deben cumplir los gremios de organismos (Root 1967).

RAZONES QUE JUSTIFICAN LA NECESIDAD DE COORDINACION. (Sólo proyectos coordinados.)

Dadas las características del presente proyecto, la coordinación parecía inevitable. En primer lugar se planteó el problema de la diversidad microbiana como un objetivo interesante. Se vió que únicamente la utilización de técnicas moleculares permitiría este estudio. A continuación se hizo una búsqueda de los problemas concretos que, bajo el paraguas de la diversidad, eran susceptibles de estudio con garantías de resultados a corto plazo. Enseguida se vió que, para su correcta realización, eran necesarias dos cosas: por una parte, había que realizar los estudios en una serie de sistemas acuáticos muy distintos, cada uno de los cuales permitía clarificar diferentes problemas. Por ello, era conveniente aunar grupos con experiencia en limnología y en oceanografía. Y, en segundo lugar, se hizo patente que para afrontar el problema de la diversidad en comunidades complejas era necesario, primero, utilizar las técnicas en cultivos puros, después en sistemas sencillos y finalmente en sistemas complejos. Así mismo, la interpretación de los resultados sería mucho más sencilla si se disponía de un grupo de bacterias que pudiera utilizarse como control. Por ello se incorporó toda la parte de bacterias fototróficas. Con este fin, era necesario unir un grupo con experiencia en fisiología y cultivo de bacterias fototróficas y otro con mayor experiencia sinecológica y oceanográfica.

Los investigadores concretos, además, aportan experiencias muy distintas que ya han enriquecido la redacción del proyecto y que, sin duda, enriquecerán su realización y resultados. Jordi Mas aporta la experiencia en cultivos continuos y fisiología de bacterias fototróficas adquirida durante dos años en Holanda en el que probablemente es el mejor laboratorio del mundo en esta especialidad. Josep M. Gasol, sus conocimientos sinecológicos, limnológicos y conceptuales afinados durante dos años en la Univesidad McGill de Canadá, uno de los centros más prestigiosos de ecología acuática con una inclinación predictiva muy fuerte. Celia Marrasé aporta su experiencia oceanográfica de numerosas campañas en el Mediterráneo y las costas de África, además de la experiencia adquirida en Woods Hole, uno de los centros ocenográficos más conocidos por su calidad científica. Finalmente, C. Pedrós-Alió ha realizado un esfuerzo considerable durante los tres últimos años por diseñar la forma idónea de introducir en la ecología microbiana las prometedoras técnicas de biología molecular por una parte, y la teoría ecológica general por la otra. El primer objetivo le ha llevado a realizar estancias en los dos laboratorios más apropiados: el de N.R. Pace y el de M. Höfle, con el fin de aprender las técnicas de primera mano y decidir la más adecuada. Y el segundo objetivo se ha traducido en la redacción de un libro de ecología microbiana iniciado y continuado, en sendas estancias en el Center for Limnology de la Universidad de Minnesota, donde tuvo la oportunidad de interaccionar con limnólogos y ecólogos expertos en ecología general.

Existen dos ventajas más de tipo práctico. Desde el punto de vista del ICM, la colaboración con la Universidad proporciona un acceso directo al reclutamiento de futuros estudiantes y becarios, cuestión siempre delicada desde el CSIC. Para el grupo de la Universidad, en cambio, la asociación con el ICM permite el acceso a unos recursos de muestreo en alta mar que, de otro modo, serían totalmente inalcanzables.

APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRACTICA DE LOS RESULTADOS PREVISIBLES EN EL AREA DE LA SALUD:

HIPOTESIS, METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO. (En proyectos coordinados, un ejemplar de esta hoja para el proyecto principal y una para cada uno de los subproyectos.)

Incluyase: Sujetos de estudio, diseño, variables, recogida y análisis de datos, dificultades y limitaciones del estudio, así como etapas de su desarrollo.

G.1. Consideraciones generales.

Partimos del hecho de que se desconoce absolutamente todo acerca de la diversidad del bacterioplancton. Intentaremos aportar alguna luz explorando la diversidad a dos niveles: a) el bacterioplancton de forma global y b) un gremio bacteriano, el de las bacterias fototróficas del azufre, de forma específica. Aunque pretendemos llevar a cabo el proyecto de forma integrada, cada uno de los dos grupos de trabajo se centrará en uno de los dos objetivos. El grupo del ICM en el primero y el de la UAB en el segundo. Sin embargo, existirá una total permeabilidad entre ambos, de forma que algunas de las técnicas más especializadas se optimicen en uno de los dos laboratorios y allí se realicen todos los experimentos que la requieran. Así mismo, la proximidad geográfica facilitará la realización semanal de seminarios conjuntos para discutir los progresos del trabajo realizado. De hecho, la colaboración entre ambos grupos lleva ya un año funcionando con una serie de estudios sobre el ciclo del azufre, por lo que la coordinación durante la realización del presente proyecto está garantizada.

G.2. Metodología.

Casi todas las técnicas necesarias han sido previamente utilizadas por los componentes del equipo investigador. Las que se utilizarán por primera vez son la electroforesis de RNA de bajo peso molecular, y la determinación de la abundancia de virus. Por ello hemos sido sumamente cuidadosos en su elección y en establecer contactos con los investigadores que las han puesto a punto: M. Höfle, como ya se comentó, para la primera y M. Haldal (Bergen, Noruega) para la segunda.

G.2.1. Patrones de bandas del RNA de bajo peso molecular.

