



Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Grau de Biologia

Efecte de la deposició atmosfèrica sobre els microorganismes del Mar Mediterrani.

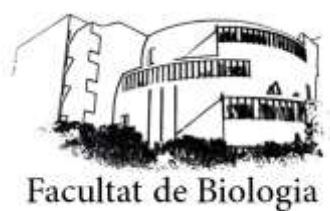
Tutora externa: Montse Sala Farré

Tutor intern: Jordi Urmeneta

Alumna: Patrícia Armero Jurado

Treball Final de Grau

Curs 2017 - 2018



ABSTRACT

Atmospheric depositions represent an important source of dissolved nutrients to the offshore global ocean and can increase primary and bacterial productivity and thus carbon uptake and bacterial biomass.

The Mediterranean Sea is an ideal marine environment for studying the role of aerosols and associated microbes on surface ocean microorganisms for multiple reasons. First, the Mediterranean Sea is subjected to relatively high aerosol deposition throughout the year. Secondly, it is an oligotrophic environment with low inorganic nutrients and low autotrophic and heterotrophic activity. Thus, any external input of micro/macronutrients, along with aerosols-associated microbiota, can have a substantial effect upon interaction with the ambient microbial populations.

Although the effect of dust deposition has been extensively studied in the NW Mediterranean, the effect of anthropogenic aerosols is still quite unknown. For this reason, we carried out an experiment to study the effect of anthropogenic-derived particles, which we will refer as anthropogenic aerosols and have a mainly European origin, in the NW Mediterranean. Anthropogenic aerosols in the Barcelona area can be a major source of nitrogen and phosphorous to the atmosphere and are much richer than Saharan particles in organic carbon. On the other hand, anthropogenic aerosols tend to contain high amounts of copper, lead and other trace metals, which are known to be toxic to microbiota at high concentrations. Thus, one way or another, an effect of anthropogenic aerosols on marine microbiological communities' abundance is expected.

In this study we want to analyse the changes that occurred in the abundance and extracellular enzyme activities of marine microbes (bacteria and fungi) with the deposition of atmospheric particles in seawater. The study of extracellular enzyme activities will be an indication of the carbon sources used by bacteria in the deposition. Also, this experiment aims to study whether or not the aerosol associated microbes survive when they get to the marine ecosystem.

1. INTRODUCCIÓ	3
2. OBJECTIUS	5
3. MATERIALS I MÈTODES	
3.1 Disseny experimental	6
3.2 Preparació de l'inòcul de partícules atmosfèriques	7
3.3 DAPI i <i>calcofluor-white</i>	8
3.4 Tinció amb DAPI pel recompte de bacteris	9
3.5 Tinció amb <i>calcofluor-white</i> pel recompte de fongs	10
3.6 Recomptes de bacteris i càlcul de la seva concentració	10
3.7 Recomptes de fongs i càlcul de la seva concentració	11
3.8 Determinació de les activitats d'enzims extracel·lulars	11
4. RESULTATS	
4.1 Composició de l'inòcul.....	12
4.2 Abundància bacteriana	13
4.3 Abundància fúngica	16
4.4 Activitats d'enzims extracel·lulars	17
5. DISCUSSIÓ	
5.1 Estimulació bacteriana per la deposició atmosfèrica	20
5.2 Supervivència de fongs a l'aigua de mar	22
5.3 Estimulació de les activitats enzimàtiques bacterianes per la deposició	23
6. ASPECTES A MILLORAR	23
7. CONCLUSIONS	24
8. AGRAÏMENTS	24
9. BIBLIOGRAFIA	25
10. ANNEX	
10.1 Figures	29
10.2 Gràfics	30
10.3 Imatges de microscòpia d'epifluorescència	32

1. INTRODUCCIÓ

Els aerosols, incloent-hi la pols mineral, són transportats regularment per l'aire i, quan cauen, poden ser una font de nutrients i metalls traça per a la superfície marina (Prospero *et al.*, 2005).

Aquestes deposicions atmosfèriques també poden contenir una àmplia gamma de microorganismes (Griffin, 2007; Polymenakou, 2012), que poden ser transportats milers de kilòmetres des del seu lloc d'origen en pocs dies (Prospero *et al.*, 2005; Kellog and Griffin, 2006). Aquests microbis associats a l'aerosol poden ser bacteris heterotròfics (e.g., Seifried *et al.*, 2015), fongs (e.g., Dannemiller *et al.*, 2014), cianobacteris i altres algues autotròfiques (e.g., Marshall and Chalmers, 1997), així com virus (e.g. Chow and Suttle, 2015).

Al mar Mediterrani, al ser aquest un ambient oligotròfic amb pocs nutrients inorgànics (Krom *et al.*, 1991) i poca activitat autotròfica i heterotròfica (Raveh *et al.*, 2015), qualsevol entrada externa de micro o macronutrients, juntament amb la microbiota associada als aerosols, pot tenir un efecte substancial a l'interactuar amb les poblacions microbianes ambientals (Rahav *et al.*, 2016). A més, el mar Mediterrani rep una deposició d'aerosols relativament alta durant l'any (Guerzoni *et al.*, 1999; Ganor *et al.*, 2010), per això es considera un ambient ideal per estudiar el paper que tenen les deposicions atmosfèriques sobre les seves comunitats microbianes de la superfície.

Les deposicions que rep el Mediterrani poden classificar-se majoritàriament en dos tipus: *Saharan Dust* (pols provinent del Sàhara) i aerosols antropogènics. La composició química de la pols sahariana a l'atmosfera mediterrània ha estat àmpliament caracteritzada, essent-ne els silicats i els aluminosilicats els principals components (Guieu *et al.*, 2002). En comparació, les partícules antropogèniques o dels aerosols antropogènics són més riques en N, sulfats, compostos orgànics i metalls traça (Guerzoni *et al.*, 1999).

Nenes *et al.* (2011) va trobar que els processos àcids que tenen lloc a l'atmosfera augmenten la quantitat de P soluble, i tot i que alguns gasos àcids poden formar-se de manera natural a l'atmosfera, la majoria són resultat d'activitats antropogèniques (Krom *et al.*, 2016). Per aquesta raó els aerosols antropogènics aporten més P assimilable pels microorganismes i això és d'especial importància perquè experiments previs han demostrat que el fòsfor és el nutrient més probable de ser limitant pel bacterioplàncton heteròtrof a la capa superficial de l'aigua de mar (Sala *et al.*, 2002).

Igual que el P, gran part dels metalls traça de la pols atmosfèrica estan inicialment en forma de minerals insolubles i és probable que els processos àcids a l'atmosfera també augmentin la seva quantitat dissolta a l'aerosol (Krom *et al.*, 2011).

En general, la deposició atmosfèrica proporciona una varietat de nutrients i oligoelements metàl·lics que es requereixen pel metabolisme cel·lular microbià, l'activitat enzimàtica i el creixement (e.g., Cvetkovic *et al.*, 2010; Huertas *et al.*, 2014). Degut a la naturalesa oligotròfica del mar Mediterrani, qualsevol aportació podria alterar la dinàmica microbiana a través de l'alliberament de nutrients escassos i limitants (Rahav *et al.*, 2016). Per exemple, diversos autors van demostrar que el nitrogen inorgànic (N) i el fòsfor (P) poden millorar la biomassa i les taxes de creixement de les algues (e.g. Kress *et al.*, 2005), mentre que el P (Thingstad *et al.*, 2005) o el carboni orgànic dissolt (Rahav *et al.*, 2016) també poden estimular l'activitat bacteriana heteròtrofa.

A més a més, alguns dels metalls traça afegits per la deposició, com el Fe o el Zn, són cofactors clau en moltes reaccions enzimàtiques en el medi marí, incloent-hi la fotosíntesi i la fixació de N₂ (Falkowski, 1997; Sohm *et al.*, 2011), i poden contribuir a augmentar la producció bacteriana (Rahav *et al.*, 2016). Això sempre i quan les concentracions d'aquests oligoelements metàl·lics estiguin per sota del llindar de toxicitat pel fitoplàncton i pels bacteris heteròtrofs.

Com ja hem comentat, però, a més a més de nutrients la deposició atmosfèrica pot proporcionar microorganismes a la superfície oceànica. Alguns d'aquests microbis poden romandre viables i fixar carboni (C) i nitrogen (N₂) després de la seva deposició a l'aigua marina (Rahav *et al.*, 2016). Milions de bacteris són intercanviats a diari entre l'atmosfera i la capa superficial de l'oceà (Mayol *et al.*, 2014) i, tot i que diferents estudis realitzats en aigua dolça (Reche *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2014) i de mar (Rahav *et al.*, 2016) suggereixen que els microorganismes aerotransportats poden seguir sent viables després de la deposició i tenir un paper important en el sistema receptor (Rahav *et al.*, 2016), no està clara la seva importància ecològica (Hervas *et al.*, 2009).

Diferents estudis han examinat l'efecte dels aerosols sobre la biomassa i abundància microbiana, mitjançant experiments de microcosmos o mesocosmos que simulaven l'addició atmosfèrica de nutrients (Pulido-Villena *et al.*, 2008; Krom *et al.*, 2016; Marín *et al.*, 2017). En general, els impactes que varen observar després de l'addició de pols o d'aerosols són diversos i no tots poden ser explicats per la inducció d'una "resposta de fertilització" (Guieu *et al.*, 2014). Les raons d'això són: 1) Hi ha variabilitat en la composició dels aerosols i canvis en la hidrografia de l'oceà i en l'estructura de l'ecosistema en el moment de la deposició (Paytan *et al.*, 2009). I 2) Els microbis aerotransportats tenen un impacte a l'oceà. Aquests microorganismes, si són viables, poden interactuar amb les poblacions microbianes pròpies de l'aigua marina (Rahav, *et al.*, 2016).

És possible que, sota algunes circumstàncies, els microbis aerotransportats puguin afectar negativament determinats grups microbians de l'aigua de mar (competició, efectes al·lelopàtics, lisi cel·lular, etc.), donant lloc a una disminució en les taxes

d'abundància i producció bacterianes (Rahav *et al.*, 2016). A més, també és possible una resposta positiva: els microbis aerotransportats poden afectar positivament determinades poblacions ambientals servint com a aliment únic, alleujant l'estrès de dèficit de N a través de la fixació de N₂, etc. (Rahav *et al.*, 2016).

La resposta de les comunitats marines a les deposicions atmosfèriques, tant de nutrients com de microorganismes, no està doncs clara i es necessiten més estudis que contribueixin a millorar el coneixement del tema. El projecte realitzat per l'ICM, ANIMA (dins el qual es troba l'experiment Apollo 2), es situa en el context del Mediterrani nord-occidental. I amb l'objectiu de veure l'efecte de les deposicions atmosfèriques sobre els microorganismes del mar Mediterrani es va dissenyar l'experiment Apollo 2, de disseny similar al d'Apollo 1, però enlloc de veure l'efecte en comunitats marines costaneres l'objectiu era veure l'efecte en comunitats microbianes de mar obert.



