



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADES
A L'ESTUDI DE SISTEMES ESTRATIFICATS**

SERGI RAMÍREZ MORENO

2003

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I DE MICROBIOLOGIA
UNITAT DE MICROBIOLOGIA

**TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADES
A L'ESTUDI DE SISTEMES ESTRATIFICATS**

Memòria redactada per optar al grau de doctor
en Ciències, Secció de Biològiques, per la
Universitat Autònoma de Barcelona,
per Sergi Ramírez Moreno

La directora de tesi,

Dra. Núria Gaju i Ricart

Bellaterra, octubre de 2003

a EVA ORTEGA

Agraïments

Voldria agrair a la meua directora de tesi, doctora Núria Gaju, la seua dedicació i predisposició per a tirar endavant aquest treball. A la doctora Isabel Esteve, la seua ajuda i dedicació al llarg de tot aquest treball. A Vicky, que malgrat no formar actualment part del grup, va dedicar-me moltes hores en els meus inicis sense donar mai mostres de cansament o d'avorriment. A la Bego i la Balbi, les seues aportacions constructives.

D'una manera molt i molt especial, i a pesar de tots els contratemps, vull donar les gràcies a Xano per aguantar els meus horaris i impertinències tant a l'IBF com a Suïssa (EAWAG). Vull agrair-li la seua gran aportació, sense la qual no hauria pogut ser possible la realització d'aquest treball. Gràcies per la teva paciència, orientació, consells, crítica constructiva, treball, en definitiva, per tot. També per fer més fàcil la meua adaptació a Suïssa, pel transport fins als supermercats i per les sortides ocioturístiques. Voldria aprofitar per agrair també al grup del doctor Jan Ruelof van der Meer (Dept. Microbiologia, EAWAG, Suïssa) (Karin, Koni, etc.) la seva col·laboració i disponibilitat per adoptar-me durant tres mesos en el seu laboratori.

A Maira li agraeixo la seua aportació personal, experiència, bon rotllo i crítiques constructives. A Xavier Munill, Isabel Ferrera, Maria José Bermúdez i Marc Llorós, el seu treball i companyia durant les sortides de camp al delta de l'Ebre, Banyoles i Estanya. A Ricard Guerrero (Dept. Microbiologia, UB, Barcelona) i a tots els integrants del seu grup, la seua gran disponibilitat i que em facilitessin alguns dels aparells utilitzats per fer les mesures de camp.

Dono les gràcies a Francesc Rodríguez i Pepa Antón (Dept. Microbiologia, Universitat Miguel Hernández, Campus de Sant Joan, Alacant) i a tota la gent del seu grup per ajudar-me en els moments difícils. Igualment, i pel mateix motiu, al grup de Jesús Garcia (Dept. Microbiologia, Universitat de Girona) i a tota la gent del seu grup, i agraeixo sobretot l'hospitalitat de Javi Rodríguez.

Voldria agrair, en general, a tot l'IBF la seua col·laboració durant els primers anys d'aquesta tesi. També dono les gràcies a les meues secretàries preferides, Teresa i Amèlia, que m'ajudaven a realitzar les tasques burocràtiques amb molta devoció i amb les quals compartíem el poc temps lliure que teníem degustant cafès i fideuàs. A Nati, per la seua qualitat humana malgrat no voler saber res de mi a menys que em transformi en un ésser musculós, una tasca realment impossible. A Patrick i Valdo, localitzats al búnquer dels bioinformàtics, per "lo" bon rotllo. A Juan Checa, el millor dels tècnics que es pot aspirar a trobar en un laboratori, per les seues aportacions materials i sobretot humanes.

Vull recordar Pp Luí, Compi, Edna, Teresa, Juan Cedano, Ninti i molts altres, sense els quals no hauria pogut realitzar aquest treball. Gràcies per ser com sou, pels sopars, sortides nocturnes espectaculars, hores compartides a la màquina del cafè, aportacions informàtiques de tot tipus, per compartir les penes i experiències personals.

Vull donar les gràcies a tota la gent del Departament de Genètica i de Microbiologia que ha col·laborat en la realització d'aquest treball, de forma directa o indirecta. A les secretàries, tècnics, etc., per la seva inestimable aportació. A Jordi Barbé i a Montse Llagostera, per la seua aportació humana, científica, bibliogràfica i material.

Gràcies a Ricard Amils, Elena González i la resta de bons companys que he trobat al Centre de Biologia Molecular Severo Ochoa (UAM).