Esta es la técnica fundamental para todo el proyecto y, por ello, justificaremos su utilización con algún detalle. La técnica ha sido desarrollada por Manfred Höfle (Instituto Alemán de Biotecnología, Braunschweig, Alemania), quien la ha utilizado principalmente desde un punto de vista de quimiotaxonomía (Höfle 1988a y b). En los últimos años, ha iniciado su utilización en muestras naturales con fines parecidos a los aquí propuestos (Höfle 1989, 1990). El investigador principal de este proyecto visitó el laboratorio del Dr. Höfle en octubre de 1990 (entonces en Plön) y existe una relación continuada con él. De hecho, uno de los becarios que participarán en el presente proyecto visitará el laboratorio del Dr. Höfle a principios de 1992. La técnica ha sido esquematizada en la Fig. 3. Su sencillez garantiza, en nuestra opinión, el éxito en su utilización en el campo. La mayor parte de técnicas de biología molecular, por el contrario, tienen una complejidad que ocasiona que en muestras naturales no produzcan resultados fiables y requieren una experiencia y recursos en biología molecular que están fuera del alcance de cualquier ecólogo. Esto es especialmente cierto para las técnicas desarrolladas por Pace y colaboradores, cuyo laboratorio también fue visitado por el investigador principal de enero a marzo de 1990 (Pedrós-Alió 1990). Estas técnicas serán imprescindibles a largo plazo (diez o quince años), pero su utilización en ecología es todavía prematura y es conveniente dejar que los biólogos moleculares las perfeccionen hasta que su utilización sea menos problemática. Creemos, por todo ello, que hemos elegido la técnica óptima para nuestros propósitos. Su sencillez y el contacto permanente con su creador garantizan el éxito de su aplicación en ecología. Los problemas y limitaciones de la técnica han sido descritos con anterioridad (Höfle 1990).

G.2.2. Para cumplir los distintos apartados del objetivo E.1 se necesitan, además, las siguientes técnicas:

La microscopía de epifluorescencia en muestras teñidas con DAPI (Porter & Feig 1980) se utilizará para determinar la abundancia bacteriana. La biomasa se calculará a partir de las abundancias y de los volúmenes celulares determinados mediante microscopía óptica de fluorescencia y de contraste de fases, utilizando un sistema de análisis de imágenes.

La técnica de la frecuencia de células en división (FDC, Hagström et al. 1978) se utilizará para determinar la producción bacteriana heterotrófica. Para ello se utilizarán imágenes captadas por microscopía electrónica de barrido.

La abundancia y diversidad del fitoplancton se determinará mediante la técnica de Utermohl. En algunos casos se utilizará también la técnica del RNA de bajo peso molecular con fines comparativos.

Determinación de la abundancia de virus mediante su concentración y posterior recuento por microscopía. Se ensayarán dos técnicas de concentración, centrifugación a altas velocidades (Børsheim et al. 1990) y filtración por flujo tangencial (Proctor & Fuhrman 1991). Así mismo, se ensayarán dos técnicas de recuento, por microscopía de epifluorescencia (Hara et al. 1991) y por microscopía electrónica de transmisión (Børsheim et al. 1990). Se decidirá cual es la combinación óptima y finalmente se utilizará con muestras naturales.

G.2.3. Para cumplir los distintos apartados del objetivo E.2 se necesitan, además, las siguientes técnicas:

Cultivo de bacterias fototróficas del azufre por los métodos convencionales y en cultivos continuos, que requieren condiciones de esterilidad, anaerobiosis y alternancia de luz y oscuridad (Trüper & Pfennig 1990).

Estudio de la fisiología de algunos cultivos puros de estas bacterias. Concretamente, se necesita poder determinar las sustancias de reserva (tales como poliglucosa, PHB, azufre intracelular), compuestos indicadores de biomasa (tales como número de células, volumen celular y pigmentos), y concentraciones de algunos sustratos y productos del metabolismo, tales como ácidos grasos volátiles (acetato, piruvato, etc.), nutrientes inorgánicos (fosfato y amonio) y varios compuestos del azufre (sulfhídrico, tiosulfato, sulfato, polisulfuros y politionatos).

G.3. Plan de trabajo general.

El primer paso para un estudio de la diversidad del bacterioplancton consiste en hallar una técnica que permita determinar el número de especies presentes en una comunidad natural sin necesidad de tener que aislar los organismos en cultivo puro. Las técnicas basadas en el aislamiento y posterior análisis del RNA de una comunidad cumplen tales requisitos. Por una parte, el rRNA se obtiene de forma no selectiva (Fig. 3). La biomasa es concentrada por centrifugación o filtración, se rompen las células y se extrae el rRNA total. A continuación se separan los distintos rRNA por clonación o por electroforesis y posteriormente se secuencian. Por otra parte, la taxonomía bacteriana moderna está basada precisamente en el rRNA (Woese 1987, Woese et al. 1990). Por ello, estas técnicas permiten, por primera vez, realizar estudios de diversidad de bacterioplancton. Las que se basan en la obtención de clones del rRNA 16S, sin embargo, son excesivamente complicadas y, de hecho, aún no han dado resultados claros en medios naturales (Pace et al. 1986, Olsen et al. 1986, Giovannoni et al. 1990a, b, Ward et al. 1990, Britschgi & Giovannoni 1991). La técnica del RNA de bajo peso molecular, en cambio, es de una sencillez extremada y ya existen algunos estudios de campo que permiten esperar muy buenos resultados (Höfle, 1989, en preparación). En el lago Plußsee, Höfle siguió el patrón de bandas de RNA a lo largo del invierno y la primavera. Mientras que durante el invierno había una gran cantidad de bandas de intensidades similares, al llegar el máximo de fitoplancton en primavera, el número de bandas quedaba reducido a unas pocas y algunas de gran intensidad (Höfle 1989). Es fácil interpretar estos resultados como el paso de una comunidad de alta riqueza de especies y alta equitabilidad durante el invierno (de acuerdo con una situación de oligotrofia) a una comunidad dominada por unas pocas especies en la primavera (de acuerdo con una situación de crecimiento explosivo de algunas especies). La técnica, por lo tanto, ofrece las garantías necesarias para utilizarla como eje de nuestro estudio. La puesta a punto de esta técnica seguirá varias fases:

G.3.1. En primer lugar, se pondrá a punto con cultivos puros de bacterias fototróficas, ya que es de esperar que las dificultades iniciales sean más fáciles de solucionar en el laboratorio que en el campo. Esta fase cubrirá, además, el objetivo E.2.1.