Figura 1 | *Tempestes de pols al Mediterrani. Les deposicions que rep el Mediterrani poden ser de tipus Saharan Dust o d'aerosols més antropogènics. Imatge de Goddard Space Flight Center/NASA. <http://anima.icm.csic.es/gallery/>*

2. OBJECTIUS

- El principal objectiu d'Apollo 2 és estudiar com afecta la deposició atmosfèrica sobre les comunitats microbianes marines, a nivell d'abundància, d'activitat i de composició taxonòmica. La meua contribució al projecte va consistir en estudiar els efectes que la deposició atmosfèrica té sobre l'abundància dels microorganismes i no sobre la seva composició taxonòmica.
- Estudiar la supervivència dels microorganismes aeris (bacteris i fongs) a l'aigua de mar.
- Determinar com afecta la deposició atmosfèrica en els substrats i nutrients preferentment consumits pels bacteris, i esbrinar quins tipus de fonts de carboni aporta la deposició atmosfèrica.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Disseny experimental

El plantejament experimental d'Apollo 2 va consistir en recollir aigua de mar obert per veure els efectes de la deposició atmosfèrica en els microorganismes marins (fongs i bacteris). Els tractaments de l'experiment van ser l'addició o no de deposicions atmosfèriques i la filtració prèvia de l'aigua marina per un filtre de 0.2µm de diàmetre de por. D'aquesta manera estudiàriem 4 variants: aigua de mar normal, aigua de mar amb deposicions atmosfèriques i aigua de mar prèviament filtrada, també amb i sense deposicions atmosfèriques.

L'experiment es va iniciar al temps 0 (T0) i a partir d'aquest es va allargar 4 dies més fins al temps final (T4). A cada un dels dies es van realitzar mostres de cada tractament per al seu estudi microbiològic. Finalment també es va recollir una part de l'inòcul, que és el conjunt de partícules atmosfèriques recollides per a afegir com a deposicions a les mostres que els pertoca, per estudiar-ne la seva composició microbiològica.

L'experiment Apollo 2 es va realitzar del 2 al 6 d'octubre de 2017. L'aigua amb la qual es va realitzar l'experiment va ser recol·lectada el 29 de setembre de 2017 a bord del vaixell *Garcia del Cid*, a 5 m de fondària i a l'estació D (41°130N, 2°490E), situada a mig camí entre Barcelona i Mallorca.

L'aigua va ser filtrada per una malla de *Nylon* de 150 µm de filtre per eliminar-ne el macro zooplàncton i es va conservar a 10°C durant un cap de setmana.

El dilluns 2 d'octubre es va iniciar l'experiment i es van afegir 7L d'aigua als següents contenidors de 7L: SW.1, SW.2, SWD.1, SWD.2, 0.2SW.1, 0.2.SW2, 0.2SWD1, 0.2SWD2.

L'aigua de mar que es va afegir per als tractaments 0.2SW i 0.2SWD havia estat filtrada prèviament per un filtre de 0.2µm de diàmetre de por. Aquesta filtració es va realitzar amb la finalitat d'obtenir aigua lliure de microorganismes i poder observar exclusivament la dinàmica dels microorganismes aerotransportats en contacte amb l'aigua marina i els seus nutrients dissolts, sense la interacció amb els bacteris marins.

L'aigua de mar que només havia estat filtrada per la malla de *Nylon* de 150 µm es va utilitzar pels tractaments SW i SWD.

La primera recollida de mostres (T0) dels 8 contenidors de 7L es va realitzar a les 14:00h del dilluns 2 d'octubre. Les mostres que corresponen a aquest primer dia no tenen rèpliques perquè són iguals pels parells SW-SWD i 0.2.SW-0.2SWD perquè es van agafar abans d'afegir la deposició atmosfèrica als tractaments que els pertocava, tal com s'observa a l'esquema explicatiu de l'annex (**Material adicional: Gràfic 1**).

Un cop realitzat el primer mostreig, es va afegir l'inòcul de deposicions (D) atmosfèriques als contenidors dels tractaments SWD i 0.2SWD. Per tant, tant les mostres 0.2 com les d'aigua de mar no filtrada pel filtre de 0.2 µm de por presenten dues variants:

- Les mostres SW són *Sea Water* (aigua de mar) i no se'ls hi ha afegit deposicions dels aerosols aeris.
- Les mostres SWD són *Sea Water + Depositions* (aigua de mar amb deposició atmosfèrica) i sí que se'ls hi ha afegit deposició recollida de l'aire.

Els 8 contenidors de 7L de volum es van incubar a la cambra S15 a una temperatura de 24.5°C i en un cicle de llum:fosc de 12h:12h. Al 3 d'octubre es va realitzar el segon mostreig (T1) a les 9:30 del matí i així successivament cada dia es van fer els mostrejos corresponents a les 9:30h fins al temps final (T4). Tot el material utilitzat en els mostreigs i els anàlisis va ser netejat abans amb HCl al 10%, aigua Milli-Q i va ser esbandit amb aigua de la mostra.

3.2 Preparació de l'inòcul de partícules atmosfèriques

El dia 22 de setembre de 2017 a les 10:30h es van col·locar 8 contenidors al terrat de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona (41°23'08", 2°11'45.4"E, aproximadament 12m AGL³) per recollir de forma passiva les partícules atmosfèriques. Els contenidors són de polietilè, cilíndrics i de 0.066m² de superfície, i es van col·locar a una altura de 2.5m per no agafar la pols resuspensa al sòl.

El dia 2 d'octubre de 2017 a les 10:25h, al cap de 10 dies, es van recollir els 8 contenidors i se'ls va afegir 500mL d'aigua Milli-Q a cada un per resuspendre l'aerosol del seu interior. El volum total d'inòcul obtingut pel total dels 8 contenidors, de 5.88L, es va passar per una malla de 200 µm per treure-li les partícules més grosses i es va guardar en un bidó de polietilè de 10L de capacitat.

També el dia 2 d'octubre, després del primer mostreig (T0) de les 14:00h es van afegir 0.076L de l'inòcul als contenidors dels tractaments que contenien deposicions (D) atmosfèriques: SWD i 0.2SWD. L'inòcul restant es va utilitzar pel seu estudi microbiològic.

³ Above Ground Level



Figura 2 | Recollida de partícules atmosfèriques al terrat de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona. Imatge de <http://anima.icm.csic.es/gallery/>.

3.3 DAPI i *calcofluor-white*

Per a poder observar i comptar els bacteris i fongs de les mostres, aquestes es van fixar i tenyir amb *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) i *calcofluor-white*, respectivament. L'objectiu del comptatge és determinar la concentració microbiològica (bacteriana i fúngica) a les mostres dels diferents tractaments (SW, SWD, 0.2SW, 0.2SWD) i dies, amb l'objectiu de poder assolir un dels objectius principals del projecte Apollo 2: estudiar com afecta la deposició atmosfèrica en les comunitats microbianes marines, a nivell d'abundància en aquest cas.

Les mostres destinades a l'observació i determinació de la seva concentració bacteriana van ser fixades, filtrades i tenyides amb DAPI. Mentre que per les mostres que serviren per a l'estudi de l'abundància de fongs es va seguir el mateix procediment però amb *calcofluor-white*.

El 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) és un marcador nuclear fluorescent que s'uneix fortament a les regions de DNA amb nombroses repeticions d'adenina i timina. És semi-permeable, per la qual cosa pot travessar la membrana plasmàtica dels bacteris. El complex DAPI-DNA té una excitació de longitud d'ona màxima de 358 nm (llum UV) i una emissió de longitud d'ona màxima de 461 nm (llum blava).

El *calcofluor-white* és una substància que té afinitat per la cel·lulosa i la quitina. Tant la cel·lulosa com la quitina són polisacàrids estructurals que formen part de la paret cel·lular dels fongs. El *calcofluor-white* quan absorbeix una radiació electromagnètica de longitud d'ona de 347nm (llum UV) emet fluorescència amb una longitud d'ona de 450nm (llum blava).

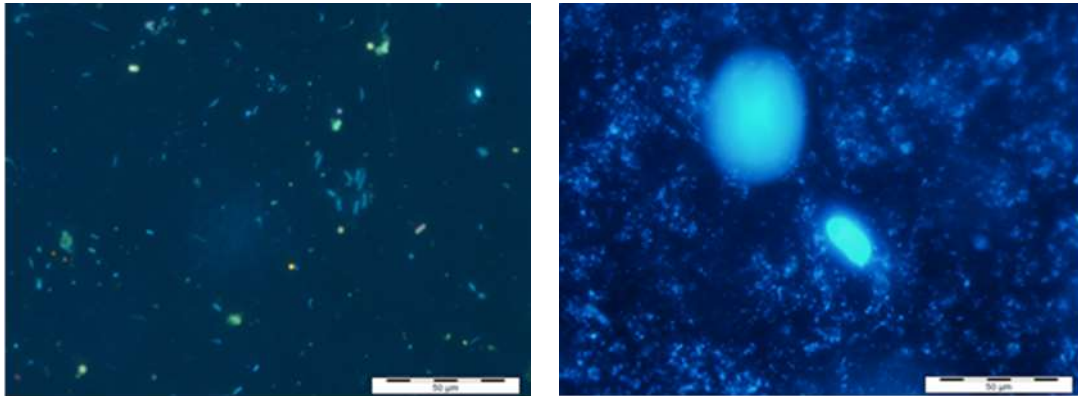


Figura 3 | Imatges de microorganismes, **(A)** bacteris i **(B)** fongs, observats per microscòpia d'epifluorescència.

3.4 Tinció amb DAPI pel recompte de bacteris

Es va realitzar la tinció amb DAPI de les mostres amb el protocol de Porter and Feig (1980) amb algunes variacions descrites a Bellés-Garulera *et al.* (2016).

Les mostres van ser fixades, filtrades i tenyides amb DAPI i, finalment, es van muntar en un portaobjectes i cobreobjectes.

Breument, pels bacteris es van utilitzar 5 mL de mostra que es van fixar al 10% amb glutaraldehid salí al 37%, el qual simula la mateixa salinitat que l'aigua de mar. Es van introduir en un filtrador automàtic (**Material addicional: Figura A Annex**) i es van tenyir a les fosques amb 50 µL de DAPI de concentració 0.5 mg · mL⁻¹. Al cap de 5 minuts es van deixar filtrar les mostres pels filtres de policarbonat negres (Sala *et al.*, 2002) de 0.2 µm de diàmetre de por del filtrador automàtic.

Per últim, les mostres es van muntar en un portaobjectes i un cobreobjectes, posant-hi una gota d'immersió a ambdós, i es van mantenir en condicions de foscor i de temperatura -20°C.