Gràcies als sogres, Carme i Modest, i "l'abuela" Carme, que han patit amb mi aquests darrers anys.

Molt especialment vull donar les gràcies als meus pares, Conxita i Paco, que, malgrat no començar molt bé els primers anys de la llicenciatura, no van deixar de creure en mi. Als meus germans, Xavier i Raül, i respectives dones, Montse i Inés, que sempre hi són a pesar de la meua fugida. Encara que són molt petits per a entendre una bajanada com aquesta, a Paula, Laia i Roger.

D'una forma molt especial gràcies a la meua flor, Eva, sense la qual s'hauria fet insuportable la llarga durada d'aquest projecte personal i amb la qual he compartit i compartiré moltes coses en un futur.

Abreviatures

ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNr	àcid desoxiribonucleic ribosomal
ARDRA	anàlisi de restricció d'ADNr amplificat
ARN	àcid ribonucleic
ARNr	àcid ribonucleic ribosomal
BSA	albúmina sèrica bovina
CTAB	bromur d'hexadeciltrimetilamoni
DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenilindol
DGGE	gel d'electroforesi amb gradient desnaturalitzant
DPDS	N, N-dimetil-p-fenilendiamino sulfat
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
FISH	fluorescència d'hibridació <i>in situ</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RFLP	polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció
RISA	anàlisi de l'espaiador intergènic ribosomal
RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa per transcripció reversa
16S ADNr	ADN ribosomal 16S
16S ARNr	ARN ribosomal 16S
SDS	dodecil sulfat sòdic
TGGE	gel d'electroforesi amb gradient de temperatura
T-RFLP	polimorfisme en la longitud dels fragments terminals de restricció

Índex

Resum	i
I. Introducció i objectius generals del treball	1
I.1 Diversitat microbiana, un enigma sense resoldre	3
I.2 Caracterització d'ecosistemes naturals: mètodes microbiològics clàssics i moleculars	4
I.3 16S ARNr, cronòmetre evolutiu	5
I.4 Tècniques de biologia molecular aplicades en estudis d'ecologia microbiana	6
I.4.1 Anàlisi qualitativa d'una comunitat	8
I.4.1.1 Extracció d'àcids nucleics	8
I.4.1.2 Anàlisi dels extractes d'ADN	9
I.4.1.2.1 Anàlisi total de la comunitat	9
I.4.1.2.2 Anàlisi parcial de la comunitat	11
I.4.1.3 Anàlisi dels extractes d'ARN	16
I.4.2 Anàlisi quantitativa d'una comunitat	17
I.4.2.1 FISH	19
Objectius generals del treball	22
II. Materials i mètodes	23
II.1 Soques tipus. Condicions de creixement	24
II.2 Zones de mostreig	25
II.2.1 Tapissos microbians del delta de l'Ebre	25
II.2.2 Estanyols d'en Cisó i el Vilar	26
II.2.3 Llac Gran d'Estanya	27

II.3 Mostreig i tractament de les mostres	28
II.3.1 Dies de mostreig i presa de les mostres	28
II.3.2 Mesures de camp	29
II.3.2.1 Intensitat de llum incident, conductivitat, temperatura, salinitat i oxigen dissolt	29
II.3.3 Anàlisis fisicoquímiques	30
II.3.3.1 Determinació del sulfur d'hidrogen	30
II.3.3.2 Determinació del pH	30
II.3.4 Anàlisis bioquímiques	30
II.3.4.1 Pigments	30
II.3.4.2 Proteïnes	31
II.3.5 Anàlisis biològiques	31
II.3.5.1 Laminació dels tapissos	31
II.3.5.2 Microscòpia	32
II.3.5.2.1 Caracterització microscòpica	32
II.3.5.2.2 Recomptes cel·lulars	32
II.3.6 Anàlisis moleculars	33
II.3.6.1 Extracció d'ADN genòmic	33
II.3.6.2 PCR-RFLP	35
II.3.6.2.1 Optimització de la concentració de clorur magnèsic emprat en la PCR	35
II.3.6.2.2 PCR	35
II.3.6.2.3 Restricció i separació electroforètica dels fragments	37
II.3.6.3 PCR-DGGE	37
II.3.6.3.1 PCR	37
II.3.6.3.2 Separació electroforètica dels productes de la PCR per DGGE	38
II.3.6.3.3 Extracció, reamplificació i seqüenciació de les bandes de DGEE	39
II.3.6.3.4 Anàlisis de seqüències	40
II.3.6.4 FISH	40
II.3.7 Anàlisi estadístic	41
II.3.8 Número d'accés de seqüències	44