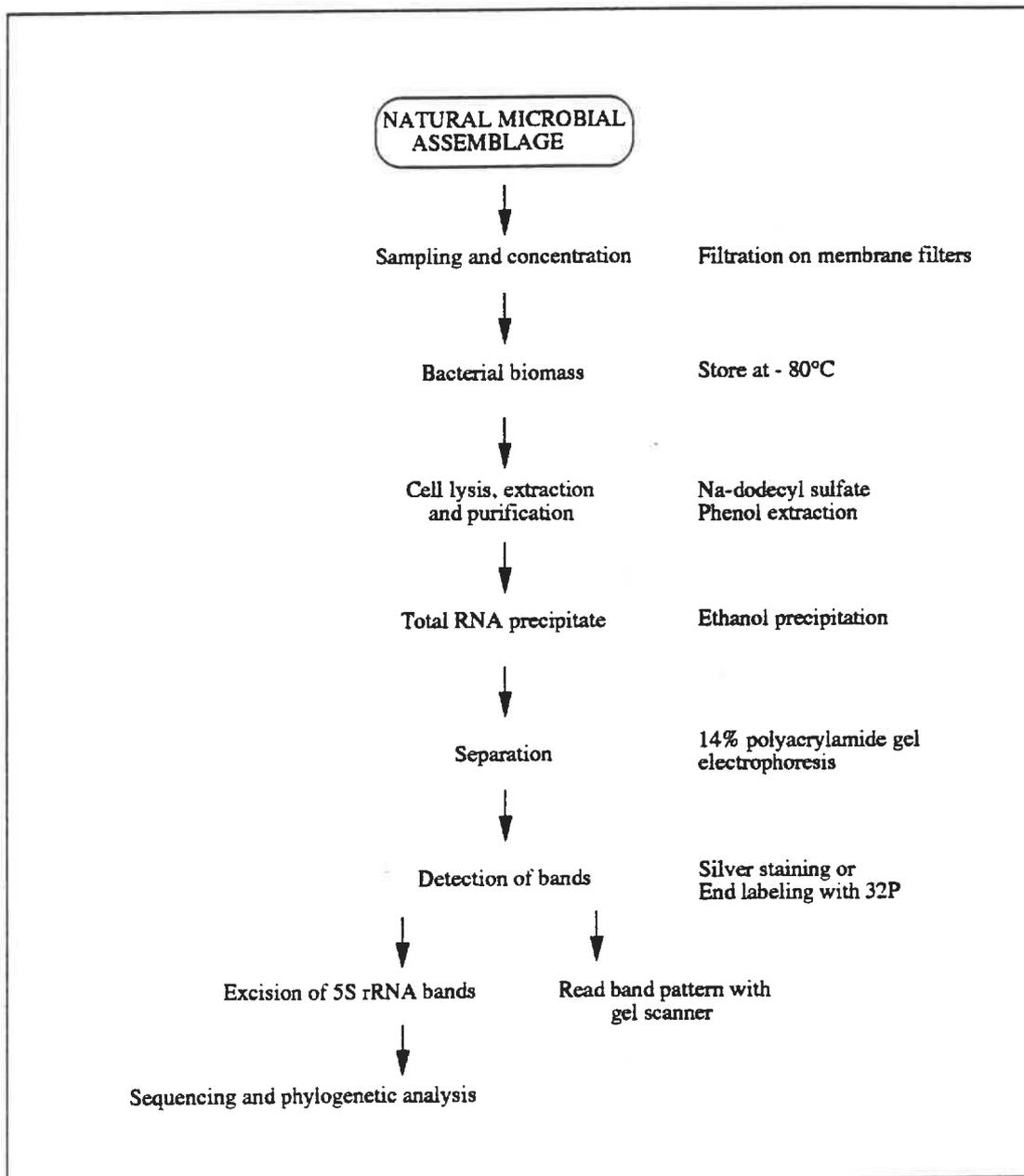
- G.3.2. En segundo lugar se aplicará a sistemas naturales sencillos que permitan constatar su buen funcionamiento en muestras de campo. Uno de los sistemas elegidos para esta fase es la comunidad de la laguna Cisó. Esta comunidad ha sido largamente estudiada por nuestro grupo de trabajo (Pedrós-Alió et al. 1986, Gasol et al. 1990) y estamos, por tanto, en condiciones de manipularla para separar las bacterias fototróficas del resto de organismos. Dado que varios de los cultivos puros utilizados en la fase anterior han sido aislados precisamente de esta comunidad, podremos comparar los patrones de tales aislados con los que aparezcan en la laguna y cubrir parcialmente el objetivo E.2.2. Otro conjunto de comunidades que hemos elegido es el de las sucesivas balsas de concentración y cristalización de la sal marina en unas salinas (seguramente las de la punta de la Banya en el Delta del Ebro). Estas balsas proporcionan un gradiente de salinidad que va desde la salinidad marina hasta la saturación. Es conocido que el número de microorganismos presentes va disminuyendo a medida que aumenta la salinidad (Rodríguez Valera et al. 1985). Por lo tanto, este sistema es idóneo para comprobar el funcionamiento de nuestra técnica. El número de bandas, de acuerdo con la teoría de menor diversidad a mayor estrés ambiental, debería disminuir desde la salinidad marina hasta la saturación. La intensidad de las bandas que quedaran a salinidades más elevadas, en cambio, debería aumentar, reflejando la gran biomasa y bajísima equitabilidad de los ambientes extremos. Este estudio permitiría calibrar semi-cuantitativamente nuestro índice de diversidad microbiana y cubriría partes de los objetivos E.1.1, E.1.2.1, E.1.2.2, y E.1.2.3.
- G.3.3. La siguiente y última fase consistirá en expandir el uso de la técnica a una serie de comunidades de mayor complejidad. Por una parte se analizarán las bacterias fototróficas en una serie de sistemas en los que son abundantes, como la laguna de la Massona o el lago grande de Estanya. Esto cubrirá la parte restante del objetivo E.2.2. Por otra parte, se aplicará la técnica a una serie de ecosistemas marinos de diversidad contrastada. En este caso se analizará la diversidad del fitoplancton mediante técnicas convencionales y se verá si la diversidad del bacterioplancton sigue los mismos patrones. Esto cubrirá los objetivos E.1.1, y E.1.2. Dos de los sistemas que tenemos en mente son los siguientes: a) una comparación entre el máximo profundo de clorofila y la comunidad superficial en el Mediterráneo occidental y b) un gradiente de productividad desde una zona de afloramiento costero hacia alta mar en la zona de la corriente de Benguela.
- G.3.4. Los objetivos restantes se refieren al estudio de los virus (E.1.3 y E.2.3) y a las diferencias fisiológicas entre diferentes especies de bacterias fototróficas (E.2.4). Como ya se ha comentado, la parte del trabajo referente a los patrones de RNA explicada en los apartados G.3.1 a G.3.3 se llevará a cabo por ambos grupos conjuntamente y, por ello, se ha explicado aquí. El estudio de los virus se llevará a cabo en el ICM y el de la fisiología en la UAB. Por ello, el plan de trabajo detallado se discute en los puntos G correspondientes a cada subproyecto.
- G.3.5. Campañas para la obtención de muestras. Con el fin de optimizar la toma de muestras de ecosistemas tan diversos y de hacerlo de la forma más barata posible se han previsto las siguientes medidas:
- a) Todas las técnicas elegidas para ser utilizadas en el campo permiten la fijación de las muestras in situ y su almacenamiento para posterior análisis en el laboratorio cuando resulte más conveniente. Así, por ejemplo, para la producción bacteriana heterotrófica se ha elegido la frecuencia de células en división y no la incorporación de timidina. Esto nos permite independizar las fechas concretas de las campañas del tratamiento de las muestras. Las muestras de ecosistemas más inaccesibles y complejos se guardarán hasta que tengamos total seguridad de que nuestras técnicas funcionan. Al mismo tiempo, esto nos permite tomar las muestras en la época del año más adecuada o cuando sea logísticamente más cómodo, sin necesidad de tener que procesar las muestras inmediatamente después.
 - b) Las muestras de ecosistemas menos accesible se tomarán simultáneamente con campañas de otros proyectos, con el fin de abaratar los costes. Así, los miembros del grupo del ICM participan en el proyecto MAR91-0359 que tiene presupuestadas varias campañas oceanográficas en el Mediterráneo occidental. Confiamos en que la adición de los objetivos del presente proyecto a dichas campañas resulte en un mutualismo entre ambos proyectos. Para las muestras de la corriente de Benguela se ha concertado ya un acuerdo con miembros