3.5 Tinció amb *calcofluor-white* pel recompte de fongs

Per les mostres de fongs el procediment va ser gairebé el mateix, amb unes poques modificacions: es van agafar 45 mL de mostra que es van fixar al 10% amb formaldehid al 37%. Es van filtrar per filtres de policarbonat negres de 0.8 µm de diàmetre de por i es van tenyir amb 1 mL de *calcofluor-white* de concentració 1 mg · mL⁻¹. La tinció es va deixar actuar 10 minuts i es va filtrar el que quedava de mostra pels filtres.

Abans d'utilitzar el calcofluor cal filtrar-lo amb l'ajuda d'una xeringa i un filtre de 0.2 µm per evitar que s'hi formin cristalls que es veurien pel microscopi. Un cop realitzat el muntatge de les mostres, es mantenen a -20°C fins la seva observació.

3.6 Recompte de bacteris i càlcul de la seva concentració

Els bacteris dels filtres van ser comptats amb el microscopi d'epifluorescència OLYMPUS BX40 (**Material addicional: Figura B**) a 1000 augments, i amb el filtre de llum làser UV del microscopi. Pels recompte de fongs la metodologia va ser la mateixa.

Pel recompte es va utilitzar la quadrícula del microscopi que té unes dimensions de 100 x 100 µm i està formada per 10 x 10 quadrats de 10 µm de costat cadascun. Es van comptar tots els bacteris que quedaven dins d'una mateixa columna, fins a un total de 26 camps. Finalment, es va calcular la concentració de bacteris a cada mostra mitjançant la següent fórmula:

Concentració bacteris/ml

$$= \frac{\text{mitjana recomptes} \cdot f. \text{microscopi} \cdot f. \text{fixació} \cdot f. \text{quadrícula}}{\text{Volum filtrat (ml)}}$$

- $\text{Mitjana recomptes} = \frac{\sum \text{recompte } 1 + \text{recompte } 2 + \dots + \text{recompte } n}{n}$
- El factor del microscopi és 34.636.
- El factor de fixació és 1,1.
- $\text{Factor quadrícula} = \frac{\text{Quadratets que formen la quadrícula (100)}}{\text{Quadrats comptats}}$
- El factor quadrícula ha estat 10 perquè es va comptar una columna.
- El volum filtrat és 5 mL per les mostres DAPI.

3.7 Recompte de fongs i càlcul de la seva concentració

Pel recompte de fongs es van realitzar aproximadament 5 transsectes d'1 cm de llarg per a cada mostra. En les mostres menys abundants van realitzar-se un parell de transsectes més fins arribar a un total d'aproximadament 200 fongs per mostra. Els transsectes es van realitzar a diferents zones de la mostra per tenir una representació més global d'aquesta i els recomptes es van dur a terme amb l'ajuda d'un comptador automàtic (**Material addicional: Figura C**). Finalment, es va calcular la concentració de fongs a cada mostra mitjançant la següent fórmula:

Concentració fongs/ml

$$= \frac{\text{mitjana transsectes} \cdot \text{factor fixació} \cdot \text{àrea filtrada}}{\text{volum filtrat}} \cdot \text{àrea comptada}$$

- $\text{Mitjana transsectes} = \frac{\sum \text{transsecte } 1 + \text{transsecte } 2 + \dots + \text{transsecte } n}{n}$
- L'àrea filtrada és 346 mm² i l'àrea comptada és 1 mm², per la qual cosa queda un factor de 346.
- El factor de fixació també és 1.1.
- El volum filtrat són 45 mL per les mostres de *calcofluor-white*.

3.8 Determinació de les activitats d'enzims extracel·lulars

Un altre dels objectius d'aquest experiment és determinar quins substrats i nutrients consumeixen preferentment els bacteris als diferents tractaments de les mostres (SW, SWD, 0.2SW, 0.2SWD) i veure quins tipus de fonts de carboni aporta la deposició atmosfèrica, veient l'estimulació de l'activitat d'un enzim o altre.

El mètode per mesurar l'activitat enzimàtica es basa en substrats fluorogènics (Hoppe *et al.* 1983; Sala *et al.* 2010). Els substrats específics per a cada enzim, quan els bacteris hidrolitzen la molècula, aquesta allibera una molècula fluorescent, i això permet relacionar la fluorescència amb el consum o degradació de substrat. Per mesurar la fluorescència es va utilitzar el fluorímetre *Modulus Microplate Multimode Reader* (**Material addicional: Figura D**) i la placa negra *Black Cliniplate, Thermo Scientific* (**Material addicional: Figura E**) que pot ser llegida pel fluorímetre. Les mostres es van mantenir a les fosques, tapades amb bosses negres, per mesurar només les reaccions heterotròfiques i no les fotosintètiques. A les mostres s'hi van afegir els 12 substrats següents per mesurar l'activitat de 12 enzims extracel·lulars diferents:

4-MUF-arabinopyranoside (Arabinosidasa, ARA), 4-MUF-7-B-Xyloside (Xilosidasa, XYL), 4-MUF- N-acetyl- β -D-glucosaminide (Quitinasa, CHIT), 4-MUF- α -D-Glucoside (α -Gl – glucosidasa, α -Gl), 4-MUF- β -D-Glucoside (β -Gl-glucosidasa, β -Gl), 4-MUF- β -D-Fucoside (Fucosidasa, FUCO), 4-MUF-Phosphate (Fosfatasa alcalina, APA), L-Leucine-7-amido-4-methylcoumari (Leu-aminopeptidasa, AMA), 4-MUF-Butyrate (Esterasa, EST), 4-MUF- β -D-Cellobiose (Cellobiosidasa, CELL), 4-MUF- β -D-Galactopyranoside (Galactosidasa, GAL), 4-MUF-N-acetyl- β -D-galactosaminide (N-acetil-galactosaminidasa, NaGAL).

Les dades de fluorescència es van transformar a dades d'activitat enzimàtica mitjançant una recta patró feta amb el producte final de les reaccions: 7-amino-4-methylcoumarin per aminopeptidasa i 4-methylumbelliferone per la resta d'enzims.

4. RESULTATS

4.1 Composició de l'inòcul

Es va analitzar la composició i abundància microbiològica de l'inòcul de deposició atmosfèrica utilitzat pels tractaments SWD i 0.2SWD.

Els resultats obtinguts van ser els següents:

- $3,78 \cdot 10^4$ bacteris \cdot mL⁻¹
- $4,01 \cdot 10^3$ fongs \cdot mL⁻¹

La concentració total de microorganismes que es van analitzar (fongs i bacteris) de l'inòcul és de $4,18 \cdot 10^4$ microorganismes \cdot mL⁻¹, sent un 90,4% d'aquests bacteris i un 9,6% fongs, com es mostra a la Figura 4 a continuació:

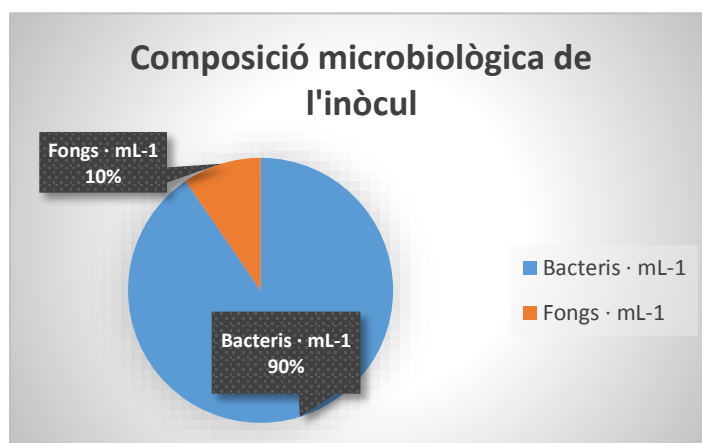


Figura 4 | Percentatge de bacteris i fongs presents a l'inòcul mitjançant el recompte d'una mostra tenyida amb DAPI i d'una tenyida amb calcofluor, de 5 mL i 45 mL respectivament.

Per tant, podem dir que l'inòcul d'Apollo 2 aporta una concentració major de bacteris que de fongs a les mostres, en una proporció d'aproximadament un ordre de magnitud.

4.2 Abundància bacteriana

Les dades es van obtenir amb les concentracions de la única rèplica de les mostres T0 i amb la mitjana de les dues rèpliques dels altres dies (T1, T2, T3 i T4). Es van observar camps similars en el parell de rèpliques dels mateixos tractaments (**Figura 5**).

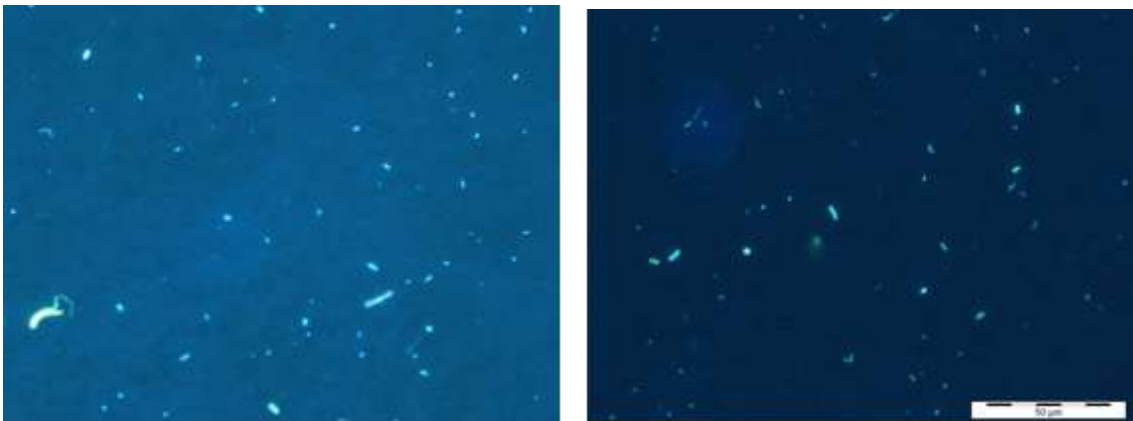


Figura 5 | Mostra SW1 (T1) a l'esquerra i mostra SW2 (T1) a la dreta.

Es van observar diferents camps en mostres dels diferents tractaments (**Figura 6**).