III. Tapissos microbians del delta de l'Ebre (Tarragona)	45
III.1 Introducció	46
III.1.1 Tapissos microbians	46
III.1.2 Distribució i localització dels tapissos microbians	48
III.1.3 Tapissos microbians del delta de l'Ebre	49
III.1.3.1 Punt de mostreig P3	50
III.2 Objectius	51
III.3 Resultats	53
III.3.1 Paràmetres fisicoquímics	53
III.3.2 Caracterització macroscòpica i microscòpica	54
III.3.3 Extracció d'ADN	56
III.3.4 Amplificació dels gens procariòtics dels 16S ARNr	56
III.3.5 16S ADN _r -RFLP	57
III.3.6 Anàlisi de dades	60
III.4 Discussió	62
III.5 Conclusions	65
IV. Estanyols d'en Cisó i el Vilar (Girona)	67
IV.1 Introducció	68
IV.1.1 Zona càrstica de Banyoles	68
IV.1.1.1 Estudis a l'estanyol d'en Cisó	68
IV.1.1.2 Estudis a l'estanyol del Vilar	70
IV.2 Objectius	71
IV.3 Resultats	73
IV.3.1 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics	73
IV.3.2 Extracció d'ADN	78
IV.3.3 Amplificació per PCR dels gens procariòtics dels 16S ARNr	78
IV.3.4 16S ADN _r -RFLP	79
IV.3.5 Anàlisi de dades	81
IV.4 Discussió	90
IV.5 Conclusions	95

V. Experiment teoricopràctic	97
V.1 Introducció	98
V.2 Objectius	99
V.3 Resultats	100
V.3.1 Anàlisi teòrica	100
V.3.1.1 Estimacions teòriques	101
V.3.1.2 16S ADNr-RFLP	103
V.3.2 Anàlisi experimental	103
V.3.2.1 16S ADNr-RFLP de cultius bacterians purs	104
V.3.2.2 16S ADNr-RFLP de mescles bacterianes	105
V.4 Discussió	108
V.5 Conclusions	111
VI. Llac Gran d'Estanya (Osca)	113
VI.1 Introducció	114
VI.2 Objectius	116
VI.3 Resultats	117
VI.3.1 Caracterització microscòpica	117
VI.3.2 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics	119
VI.3.3 Extracció d'ADN	121
VI.3.4 PCR-RFLP	122
VI.3.5 PCR-DGGE	126
VI.3.6 Anàlisi de dades	133
VI.3.7 FISH	134
VI.4 Discussió	140
VI.5 Conclusions	145
VII. Discussió general	147
VIII. Conclusions generals	155
IX. Bibliografia	161
X. Annexos	181

RESUM

En aquest treball s'han estudiat diferents sistemes estratificats, un de bentònic (tapissos microbians del delta de l'Ebre) i tres de planctònics (estanyols d'en Cisó i el Vilar i el llac Gran d'Estanya), mitjançant l'ús combinat de tècniques de microbiologia moleculars (RFLP, DGGE i FISH) i clàssiques (microscòpia òptica i anàlisi dels paràmetres fisicoquímics). L'aplicació de les tècniques moleculars ens ha permès demostrar que genèticament hi ha variacions, tant en fondària com al llarg del temps, en l'estructura i la dinàmica de les poblacions microbianes que habiten en aquests ecosistemes. Les tècniques clàssiques aplicades, en canvi, s'han emprat per a relacionar aquests canvis genètics amb les fluctuacions ambientals i biològiques.

Inicialment, es va determinar la distribució en fondària i al llarg del temps de diferents paràmetres fisicoquímics que s'estableixen en els sistemes estratificats estudiats. A continuació, es van caracteritzar mitjançant microscòpia òptica el gruix, el color i les poblacions dominants presents en cadascuna de les laminacions dels tapissos microbians. De la mateixa forma, al llac Gran d'Estanya es van descriure les poblacions dominants presents en les diferents fondàries. L'anàlisi preliminar de tots els sistemes estratificats estudiats ens va permetre demostrar que, en general, les condicions i les poblacions dominants es mantenen força semblants a les descrites en treballs anteriors. Posteriorment, es dugué a terme l'anàlisi molecular amb tècniques de caracterització genètica (RFLP i DGGE) i d'hibridació *in situ* (FISH), basades en l'estudi dels 16S ADNr i 16S ARNr, respectivament.