del South African Sea Fisheries para que sean tomadas en una de sus campañas de rutina y enviadas por correo a Barcelona para su análisis. En este caso, igualmente, se espera un beneficio mutuo de la colaboración.

- c) Por otra parte, el investigador principal y uno de sus becarios forman parte de dos proyectos presentados al programa MAST-II de la CEE. El primero de ellos se presentó el pasado 15 de noviembre en Bruselas en el apartado Marine Technology. El coordinador del proyecto es el Dr. Peter K. Bjørnsen (Marine Biological Laboratory, Univ. de Copenhagen) y en él se pretende un estudio del análisis de imágenes digital para la estima de la biomasa del plancton marino. En este proyecto se pretende un trabajo de intercalibración entre los grupos participantes, con lo que se tendrá acceso a una serie de muestras procedentes del Báltico y del Mediterráneo. El segundo proyecto se presentará el próximo 15 de febrero en el área del Mediterráneo y el coordinador es el Dr. Victor del Río del Instituto Oceanográfico de Marbella (Málaga). En tal proyecto se pretende realizar precisamente el tipo de estudios sobre la diversidad comentados, en el Mar de Alborán.

Todas estas consideraciones se hacen para clarificar las relaciones y solapamientos entre todos estos proyectos, así como el hecho de que en el presente proyecto no se solicite financiación para las campañas de mar. En la preparación de estos programas, hemos hecho un esfuerzo considerable por obtener la máxima eficiencia en el uso de recursos tan caros como son los necesarios para la oceanografía y creemos que nuestro proyecto tiene una coherencia interna fuera de toda duda que, en nuestra opinión, garantiza el que pueda llevarse a cabo con éxito.

Figura 3



Referencias citadas

- Atlas, R.M. 1983. Diversity of microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.*, 7: 1.
- Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer (eds.) 1991. *The Prokaryotes* 2a edición. 3 volúmenes. Springer-Verlag. Una descripción de todos los grupos bacterianos con explicaciones de sus características y métodos de aislamiento y cultivo.
- Beefink, H.H. & H. Van Gernerden. 1979. Actual and potential rates of substrate oxidation and product formation in continuous cultures of *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 121:161-167
- Bergh, O., K.Y. Børsheim, G. Bratbak, and M. Haldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature (London)* 340:467-468.
- Bratbak, G., M. Haldal, S. Norland, and T. F. Thingstad. 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1400-1405.
- Britschgi, T.B. & S.J. Giovannoni. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1707-1713.
- Brock, T.D. 1978. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer Verlag, NY.
- Børsheim, K.Y., G. Bratbak, and M. Haldal. 1990. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:352-356.
- De Wit, R. (1989) *Interactions between phototrophic bacteria in marine sediments*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen.
- Ehrlich, P.R. & E.O. Wilson. 1991. Biodiversity studies: Science and policy. *Science* 253: 758-762.
- Estrada, M. and J. Salat. 1989. Phytoplankton assemblages of deep and surface water layers in a Mediterranean frontal zone. *Scient. Mar.* 53:203-214.
- Estrada, M., C. Marrasé & M. Alcaraz. 1988. Phytoplankton response to intermittent stirring and nutrient addition in marine microcosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 48: 225-234.
- Gasol, J.M., J. Mas, Pedrós-Alió, C. & R. Guerrero. 1990. *Ecología microbiana en la laguna Cisó: 1976-1989*. *Sci. gerundensis*, 16.
- Gasol, J.M., R. Guerrero, Pedrós-Alió, C. 1991. Seasonal variations in size structure and procaryotic dominance in sulfurous Lake Cisó. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 860-872.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. 1990a. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345: 60-63.
- Giovannoni, S.J., E.F. DeLong, T.M. Schmidt & N.R. Pace. 1990b. Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2572-2575.
- Gorlenko, V.M., Dubinina, G.A. & S.I. Kuznetsov. 1983. *The ecology of aquatic microorganisms*. Schweizeerbar'tsche Verlag