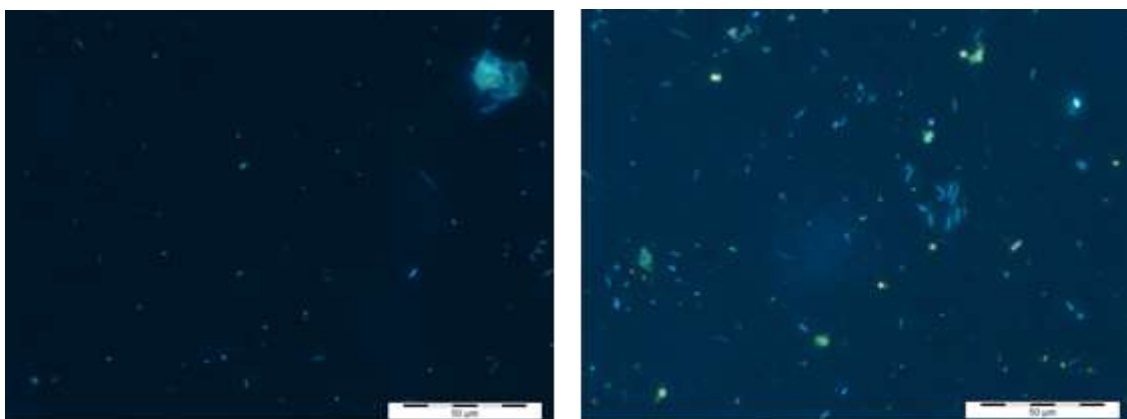


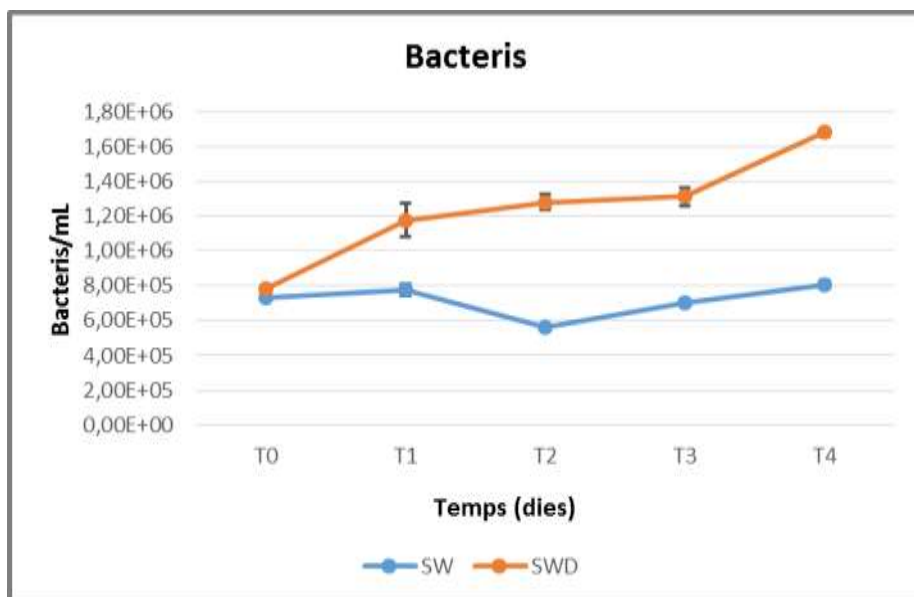
Figura 6 | Mostra SW1 (T4) a l'esquerra i SWD1 (T4) a la dreta.

Al tractament SW, la concentració bacteriana es manté pràcticament constant al llarg dels 4 dies més en que es van prendre mesures. La concentració inicial és de $7,3 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹ i arriba a una concentració al final de l'experiment de $8,07 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹. Les dues concentracions estan dins del mateix ordre de magnitud i la concentració final suposa un increment del 10,6% respecte la inicial. És una variació poc significativa i podem dir que la concentració de bacteris es manté pràcticament constant a SW.

Al tractament SWD s'observa una tendència a que la concentració de bacteris augmenti al llarg dels dies. A l'últim dia la concentració és de $1,68 \cdot 10^6$ bacteris \cdot mL⁻¹, un increment del 116% respecte la inicial ($7,80 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹).

A les mostres prèviament filtrades trobem concentracions molt elevades per tractar-se d'aigua prèviament filtrada per un filtre de 0.2 μ m de diàmetre de por, ja que es troben dins del mateix ordre de magnitud que les de les mostres no filtrades. La concentració bacteriana inicial de 0.2SW i 0.2SWD és de $1.41 \cdot 10^5$ i $1.96 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹, i representen un 19,3% i un 25,3% respectivament de les concentracions de les seves respectives parelles no filtrades (SW i SWD) al temps inicial.

Aquestes concentracions inicials dels tractaments 0.2SW i 0.2SWD mostren que durant el procés de filtració es van colar alguns bacteris. L'objectiu que buscàvem al filtrar prèviament l'aigua de les mostres per un filtre de 0,2 μ m de diàmetre de por era obtenir aigua lliure de microorganismes per avaluar la dinàmica dels microorganismes aerotransportats per les deposicions atmosfèriques en absència dels bacteris propis de l'ecosistema marí, tal com es va plantejar en el disseny de l'experiment.



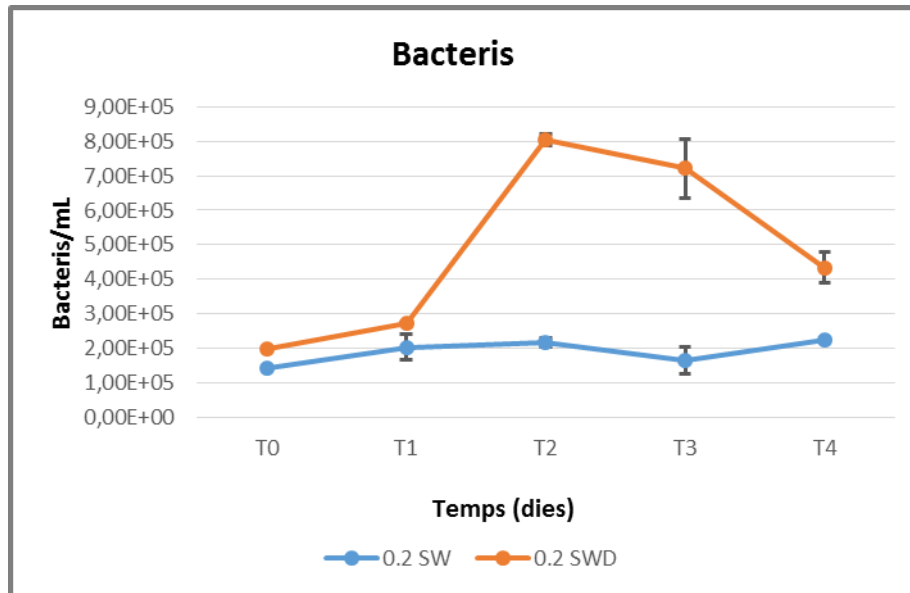


Figura 1 | Abundància de bacteris obtinguda mitjançant el recompte de mostres tenyides amb DAPI, **(A)** pel parell de tractaments SW-SWD i **(B)** pel parell 0.2SW-0.2SWD. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dues rèpliques.

A les mostres 0.2SW la concentració de bacteris al llarg dels dies segueix una dinàmica similar a les mostres SW i la concentració es manté pràcticament constant al llarg dels dies que dura l'experiment. La concentració final és de $2,23 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹, un 58,3% més que la inicial.

A les mostres 0.2SWD s'observa un increment molt definit de la concentració del T1 al T2. Al T2 s'arriba al màxim de creixement dels bacteris en aquest experiment (un augment del 310% respecte a T0). Als dies T3 i T4, però, la concentració bacteriana decreix. Al temps final la concentració és $4,34 \cdot 10^5$ bacteris \cdot mL⁻¹, un augment del 121% respecte al T0.

En resum, podem dir que a l'últim dia de l'experiment les concentracions bacterianes de tots els tractaments eren superiors que a les del temps inicial, però en una proporció diferent. Al tractament SW va incrementar un 10,6%, al SWD un 116%, al 0.2 SW un 58,3% i al 0.2 SWD un 121%.

4.3 Abundància fúngica

Es van comptar tant els fongs arrodonits (en forma de globus amb un piu central) com els allargats (hifes). La paret cel·lular dels fongs s'observa més marcada amb calcofluor perquè conté quitina.

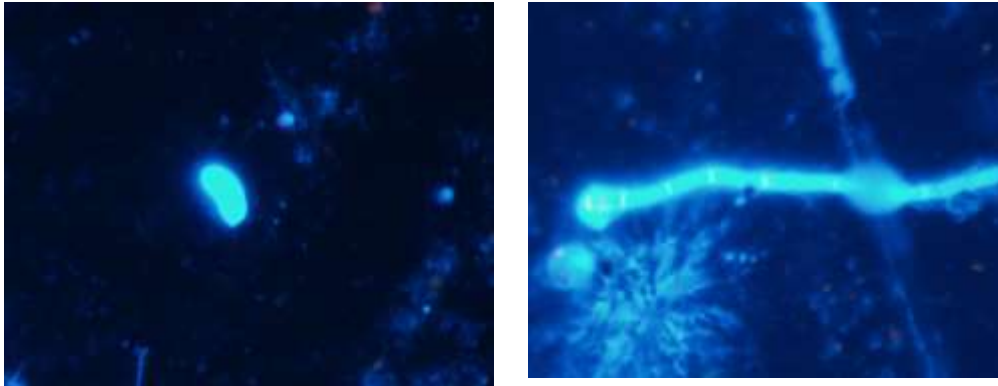


Figura 8 | Imatges en que s'observa un fong arrodonit (esquerra) i una hifa (dreta). Mostra de calcofluor del tractament SWD, rèplica 2, dia 3 (T3).

La concentració de fongs a SW és nul·la o pràcticament nul·la a tots els dies. A SWD la concentració inicial és de $4,05 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹ i s'observa una disminució amb els dies: al T4 la concentració és de $1,72 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹, que equival a un 42,5% de la concentració de T0. S'hauria de veure com evolucionen al cap d'un parell de dies més, tot i que tot sembla indicar que els fongs no sobreviuen a l'aigua de mar o hi són viables durant pocs dies.

Pel que fa als tractaments 0.2SW i 0.2SWD el que s'observa és bastant similar als seus respectius tractaments sense filtrar (SW, SWD). La concentració inicial a 0.2SW també és nul·la o pràcticament nul·la a tots els dies. A 0.2SWD la concentració inicial és de $7,11 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹ i també disminueix fins a arribar a $3,99 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹ al T4, un 56,1% dels inicials.

En resum, les úniques mostres que contenen una concentració no negligible de fongs van ser les corresponents als tractaments que contenen deposicions atmosfèriques (D): SWD i 0.2SWD. En les dues ha decaïgut la concentració fúngica al llarg del temps: un 57,5% en la primera i un 43,9% en la segona, per la qual cosa al T4 queden una mitjana del 49,3% dels fongs inicials.