- Guerrero, R., C. Pedrós-Alió, I. Esteve & J. Mas. 1987. Communities of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. In: T. Lindholm (ed.). *Ecology of Photosynthetic Prokaryotes*, pp. 125-151. Åbo Academy Press.
- Hagström, A, Larson, U., Hörstedt, P., & Normark, S. 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 805-812.
- Halvorson, H.O., D. Pramer & M. Rogul (eds.) 1985. *Engineered organisms in the environment: scientific issues*. Amer. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Hara, S., Terauchi, and Koike, I. 1991. Abundance of viruses in marine waters: assesment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2731-2734.
- Heldal, M. and M. Bratbak. 1991. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72:205-212.
- Holt, J.G. (editor general). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. Vol. 1 (1984), vol. 2 (1986), vol. 3 (1989), vol 4. (1989). Se considera la máxima autoridad en taxonomía bacteriana.
- Höfle, M.G. 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Methods*, 8: 235-248.
- Höfle, M.G. 1988. Taxonomic structure of bacterial communities in mixed cultures as measured by low molecular weight RNA profiles. *Arch. Hydrobiol. Beih., Ergebn. Limnol.*, 31: 71-77.
- Höfle, M.G. 1989. Estimation of the taxonomic structure of natural bacterial assemblages by low molecular RNA profiles. *Proceedings ISME 5, Kyoto*.
- Höfle, M.G. 1990. RNA chemotaxonomy of bacterial isolates and natural microbial communities. In *Biochemical and molecular approaches in aquatic microbial ecology*, J. Overbeck & R.J. Chrost (eds.), Science Tech. Pub., Madison, Wisconsin.
- Lee, J.J., S.H. Hunter & E.C. Bovee (eds.). 1985. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Soc. Protozoologists, Kansas. La única referencia unificada para todos los microorganismos eucariontes.
- Magurran, A E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- Margalef, R. 1974. *Ecología*. Ed. Omega S.A., Barcelona.
- Margulis, L., J.O. Corliss, M. Melkonian & D.J. Chapman (eds.). 1989. *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett, Boston. Es el equivalente del libro de Balows et al. para los microorganismos eucariontes.
- Marrasé C., C. Duarte & D. Vaqué. 1989. Succession patterns of phytoplankton blooms. Directionality and influence of algal cell size. *Mar. Biol.*, 102:43-48.
- Mas, J. & H. Van Gernerden. 1991. Phosphate-limited growth of *Chromatium vinosum* in continuous culture. *Arch. Microbiol.*, in press.
- May, R M. 1981. Patterns in multi-species communities. In May, R M (ed.), *Theoretical Ecology. Principles and Applications*. 2nd ed. Sinauer Ass. Inc., Pub., Sunderland, Massachusetts. 197-227.
- May, R M. 1986. The search for patterns in the balance of nature: advances and retreats. *Ecology*, 67: 1115-1126.

- McManus, G B, Fuhrman, J A. 1988. Control of marine bacterioplankton populations: measurement and significance of grazing. *Hydrobiologia*, 159: 51-62.
- Olsen, G J, Lane, D J, Giovannoni, S J, Pace, N R. 1986. Microbial ecology and evolution: a microbial RNA approach.. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40: 337-365.
- Pace, M L. 1988. Bacterial mortality and the fate of bacterial production. *Hydrobiologia*, 159: 41-49.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, 9: 1-55.
- Patrick, R. 1967. The effect of invasion rate, species pool, and size of area on the structure of the diatom community. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58: 1335-1342.
- Patrick, R. 1975. Stream communities. In Cody, M L, Diamond, J M (eds.) *Ecology and Evolution of Communities*. Belknap Press, Harvard University, Cambridge, Mass., 445-459.
- Paul, J. H., S. C. Jiang, and J. B. Rose. 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2197-2204.
- Pedros-Alió, C. 1989. Toward an autoecology of bacterioplankton. En: "Plankton Ecology", Ulrich Sommer(Ed.). Springer-Verlag.
- Pedros-Alió, C. 1990. Hibridación de ácidos nucleicos en ecología microbiana. *SEM89*, 1: 115-116.
- Pedros-Alió, C. 1991. Estructura de las redes tróficas microbianas: ¿cumplen el paradigma formulado a partir de animales y plantas? Resúmenes de ponencias en el VI Congreso Español de Limnología, Granada, septiembre.
- Pedros-Alió, C, J.M. Gasol & R. Guerrero. 1986. Microbial ecology of sulfurous lake Cisó. pp. 638-643, In.: F. Megusar & M. Gantar (Eds). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovenian Soc. Microbiol, Ljubjana, Yugoslavia.
- Pedros-Alió, C, J.I. Calderón, J. García Cantizano, J.M. Gasol, M. Latasa & R. Massana. 1991. Carbon flow through a metalimnetic microbial community. Resúmenes de ponencias en el Vth Internat. Workshop Measurement Microb. Activities Carbo Cycle Aquat Environ., Helsingør, Dinamarca, agosto.
- Porter, K.G. & Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting the aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- Proctor, L M, Fuhrman, J A. 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343: 60-62.
- Proctor, L. M. and J. A. Furhman. 1991. Roles of viral infection in organic particle flux. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 69:133-142.
- Rodríguez-Valera, F., A. Ventosa, G. Juez, J.F. Imhoff. 1985. Variations of environmental features and microbial populations with salt concentration in a multi-pond saltern. *Microb. Ecol.* 11: 107-115.
- Root, R. B. 1967 The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecol. Monogr.* 37: 317-350.
- Sugihara, G. 1980. Minimal community structure: an explanation of species abundance patterns. *Amer. Nat.*, 116: 770-787.
- Sussman, M., C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (eds.). 1988. *The release of genetically-engineered microorganisms*. Academic Press, London.

- Suttle, C. A., A. M. Chan, and M. T. Cottrel. 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature (London)* 387:467-469.
- Suttle, C. A., A. M. Chan, and M. T. Cottrel. 1991. Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:721-726.
- Torrella, F. & R.Y. Morita. 1979. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 774-778.
- Trüper, H.G. & N. Pfennig. 1990. En The Prokaryotes.
- Van Gemerden, H. & H.H. Beftink. 1978. Specific rates of substrate oxidation and product formation in autotrophically growing *Chromatium vinosum* cultures. *Arch. Microbiol.* 119:135-143
- Van Gemerden, H. & H.H. Beftink. 1981. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a sulfide-limited continuous culture. *Arch. Microbiol.* 129:32-34
- Van Gemerden, H. 1974. Coexistence of organisms competing for the same substrate; an example among the purple sulfur bacteria. *Micr. Ecol.* 1:104-119
- Van Gemerden, H. 1987. Competition between purple sulfur bacteria and green sulfur bacteria: Role of sulfide, sulfur and polysulfides. In: T. Lindholm (ed.). *Ecology of Photosynthetic Prokaryotes*, pp. 13-27. Åbo Academy Press.
- Van Gemerden, H., P.T. Visscher & J. Mas. 1990. Environmental control of sulfur deposition in anoxygenic purple and green sulfur bacteria. In: E.A. Dawes (ed.). *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, pp. 247-262. Kluwer Academic Publishers
- Ward, D M, Weller, R, Bateson, M M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345: 63-65.
- Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr & H.G. Trüper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.
- Woese, C R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- Woese, C.R., Kandler, O, Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87: 4576-4579.

	Primer año				Segundo año				Tercer año			
	Inv.	Prima.	Vera.	Otoño	Inv.	Prima.	Vera.	Otoño	Inv.	Prima.	Vera.	Otoño
Compra equipos	←→											
Campañas muestreo												
Bac. fototróficas	<u>C</u>	<u>C,B</u>	<u>C,B</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>C,B</u>	<u>C,B</u>	<u>ME</u>	<u>Cu</u>		
Salinas		—	—				—	—				
Río Ebro				—				—				
Mediterráneo		—					—					
Benguela		—					—					
Otros					←-----→							
Análisis diversidad y virus												
Cultivos puros	←→											
Fototróficas campo			←→									
Salinas				←→								
Sistemas marinos							←→					
Estudios experimentales												
Fisiología fototróficos	←→											
Microcosmos					←→							
Análisis de datos									←→			

C: Cisó; B: Banyoles y Vilar; E: Estanya; M: Massona; Cu: Cuenca

Incluyase: Sujetos de estudio, diseño, variables, recogida y análisis de datos, dificultades y limitaciones del estudio, así como etapas de su desarrollo.

Grupo del Instituto de Ciencias del Mar (ICM). Subproyecto 1.

En el apartado G general para todo el proyecto se comentan los aspectos comunes a ambos subproyectos. Para evitar repeticiones, aquí únicamente se discuten los aspectos relativos a los virus, objetivo que se llevará a cabo en el ICM.

Antecedentes e hipótesis de partida.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los virus son extraordinariamente abundantes en la mayor parte de los medios acuáticos (Bergh et al. 1989, Proctor and Fuhrman 1990). Este descubrimiento plantea varias preguntas de gran trascendencia para la ecología del plancton:

1. ¿Cuál es la variabilidad en la abundancia de este virioplancton en el tiempo y en distintos sistemas?
2. ¿Cuál es su papel trófico en la comunidad planctónica?
3. ¿Qué impacto tiene sobre las poblaciones planctónicas presa?

A pesar de que se han sucedido las publicaciones en este campo (Suttle et al. 1990, 1991, Paul et al. 1991, Børsheim et al. 1990, Bratbak et al. 1990, Proctor and Fuhrman 1991, Heidal and Bratbak 1991, Hara et al. 1991) las tres preguntas formuladas siguen sin respuesta debido a las dificultades metodológicas y a lo reciente del tema. En el presente proyecto se proponen estrategias para dar respuestas, al menos parciales, a las dos primeras preguntas y dar algo de luz sobre la tercera. La aproximación propuesta parte de los conocimientos detallados y extensos sobre las relaciones entre algunos virus y sus células presa (tales como *Escherichia coli* y sus fagos) por una parte y de la ecología de poblaciones y la diversidad ecológica por la otra.

La relación entre los virus bien conocidos y sus presas respectivas es sumamente específica. Pequeñas diferencias en las moléculas superficiales de la célula presa le confieren resistencia frente al ataque. Por ello, distintas cepas de la misma especie pueden ser sensibles a diferentes virus. Por otra parte, el mecanismo mediante el que los virus encuentran sus células presa es por colisión al azar. Los viriones tienen únicamente movimiento Browniano. Cuando, al azar, chocan con una partícula se produce una adsorción puramente física. Si la partícula resulta ser una célula susceptible, se produce el ataque.