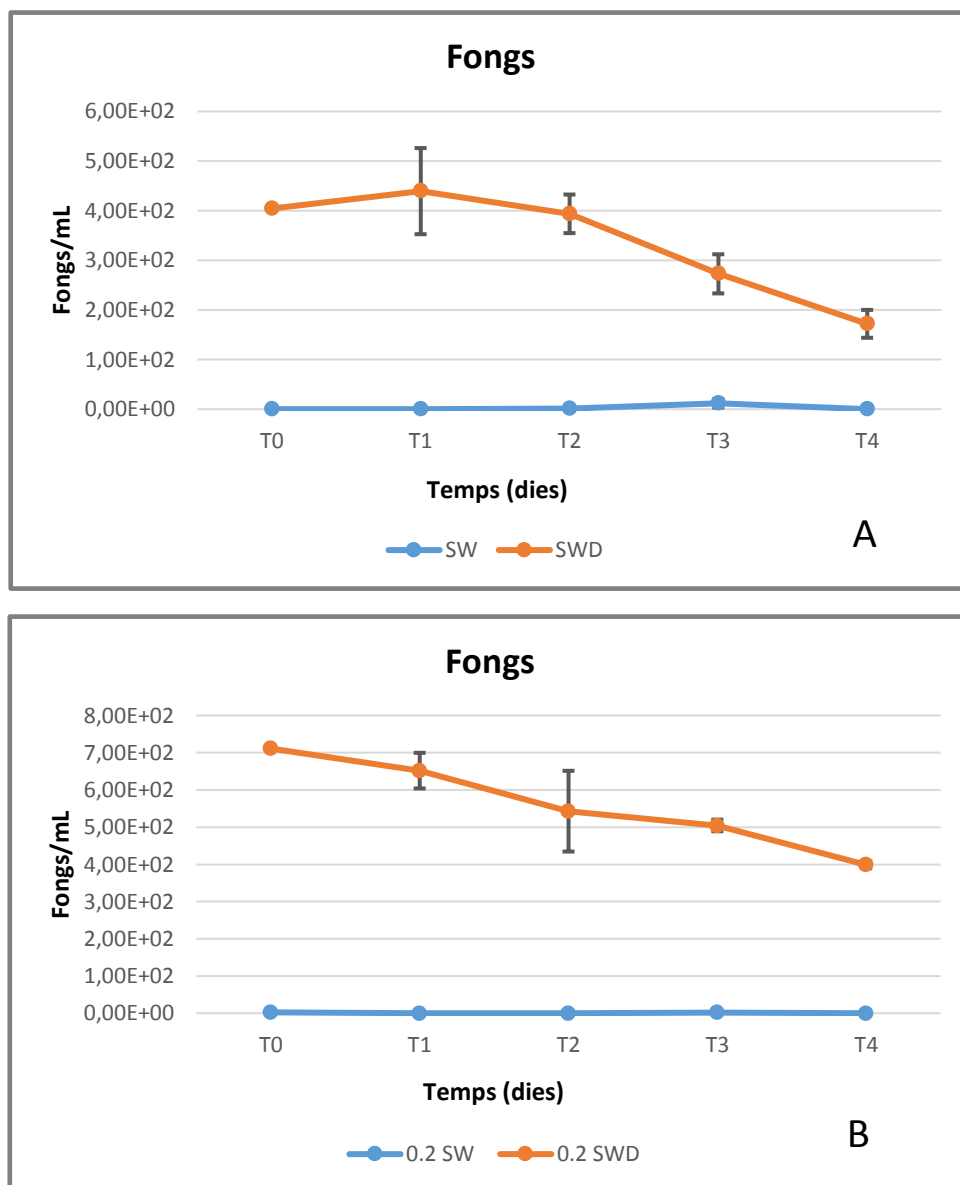


Figura 9 | Abundància de fongs obtinguda mitjançant el recompte de mostres tenyides amb calcofluor-white, **(A)** pel parell de tractaments SW-SWD i **(B)** pel parell 0.2SW-0.2SWD. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dues rèpliques.

4.4 Activitats enzimàtiques d'enzims extracel·lulars

Es va observar que als tractaments sense l'addició de partícules l'activitat enzimàtica que predominava era la de l'enzim β -Glucosidasa. La seva activitat representa entre un 80 i un 90% de l'activitat enzimàtica del total d'enzims que es van tenir en compte (**Figura 10**), els quals són enzims extracel·lulars de degradació de carbohidrats i glucosamines.

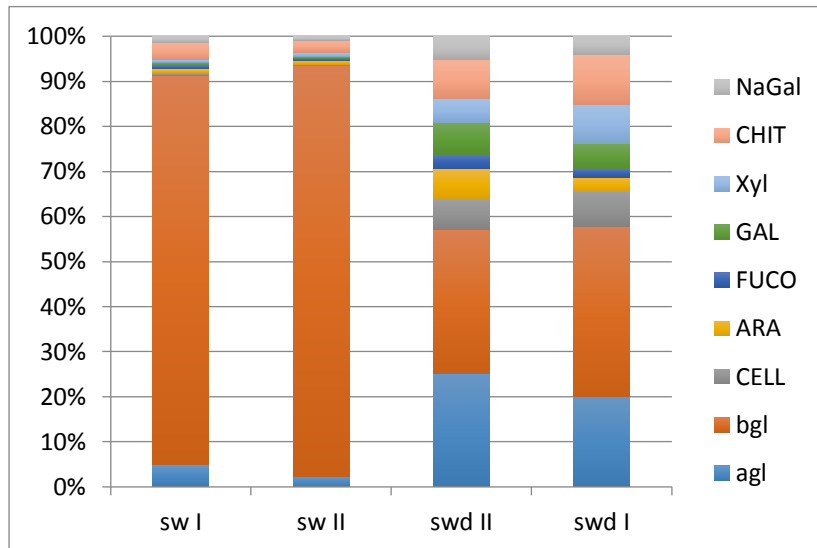


Figura 10 | Percentatge d'activitat dels diferents enzims extracel·lulars de degradació de carbohidrats i glucosamines. Les dades corresponen al temps 4 de les dues rèpliques dels tractaments SW i SWD.

Amb l'addició de les deposicions atmosfèriques incrementa l'activitat dels següents enzims bacterians extracel·lulars: α -Glucosidasa, quitobiasa, xilosidasa, cellobiosidasa, arabinosidasa, galactosidasa, N-acetil-galactosaminidasa i fucosidasa (**Figura 11**). Aquests enzims hidrolitzen a monòmers o a dímers diferents polímers, per exemple la quitobiasa hidrolitza la quitina en els monòmers que la constitueixen, N-acetilglucosamines.

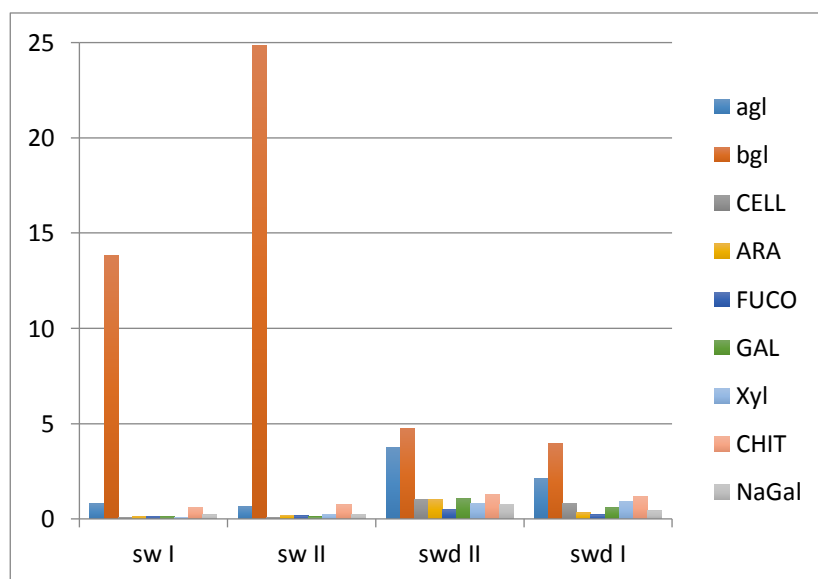
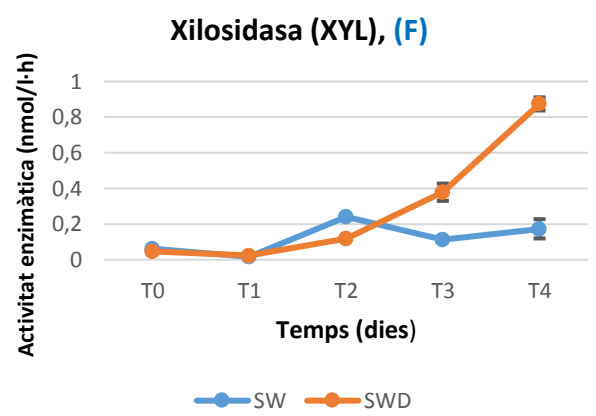
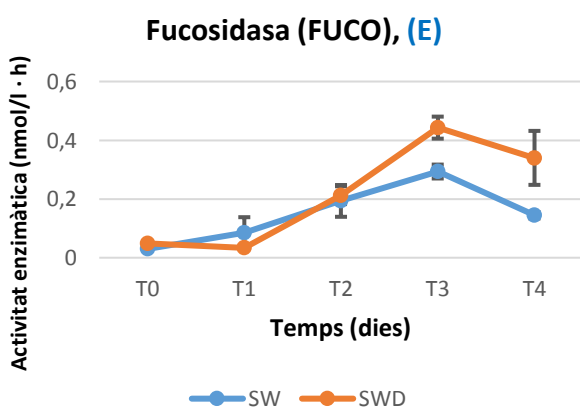
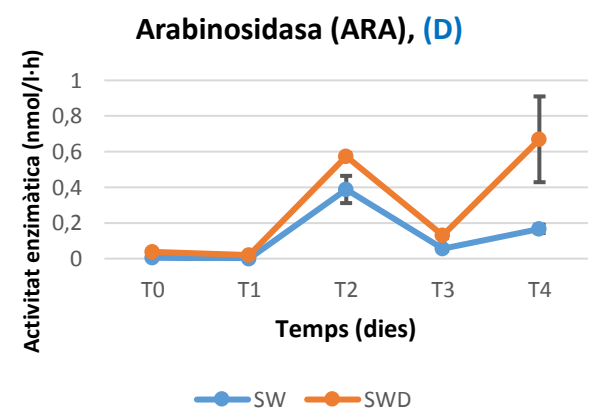
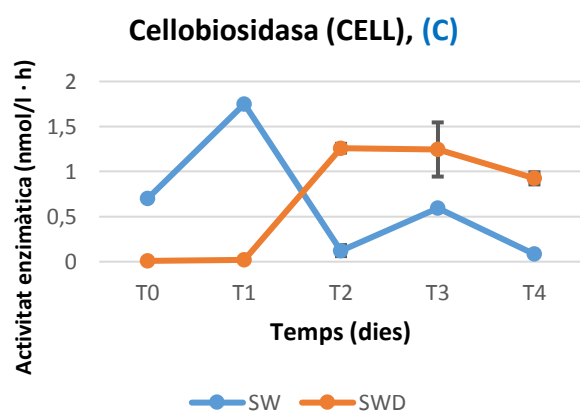
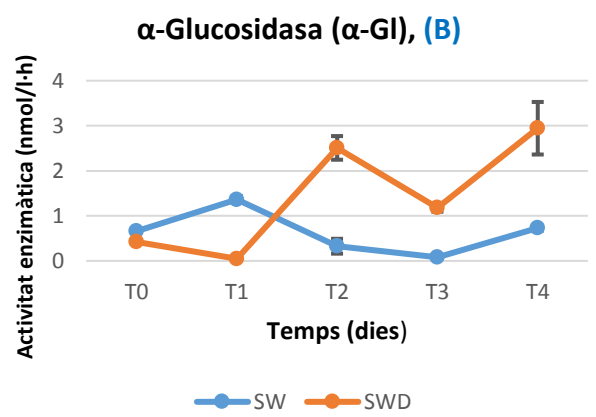
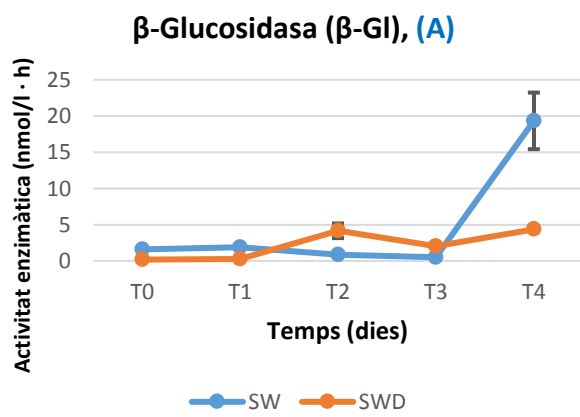


Figura 11 | Activitat dels diferents enzims extracel·lulars de degradació de carbohidrats i glucosamines (en nmol/l-h) al temps final (T4) de les dues rèpliques dels tractaments SW i SWD.