Si se realizan los cálculos cinéticos correspondientes se ve que estas dos características hacen que una población de un virus cualquiera no pueda mantenerse en el plancton si las potenciales células presa son muy diversas (muchas especies resistentes y sólo una sensible) y/o si las células son muy poco abundantes (por debajo de 10^5 o 10^6 cels. ml^{-1}). En la Fig. G-1 se ha representado el número de viriones que permanecen en el medio, no adsorbidos a células susceptibles, a lo largo del tiempo si el número de especies presentes fuera de 100, 50, 10, 5, o 1. Si hubiera 100 especies, no se produciría ninguna adsorción en todo un año. Si hubiera 10 especies, se tardaría dos meses en reducir la concentración de viriones libres en un orden de magnitud. Pero las tasas de desaparición de viriones en medios naturales son mucho mayores (entre 0.005 y 0.06 h^{-1}). Por ello, la observada persistencia de los virus en tantos medios planctónicos tiene que ir ligada a una baja diversidad de las presas potenciales, bien temporal (por ejemplo después de un "bloom" de fitoplancton), o bien permanente (por ejemplo en sistemas expuestos a condiciones extremas). Como se ve, la presencia de virus está íntimamente ligada a la diversidad de la comunidad de especies presa. Y, en consecuencia, se propone el plan de trabajo siguiente.

Plan de trabajo con indicación de la metodología a seguir.

Primero. Con el fin de asegurar la puesta a punto de las técnicas, se analizará la concentración de virus en sistemas muy sencillos y bien conocidos en primer lugar para, con posterioridad, expandirlos a ecosistemas más complejos. Esta determinación del número de virus, como puede apreciarse, está íntimamente ligada a las determinaciones de diversidad explicadas en el apartado G conjunto, y se realizarán simultáneamente. La cuantificación del virioplancton se realizará mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía de epifluorescencia (Paul et al. 1991, Børsheim et al. 1990, Heldal and Bratbak 1991). Los sistemas elegidos intentan abarcar ambientes en los que exista gran variedad de los parámetros que nuestra hipótesis considera relevantes: la diversidad y la abundancia de células presa. Algunos de los sistemas serán:

a) Perfil vertical en la laguna de Cisó y en el estuario del río Ebro (con gradientes opuestos de oxígeno y sulfhídrico).

b) Sucesión de cubetas de sedimentación en unas salinas, todavía por determinar (con gradiente de salinidad).

c) Transecto horizontal desde una zona de afloramiento costera (en la zona de la corriente de Benguela) hacia alta mar (gradiente de producción primaria alta a baja).

d) Distintas masas de agua antárticas con distintos grados de productividad. Solamente si se consigue acceso al buque oceanográfico Hespérides en alguna de las campañas del verano austral.

e) Transecto desde una fuente termal hacia su desagüe, ambiente todavía por determinar (gradiente de temperatura alta a normal).

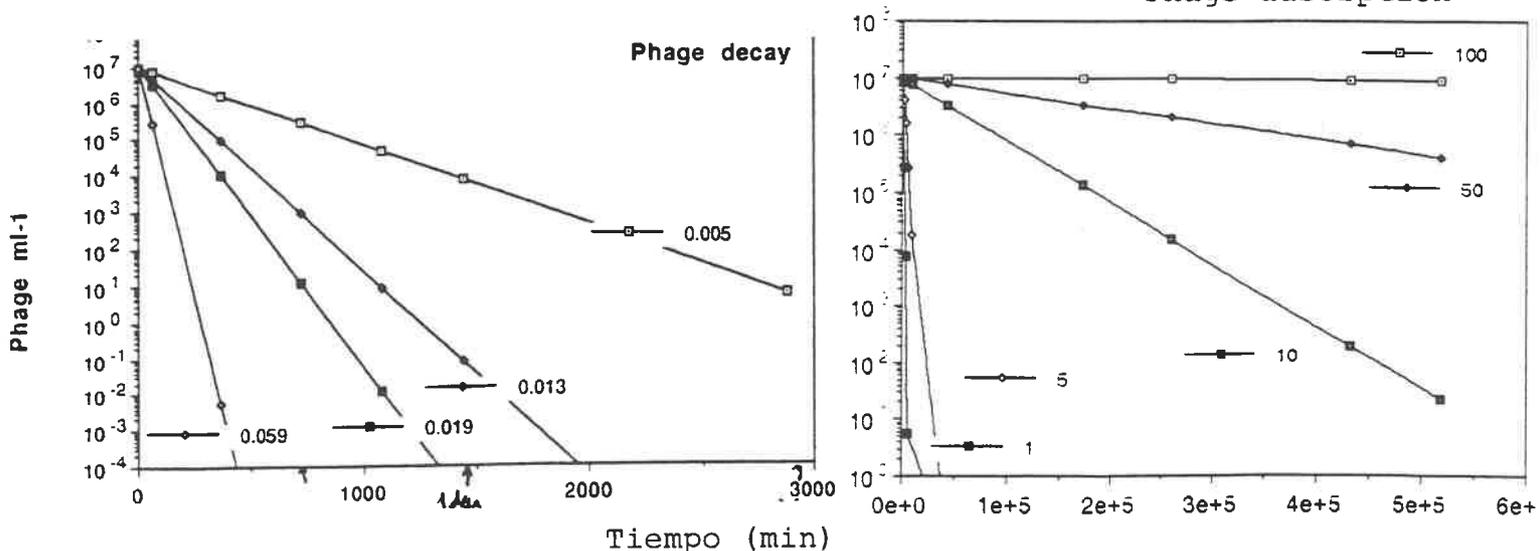
f) Perfil vertical en el Mediterráneo occidental (comparando la zona superficial y la del máximo profundo de clorofila).