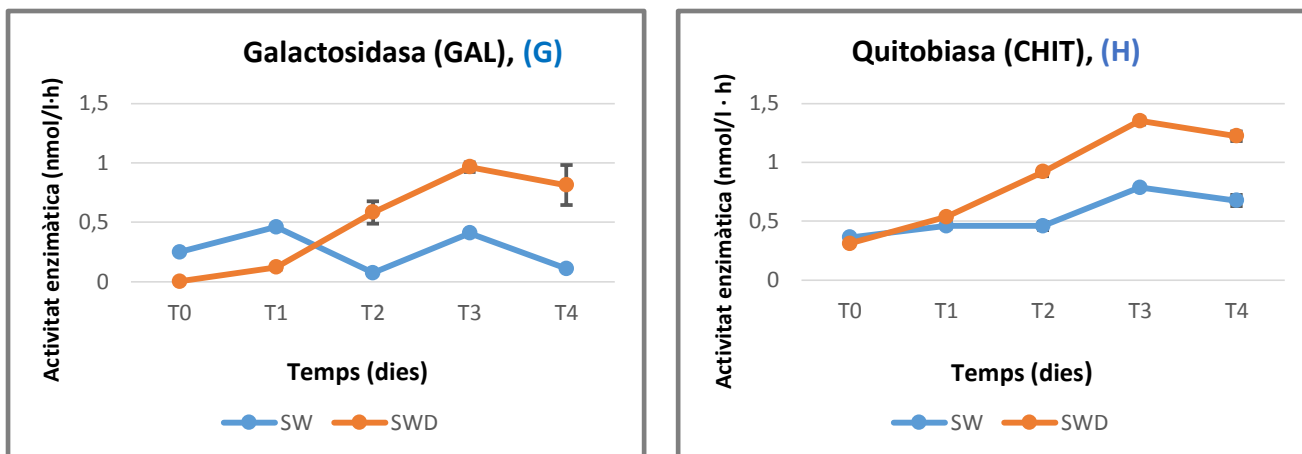


Figura 12 | Activitat dels diferents enzims extracel·lulars de degradació de carbohidrats i glucosamines al llarg dels dies en els tractaments SW i SWD. Les barres d'error mostren la desviació estàndard entre les dues rèpliques. (A) β -Glucosidasa, (B) α -Glucosidasa, (C) Cellobiosidasa, (D) Arabinosidasa, (E) Fucosidasa, (F) Xilosidasa, (G) Galactosidasa, (H) Quitobiasa.

Per als resultats i l'elaboració dels gràfics es van tenir en compte les dues rèpliques dels tractaments SW i SWD perquè als tractaments 0.2SW i 0.2SWD les cèl·lules lisen i podien aportar matèria orgànica extra, fent que els resultats no fossin tan realistes. Amb l'addició de les deposicions atmosfèriques també van observar-se increments en l'activitat d'enzims de degradació de proteïnes (AMA, Leu-aminopeptidasa), èsters de fosfat (APA, fosfatasa alcalina) i de lípids (EST, esterasa).

5. DISCUSSIÓ

5.1 Estimulació bacteriana per la deposició atmosfèrica

A les mostres SW i 0.2SW la concentració bacteriana es manté pràcticament constant a tots els dies, amb petites variacions negligibles i que podrien incloure's dins el propi error experimental. A les mostres SWD i 0.2SWD s'observa una tendència a l'augment amb els dies. S'observa també un creixement més marcat al temps 4 del tractament SWD i un creixement exponencial al temps 2 del 0.2SWD. Per poder confirmar que l'abundància bacteriana augmenta als tractaments que contenen deposicions, però, estaria bé tenir les mesures dels dos dies addicionals més de l'experiment. I així comprovar si la concentració bacteriana segueix augmentant o si tornaria a disminuir.

Al tractament SWD la concentració bacteriana final va incrementar un 116% respecte al temps inicial. Aquests resultats concorden amb l'experiment de Pulido-Vilena *et al.*, 2008, on l'addició de pols va estimular els bacteris heteròtrofs, incrementant-ne la

seva abundància més del 100% (de $0,4 \cdot 10^6$ a $>0,8 \cdot 10^6$). L'increment augmentava a més del 200% als tractaments en què s'havia utilitzat una pols més concentrada. Altres estudis també van observar un augment de l'abundància bacteriana més marcada als tractaments que contenien deposicions atmosfèriques que als que no les tenien (Herut *et al.*, 2016; Krom *et al.*, 2016).

Altres experiments com Sánchez-Pérez *et al.*, 2016, en canvi, no van observar un increment significatiu de l'abundància bacteriana després de l'addició de deposicions atmosfèriques. En aquest experiment (Sánchez-Pérez *et al.*, 2016) sí que al principi la concentració bacteriana va augmentar amb l'addició de deposicions (tant antropogèniques com les de pols provinent del Sàhara) però després va retornar als nivells basals.

Altres estudis (Marín *et al.*, 2017) sí que van observar un increment de l'abundància bacteriana en resposta a les deposicions atmosfèriques, però era un increment poc significatiu en comparació al que havia tingut lloc en la producció i activitat enzimàtica bacterianes. Al mateix experiment (Marín *et al.*, 2017) van observar un creixement exponencial de la concentració bacteriana únicament a les mostres prèviament filtrades per filtres de $0.8\mu\text{m}$ de diàmetre de por, que als següents dies retornava als nivells basals (resultats molt similars als d'Apollo 2). En aquest experiment van concloure que l'abundància bacteriana podia ser estimulada directament per les deposicions atmosfèriques i que l'augment era major en absència de competidors (fitoplàncton) i predadors (nanoflagel·lats heteròtrofs).

Estudis previs (Bonnet *et al.*, 2005; Ternon *et al.*, 2011) van demostrar que l'aportació de bacteris per part de les deposicions d'aerosols antropogènics són no significatives o molt pobres. Per tant, l'efecte majoritàriament positiu dels aerosols sobre l'abundància bacteriana seria com a conseqüència dels nutrients aportats per aquestes deposicions atmosfèriques. El fet de que la superfície del mar Mediterrani tingui una baixa concentració de nutrients i de clorofil·la recolza aquesta explicació.

Experiments previs han demostrat que el fòsfor és el nutrient més probable de ser limitant pel bacterioplàncton heteròtrof de la capa superficial del mar Mediterrani (Sala *et al.*, 2002). Per altra banda, la contaminació incrementa els precursors d'àcids a l'atmosfera (NO_x , SO_x) i els compostos àcids incrementen la solubilitat del fòsfor (Nenes *et al.*, 2011). Per això els aerosols antropogènics aporten més fòsfor assimilable, afavorint el creixement bacterià perquè aporten el seu nutrient limitant.

Per comparar aquest experiment amb el seu anterior Apollo 1 (de disseny molt similar però realitzat amb aigües costaneres i no de mar obert), podem dir que els resultats obtinguts són diferents. A Apollo 1 l'abundància bacteriana va ser molt similar a les mostres amb i sense deposicions atmosfèriques (Saludes, C., 2017).

Finalment, podem dir que l'efecte que tenen les deposicions atmosfèriques sobre els microorganismes marins a les regions amb una baixa concentració de nutrients i de clorofil·la és important per entendre el funcionament actual i futur d'aquestes regions (Guieu *et al.*, 2014). És d'especial importància conèixer el funcionament d'aquestes

regions perquè les zones oligotròfiques representen més del 75% de les àrees oceàniques totals (Berger, 1989).

A més, amb el canvi climàtic s'espera que la temperatura i les activitats antropogèniques vagin en augment i que, en conseqüència, augmenti la quantitat de carboni i de macro i micronutrients depositats pels aerosols sobre les aigües del mar Mediterrani (Herut *et al.*, 2016), podent propiciar canvis en les dinàmiques dels microorganismes marins.

5.2 Supervivència de fongs a l'aigua de mar

Al tractament SW no hi ha fongs i a SWD la concentració inicial és de $4,05 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹. A les mostres 0.2 passa el mateix: la concentració inicial a 0.2SW és nul·la i en canvi al tractament 0.2SWD és de $7,11 \cdot 10^2$ fongs \cdot mL⁻¹. Per tant, podríem dir que a l'aigua de mar no hi ha fongs, però sí a les deposicions atmosfèriques.

Als tractaments on observem una concentració no negligible de fongs (aquells que tenen deposicions atmosfèriques: SWD i 0.2SWD), s'observa una clara disminució de la concentració amb el transcurs dels dies. Al tractament SWD va produir-se una disminució al final de l'experiment del 57,5% i al tractament 0.2SWD del 43,9%. Això ens indicaria que els fongs aerotransportats pels aerosols i depositats a l'aigua de mar no sobreviuen a l'ecosistema marí i acaben morint a mesura que passen els dies. Per acabar-ho de confirmar, però, seria interessant analitzar les mostres del parell de dies addicionals que seguirien en l'experiment (T5, T6) per comprovar si als dos tractaments s'arriba al temps final a una concentració nul·la de fongs.

Al tractament SWD la concentració de fongs disminueix de forma més ràpida que a 0.2SWD. El que s'observa a SWD és que als dos primers temps (T1 i T2) la concentració es manté pràcticament constant i als següents dies (T3 i T4) es produeix una caiguda més marcada, quedant ~50% dels fongs inicials. A 0.2SWD la disminució de l'abundància fúngica és més progressiva i al temps final queden ~56% dels fongs inicials.

Pel que fa als fongs, gairebé, pel que coneixem, no s'han realitzat estudis previs sobre la seva dinàmica a l'aigua de mar un cop depositats. Però sí que es va realitzar l'experiment Apollo 1, de disseny molt similar al d'Apollo 2 però amb aigües costaneres, en el qual es van obtenir els mateixos resultats: els fongs tampoc eren capaços de sobreviure al medi marí i hi havia una clara disminució d'aquests al llarg dels dies (Saludes, C. 2017).

Serien interessants més estudis sobre el paper dels fongs aerotransportats a l'ecosistema marí per estudiar com afecta la seva deposició en la bioquímica, el reciclatge de nutrients i els nivells tròfics del medi marí.

5.3 Estimulació de les activitats enzimàtiques bacterianes per la deposició

La gran majoria d'estudis van agafar com a mesura d'activitat la producció bacteriana i mostraven un augment més gran de l'activitat que de l'abundància (Krom *et al.*, 2016, Marin *et al.*, 2017). En aquest treball, però, hem volgut ampliar el ventall d'activitats estudiant l'activitat de fins a 12 enzims extracel·lulars per veure en més detall quines activitats són estimulades per les deposicions atmosfèriques.

Els nostres resultats mostren que, en general, la deposició atmosfèrica aporta matèria orgànica de composició molt diversa perquè per utilitzar-la els bacteris han de sintetitzar enzims de tipus molt diversos, i estar menys especialitzats en la degradació de derivats de la cel·lulosa (β -Glucosidasa).

La β -Glucosidasa era, d'entre tots els enzims de degradació de carbohidrats i glucosamines que es van tenir en compte per l'estudi, el que predominava al tractament SW amb d'entre un 80 i un 90% de l'activitat enzimàtica total tinguda en compte. Aquests resultats indiquen que hi havia una elevada hidròlisi de carbohidrats, principalment derivats de la cel·lulosa (Sala *et al.*, 2001), els quals són molt comuns a l'aigua de mar i són d'origen fitoplanctònic.

Per altra banda, a l'afegir les deposicions atmosfèriques (tractament SWD) augmenta el percentatge d'activitat de diferents enzims extracel·lulars i disminueix l'activitat de la β -Glucosidasa. Alguns dels enzims que augmenten són de degradació de proteïnes (Leu-aminopeptidasa), de lípids (esterasa), de èsters de fosfat (fosfatasa alcalina) i també diversos enzims de degradació de carbohidrats i glucosamines (per ex. α -Glucosidasa, quitobiasa). Això ens indica que la deposició atmosfèrica aporta proteïnes, lípids, èsters de fosfat i polisacàrids com per exemple la quitina (parets cel·lulars dels fongs).

El fet que incrementi l'activitat de l'enzim AMA (Leu-aminopeptidasa) al tractament SWD indica que les deposicions atmosfèriques van aportar N orgànic dissolt a l'aigua de mar i està d'acord amb estudis previs realitzats (Marín *et al.*, 2017). Les deposicions van poder aportar N orgànic a través d'aminoàcids (enzim AMA) o de glucosamines com la N-acetilglucosamina que forma la quitina (enzim quitobiasa). Aquests resultats concorden amb estudis que van assenyalar que els aerosols antropogènics són més rics en N i compostos orgànics (Guerzoni *et al.*, 1999).

6. ASPECTES A MILLORAR

Per les mostres prèviament filtrades per un filtre de 0.2 μ m de diàmetre de por vam observar bacteris presents (al tractament SW). Per la qual cosa, sospitem que van colar-se bacteris marins (tot i que les anàlisis moleculars confirmaran la procedència dels bacteris). Per això, aconseguir aigua de mar correctament filtrada i lliure de microorganismes seria una millora per poder observar la dinàmica dels microorganismes aerotransportats en absència dels bacteris marins.

També seria interessant que l'experiment s'allargués un parell de dies més per avaluar si la tendència a augmentar de la concentració bacteriana de les mostres amb deposicions atmosfèriques segueix així. I també per confirmar que la concentració fúngica arriba a ser nul·la al final.

7. CONCLUSIONS

1. Les deposicions atmosfèriques estimulen clarament el creixement dels bacteris marins, tant en els tractaments de SW com 0.2SW, on creixen més, probablement degut a l'absència de depredadors.
2. Les deposicions atmosfèriques estimulen les activitats de diversos enzims de degradació de proteïnes, de lípids, d'èsters de fosfat i de carbohidrats i glucosamines, suggerint que les deposicions aporten compostos orgànics molt diversos.
3. No es va poder esbrinar quina era la supervivència de bacteris aeris a l'aigua de mar ja que el tractament per fer-ho, aigua de mar filtrada per 0.2µm, probablement s'hi van introduir alguns bacteris que van créixer. Sospitem que aquests bacteris eren bacteris marins i no aeris, però anàlisis moleculars de les mostres ens confirmaran la identitat d'aquests bacteris i si el seu origen era de la deposició o a l'aigua de mar.
4. Els fongs de l'aire no sobreviuen a l'aigua de mar, i al cap de 4 dies ja només queda un 50,7% de mitjana de la concentració inicial.

8. AGRAÏMENTS

Vull agrair als meus tutors: la meva tutora externa, la Dra. Montse Sala Farré i el meu tutor UB, el Dr. Jordi Urmeneta per tot el seguiment, indicacions i ajuda que m'han proporcionat durant la meva realització dels Pràcticums i TFG. També als professionals del ICM-CSIC com la Irene Forn i la Carolina Antequera per la formació que m'han proporcionat al microscopi d'epifluorescència i al laboratori. Per últim també voldria agrair al *Ministerio de Industria, Economía y Competividad* per finançar el projecte ANIMA des de l'any 2016 fins l'any 2018.

9. BIBLIOGRAFIA

- Bellés-Garulera, J., Vila, M., Borrull, E., Riobó, P., Franco, J. M., Sala, M. M. (2016). Variability of planktonic and epiphytic vibrios in a coastal environment affected by *Ostreopsis* blooms. *Sci Mar* 80S1: 97-106.
- Berger, M. J., and Colella, P. (1989). Local adaptive mesh refinement for shock hydrodynamics. *Journal of Computational Physics*, 82(1), 64-84.
- Bonnet, S., Guieu, C., Chiaverini, J., Ras, J., Stock, A. (2005). Effect of atmospheric nutrients on the autotrophic communities in a low nutrient, low chlorophyll system. *Limnol Oceanogr* 50, 1810-1819.
- Chow, C. E. T., and Suttle, C. A. (2015). Biogeography of viruses in the sea. *Annu. Rev. Virol.* 2, 41–66.
- Cvetkovic, A., Menon, A. L., Thorgersen, M. P., Scott, J. W., Poole, F. L., Jenney F. E. Jr., *et al.* (2010). Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* 466, 779–782.
- Dannemiller, K. C., Reeves, D., Bibby, K., Yamamoto, N., and Peccia, J. (2014). Fungal high-throughput taxonomic identification tool for use with nextgeneration sequencing (FHiTINGS). *J. Basic Microbiol.* 54, 315–321.
- Falkowski, P. (1997). Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* 387, 272–275.
- Griffin, D. W. (2007). Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 459–477.
- Ganor, E., Osetinsky, I., Stupp, A., and Alpert, P. (2010). Increasing trend of African dust, over 49 years, in the eastern Mediterranean. *J. Geophys. Res. Atmos.* 115, 1–7.
- Guerzoni, S., Chester, R., Dulac, F., Herut, B., Loÿe-Pilot, M. D., Measures, C., *et al.* (1999). The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean Sea. *Prog. Oceanogr.* 44, 147–190.
- Guieu, C., Loÿe-Pilot, M. D., Ridame, C., and Thomas, C. (2002). Chemical characterization of the Saharan dust end-member: some biogeochemical implications for the western Mediterranean Sea. *J. Geophys. Res. Atmos.* 107, ACH 5-1–ACH 5-11.
- Guieu, C., Aumont, O., Paytan, A., Bopp, L., Law, S. C., Mahowald, N., *et al.* (2014). Global biogeochemical cycles deposition to low nutrient low chlorophyll regions. *Glob. Biogeochem. Cycles* 28, 1179–1198.

- Herut, B., Rahav, E., Tsagaraki, T. M., Giannakourou, A., Tsiola, A., Psarra, S., *et al.* (2016). The potential impact of Saharan dust and polluted aerosols on microbial populations in the East Mediterranean Sea, an overview of a mesocosm experimental approach. *Front. Mar. Sci.* 3:226.
- Hervas, A., Camarero, L., Reche, I., and Casamayor, E. O. (2009). Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. *Environ. Microbiol.* 11, 1612–1623.
- Hoppe, H. G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11, 299-308.
- Huertas, M. J., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A. M., and Florencio, J. F. (2014). Metals in cyanobacteria: analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. *Life* 4, 865–886.
- Kellogg, C. A., and Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol. Evol.* 21, 638–644.
- Kress, N., Frede Thingstad, T., Pitta, P., Psarra, S., Tanaka, T., Zohary, T., *et al.* (2005). Effect of P and N addition to oligotrophic Eastern Mediterranean waters influenced by near-shore waters: a microcosm experiment. *Deep Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 52, 3054–3073.
- Krom, M. D., Kress, N., Brenner, S., and Gordon, L.I. (1991). Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 36, 424–432.
- Krom, M.D., Shi, Z., Stockdale, A., Berman-Frank, I., Giannakourou, A., Herut, B., *et al.* (2016). Response of the Eastern Mediterranean microbial ecosystem to dust and dust affected by acid processing in the atmosphere. *Front. Mar. Sci.* 3:133.
- Marín, I., Nunes, S., Sánchez-Pérez, E. D., Txurruka, E., Sala, M. M., Antequera, C., Marrasé, C., and Peters, F. (2017). Coastal Bacterioplankton Metabolism Is Stimulated Stronger by Anthropogenic Aerosols than Sahara Dust. *Front. Mar. Sci.* 8:2215.
- Marshall, W. A., and Chalmers, M. O. (1997). Airborne dispersal of Antarctic terrestrial algae and cyanobacteria. *Ecography* 20, 585–594.
- Mayol, E., Jiménez, M. A., Herndl, G. J., Duarte, C. M., and Arrieta, J. M. (2014). Resolving the abundance and air-sea fluxes of airborne microorganisms in the North Atlantic Ocean. *Front. Microbiol.* 5:557.