Segundo. En este apartado se pretende averiguar la relación entre el estado fisiológico del fitoplancton y su susceptibilidad al ataque por virus. Para ello se realizarán estudios experimentales en microcosmos (Estrada et al. 1988, Marrasé et al. 1989). En estos experimentos se determinará la presencia o ausencia de virus a lo largo del tiempo, tanto en el medio como en el interior de las células incubadas en microcosmos manipulados para producir diferentes tipos de limitación y estado fisiológico en el fitoplancton.

Bibliografía.

La bibliografía citada puede encontrarse al final del apartado G general para todo el proyecto.

FIGURA G-1



HIPOTESIS, METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO. (En proyectos coordinados, un ejemplar de esta hoja para el proyecto principal y una para cada uno de los subproyectos.)

G

Incluyase: Sujetos de estudio, diseño, variables, recogida y análisis de datos, dificultades y limitaciones del estudio, así como etapas de su desarrollo.

Grupo de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Subproyecto 2.

En el apartado G general para todo el proyecto se comentan los aspectos comunes a ambos subproyectos. Para evitar repeticiones, aquí únicamente se discuten los aspectos relativos a las diferencias fisiológicas entre las bacterias fototróficas del azufre, objetivo que se llevará a cabo en la UAB.

Antecedentes e hipótesis de partida.

Las bacterias fototróficas del azufre son microorganismos bastante especializados que obtienen energía a partir de la luz y poder reductor para su biosíntesis a partir de compuestos reducidos del azufre, como sulfhídrico (H_2S) o tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$). Debido a que estos compuestos son esenciales para permitir el crecimiento, estos organismos se encuentran habitualmente asociadas a ambientes anóxicos (Gorlenko et al. 1983, Guerrero et al. 1987), como fuentes sulfurosas, superficie de sedimentos anaeróbicos, partes profundas de lagos estratificados o algunas cubetas oceánicas de circulación restringida en las que los compuestos arriba mencionados se encuentran de forma relativamente abundante. En general, se suelen encontrar tres o cuatro especies de estas bacterias coexistiendo en abundancias extraordinarias, con lo que el agua se tiñe de rosa, verde o marrón según los carotenoides dominantes. Así pues, existe coexistencia de especies de un mismo gremio. De acuerdo con la teoría ecológica (Root 1967), esto solamente es posible si las especies presentes se diferencian en sus capacidades fisiológicas.

La información de que se dispone sobre la fisiología de las bacterias fototróficas del azufre es bastante extensa. Se ha estudiado el efecto de diversos factores ambientales como la temperatura, el pH y, de forma más extensa, la limitación por el donador de electrones (Van Gernerden y Beeftink 1978, Beeftink y Van Gernerden 1979) o por nutrientes tales como el fosfato (Mas y Van Gernerden 1991). Debido a problemas metodológicos, el efecto de la intensidad de luz sobre su crecimiento ha sido muy poco estudiado aunque, por el contrario, se ha hecho énfasis en el efecto de los ciclos luz/oscuridad (De Wit 1989). En cualquier caso, la práctica totalidad de los trabajos arriba mencionados se han realizado sin garantías de que los cultivos utilizados fueran representativos de los organismos verdaderamente predominantes en la naturaleza, con lo que la extrapolación de los resultados a las poblaciones naturales se hace extremadamente difícil. Estudios de enfoque más ecológico como los realizados por Van Gernerden (1974, 1987) y Van Gernerden y Beeftink (1981) tratando de explicar la coexistencia de diferentes bacterias fototróficas del azufre, a pesar de resultar iluminadores en muchos aspectos, participan también de los inconvenientes que se acaban de mencionar.

En la parte del proyecto específica del grupo de la UAB se propone estudiar, tomando como modelo las bacterias fototróficas del azufre, los factores fisiológicos que determinan tanto la diversidad dentro de este gremio, como la composición de especies, puesta en evidencia a través del estudio de los RNA de bajo peso molecular. Teniendo en cuenta la información disponible hasta el momento, se ha considerado relevante el estudio de los mecanismos fisiológicos de adaptación a dos tipos de condiciones adversas: Intensidades de luz limitantes, y condiciones fluctuantes (luz/oscuridad, aerobiosis/anaerobiosis, abundancia/limitación de nutrientes)

Metodología y plan de trabajo

El trabajo experimental correspondiente se llevará a cabo en el laboratorio en condiciones estrictamente controladas y requerirá dos enfoques experimentales distintos.

Para estudiar la adaptación a condiciones limitantes de iluminación se llevarán a cabo experimentos con diferentes aislados naturales representativos de las poblaciones predominantes. Los aislados se harán crecer en cultivos continuos y serán sometidos a diferentes grados de limitación por la luz. Para cada una de las intensidades de luz utilizadas, y una vez el cultivo se encuentre en equilibrio, se

analizará su contenido específico de pigmentos y de inclusiones de reserva, se cuantificarán sus tasas metabólicas y se determinarán al mismo tiempo sus valores de I_k y P_{max} .

El efecto de las fluctuaciones ambientales y la capacidad de adaptación de los microorganismos a las mismas puede estudiarse en el laboratorio en sistemas modelo basados en quimiostatos que permitan alterar de forma cíclica cada uno de los factores antes mencionados (luz, oxígeno, nutrientes). Este enfoque rinde resultados satisfactorios, aunque el coste en términos de tiempo y material hace prohibitiva su aplicación al total de organismos aislados de muestras naturales. Por ello, se aplicará en un número reducido de casos que se utilizarán como modelo. De forma más extensiva, se determinará la capacidad máxima de acumulación de inclusiones de reserva, concretamente de azufre, PHB y glucógeno. Este parámetro puede considerarse como un índice de la capacidad del organismo para enfrentarse con éxito a variaciones en la disponibilidad de nutrientes y energía (Van Gemerden et al. 1990).

Se espera que del conjunto de resultados obtenidos emerja un perfil metabólico característico del tipo de microorganismos predominantes en las comunidades naturales de bacterias fototróficas del azufre.

Referencias

Las referencias citadas en este apartado pueden encontrarse en la bibliografía al final del apartado G conjunto.