- Nenes, A., Krom, M.D., Mihalopoulos, N., Van Cappellen, P., Shi, Z., Bougiatioti, A., *et al.* (2011). Atmospheric acidification of mineral aerosols: a source of bioavailable phosphorus for the oceans. *Atmos. Chem. Phys.* 11, 6265–6272.
- Paytan, A., Mackey, K. R.M., Chen, Y., Lima, I. D., Doney, S. C., and Mahowald, N. (2009). Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4601–4605.
- Peter, H., Hörtnagl, P., Reche, I., and Sommaruga, R. (2014). Bacterial diversity and composition during rain events with and without Saharan dust influence reaching a high mountain lake in the Alps. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 618–624.
- Polymenakou, P. N. (2012). Atmosphere: a source of pathogenic or beneficial microbes? *Atmosphere* 3, 87–102.
- Porter, K., Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25, 943-948.
- Prospero, J. M., Blades, E., Mathison, G., and Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia* 21, 1–19.
- Pulido-Villena, E., Wagener, T., Guieu, C. (2008). Bacterial response to dust pulses in the western Mediterranean: Implications for carbon cycling in the oligotrophic ocean. *Glob. Biogeochem. Cycles* 22, 1-12.
- Rahav, E., Paytan, A., Chien, C. T., Ovadia, G., Katz, T., and Herut, B. (2016). The impact of atmospheric dry deposition associated microbes on the southeastern Mediterranean Sea surface water following an intense dust storm. *Frontiers in Marine Science* 3, 127.
- Raveh, O., David, N., Rilov, G., and Rahav, E. (2015). The temporal dynamics of coastal phytoplankton and bacterioplankton in the Eastern Mediterranean Sea. *PLoS ONE* 10:e0140690.
- Reche, I., Ortega-Retuerta, E., Romera, O., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., and Casamayor, E. O. (2009). Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs. *Limnol. Oceanogr.* 54, 869–879.
- Sala, M. M., Karner, M., Arin, L., and Marrasé, C. (2001). Measurement of ectoenzyme activities as an indication of inorganic nutrient imbalance in microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 301–311.

Sala, M. M., Peters, F., Gasol, J. M., *et al.* (2002). Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aqua. Microb. Ecol.* 27, 47-56.

Sala, M. M., Arrieta, J. M., Boras, J. A., Duarte, C. M., and Vaqué, D. (2010). The impact of ice melting on bacterioplankton in the Arctic Ocean. *Polar Biol.* 33, 1683–1694.

SALUDES, C. (2017). *Impacto de aerosoles atmosféricos sobre microorganismos marinos en el litoral de Barcelona*. Treball final de grau [TFG]. Barcelona: Universitat de Barcelona.

Sánchez-Pérez, E. D., Marín, I., Nunes, S., Aparicio, F. L., Fernández-González, L., Peters, F., *et al.* (2016). Aerosol inputs affect the optical signatures of dissolved organic matter in NW Mediterranean coastal waters. *Sci. Mar.* 80, 437–446.

Seifried, J. S., Wichels, A., and Gerdt, G. (2015). Spatial distribution of marine airborne bacterial communities. *Microbiology Open* 25, 475–490.

Sohm, J. A., Webb, E. A., and Capone, D. G. (2011). Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 499–508.

Ternon, E., Guieu, C., Ridame, C., L'Helguen, S., and Catala, P. (2011). Longitudinal variability of the biogeochemical role of Mediterranean aerosols in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 8, 1067–1080.

Thingstad, T. F., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Flaten, G. A., Groom, S., Herut, B., *et al.* (2005). Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science* 309, 1068–1071.

10. ANNEX

10.1 FIGURES



Figura A | Filtrador automàtic en el que es va realitzar la tinció i filtració de les mostres.



Figura B | Microscopi d'epifluorescència manual OLYMPUS BX40 amb el que es van comptar les mostres.



Figura C | Comptadors automàtics utilitzats en el recompte de fongs pel microscopi d'epifluorescència.

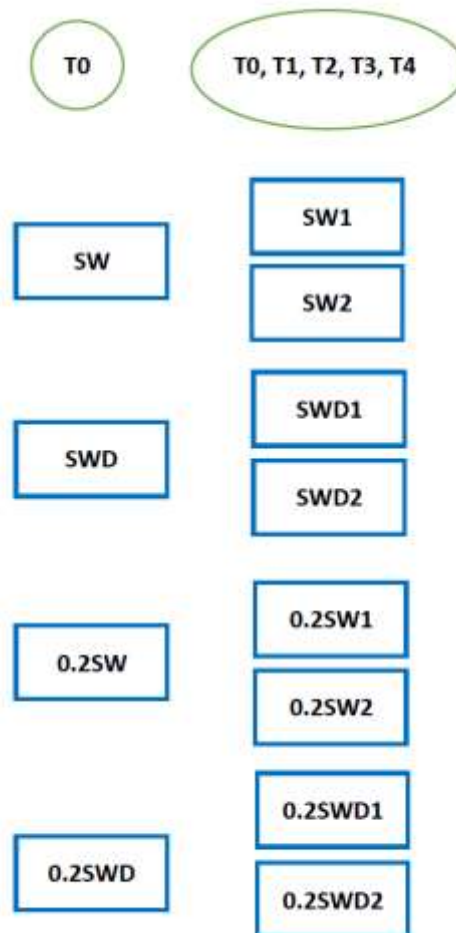


Figura D | Fluorímetre "Modulus Microplate Multimode Reader" amb el que es va llegir la fluorescència de la placa (Figura E).

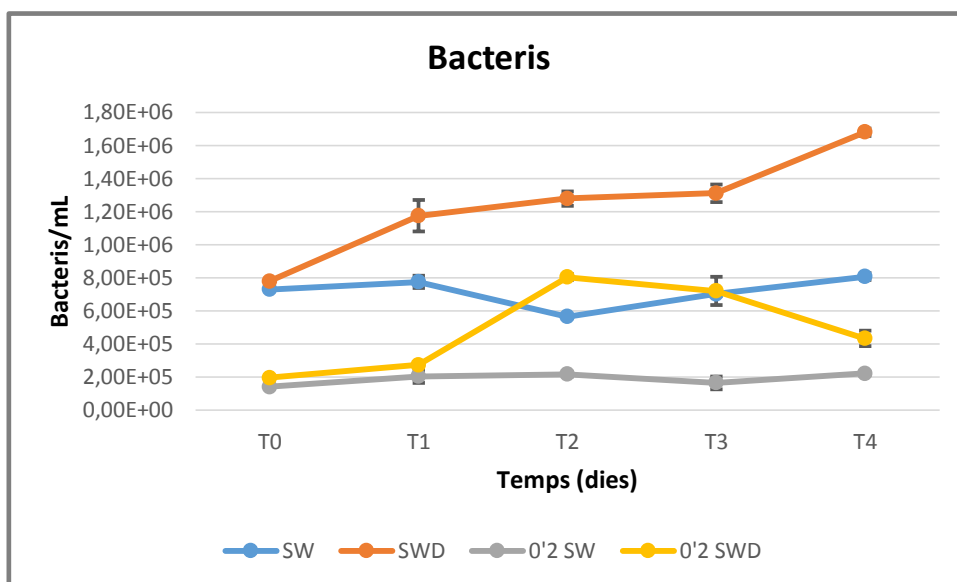


Figura E | Placa negra "Black Cliniplate Thermo Scientific" utilitzada en l'anàlisi de l'activitat enzimàtica de diversos enzims.

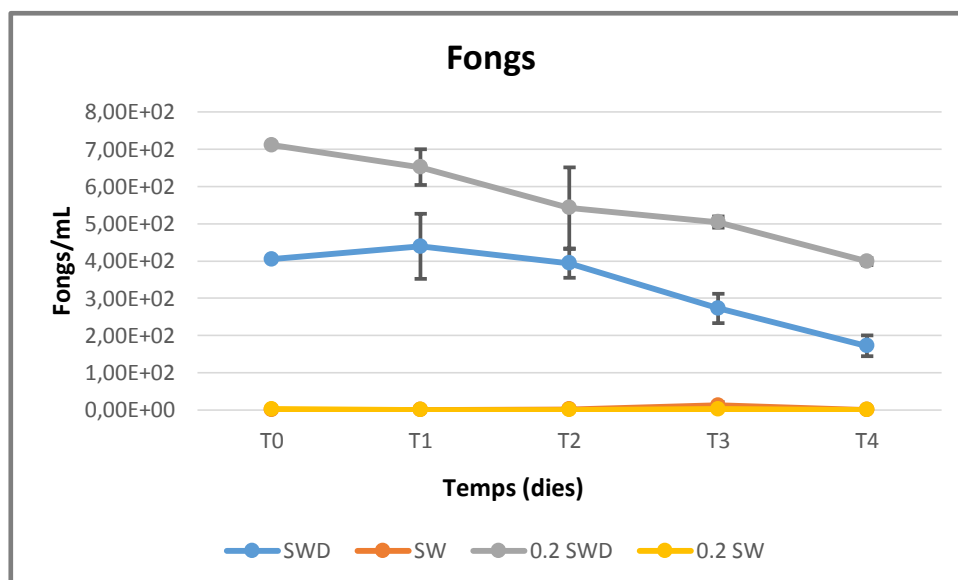
10.2 GRÀFICS



Gràfic 1 | Imatge esquemàtica del disseny experimental d'Apollo 2 en què s'observa dues rèpliques per tractament a partir del T1.



Gràfic 2 | Abundància de bacteris obtinguda mitjançant el recompte de mostres tenyides amb DAPI pels tractaments SW, SWD, 0.2SW i 0.2SWD. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dues rèpliques.



Gràfic 3 | Abundància de fongs obtinguda mitjançant el recompte de mostres tenyides amb calcofluor-white pels tractaments SW, SWD, 0.2SW i 0.2SWD. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dues rèpliques.

10.3 IMATGES DE MICROSCÒPIA D'EPIFLUORESCÈNCIA

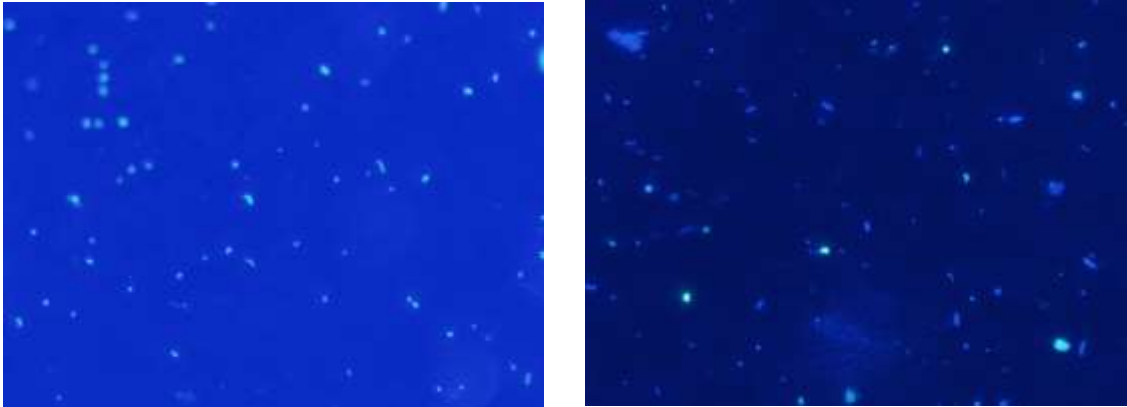


Figura 1 | Fotografies mitjançant el programa CELL F del tractament SW (esquerra) i SWD (dreta), ambdós del dia 1 i rèplica 1. Al tractament SWD s'observen, a més de bacteris, diferents partícules; i també agregats de bacteris (part superior esquerra de la imatge).