En cadascuna de les laminacions i fondàries dels diferents sistemes estratificats estudiats, els gens dels 16S ARNr foren amplificats per PCR amb encebadors universals per als dominis *Bacteria* i *Archaea*. El primer dels dominis es va trobar àmpliament distribuït en tots els sistemes estratificats i es va detectar al llarg de totes les laminacions i fondàries estudiades. En canvi, el domini *Archaea* presentava una distribució més heterogènia i es detectava en el sediment negre dels tapissos microbians i en les fondàries dels llacs on les concentracions de sulfur d'hidrogen eren més elevades. A l'estanyol del Vilar i al llac Gran d'Estanya, a més, es van detectar membres d'aquest darrer domini en algunes fondàries de la part oxigènica.

Seguidament, els productes de la PCR van ser digerits amb enzims de restricció d'alta freqüència de tall (*AluI*, *HinI* i *RsaI*) i es van analitzar els patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians obtinguts per electroforesi en cadascun dels sistemes estratificats.

Aplicant els mètodes UPGMA i MDS, la similitud entre els patrons dels 16S ADNr-RFLP ens va permetre obtenir les corresponents matrius a partir de les quals es va poder concloure que les mostres presentaven una distribució estacional en tots els sistemes estudiats, exceptuant les del llac Gran d'Estanya. Malgrat aquest fet, les diferències estacionals quant al nombre de fragments de restricció només foren estadísticament significatives als tapissos microbians del delta de l'Ebre i a l'estanyol del Vilar. En tots els sistemes estratificats estudiats, les diferents submostres es van subagrupar, majoritàriament, en funció de dos paràmetres abiòtics, la llum i la presència d'oxigen.

Una vegada visualitzats els patrons de restricció, s'observà que els obtinguts en el període de barreja al llac Gran d'Estanya mostraven una gran similitud amb els de la part més fonda del llac en el període d'estratificació. Per a corroborar aquesta observació, es va decidir aplicar al llac Gran d'Estanya un altra tècnica de caracterització genètica: la DGGE. Els patrons resultants dels 16S ADNr-DGGE, igual que els dels 16S ADNr-RFLP, van confirmar aquesta similitud. L'aplicació d'aquesta tècnica, a més a més, ens va permetre obtenir una visió general de la diversitat bacteriana per escissió i seqüenciació de les bandes dominants. Les seqüències obtingudes foren afiliades dintre dels quatre filums del domini *Bacteria*: *Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), *Proteobacteria* (classes α i β) i *Chlorobi*. L'anàlisi de les seqüències obtingudes demostrà que les diferències espacials eren degudes a variacions de les poblacions bacterianes dominants (*Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* i α -*Proteobacteria*) detectades en cadascuna de les fondàries del llac. En canvi, les diferències estacionals existents eren degudes, principalment, a l'aparició del grup β -*Proteobacteria* a l'hivern i a l'aparició de *Chlorobi* a l'estiu.

Al llac Gran d'Estanya, a més de la informació qualitativa obtinguda amb les tècniques de caracterització genètica, per primera vegada s'ha estudiat quantitativament com es distribueixen en fondària i al llarg del temps les poblacions d'organismes actius mitjançant l'aplicació de la hibridació *in situ*. Tot i estar limitada per la presència de partícules de naturalesa inorgànica i per una elevada proporció d'organismes fototròfics autofluorescents, la informació obtinguda amb aquesta tècnica ens va permetre descriure canvis espaciotemporals de les poblacions bacterianes (sondes Eub338, Non338, Srb338, Dsv698, Dss658, Alf968, Bet42a i Gam42a) i d'*Archaeas* (sonda Arch915) analitzades. Els percentatges d'hibridació obtinguts pel domini *Bacteria* foren superiors en la part superficial del llac en el període

d'estratificació, mentre que el domini *Archaea* fou més abundant en la part més fonda del llac del mateix període. Pertanyents al domini *Bacteria*, i detectats en ambdós períodes de l'any estudiats, la distribució dels percentatges d'hibridació dels bacteris sulfatoreductors i dels α -, β - i γ -*Proteobacteria* varià en fondària. La comparació entre els percentatges d'hibridació obtinguts i els patrons dels 16S ADNr-RFLP determinà que, en alguns casos, tot i haver-hi diferències quantitatives, aquestes no es reflectien qualitativament.

Finalment, per a esbrinar com podien quedar afectats els RFLP obtinguts en mostres naturals per dos factors que influencien l'eficiència de la PCR, la presència de mals aparellaments entre els encebadors i les seqüències diana d'aquests i el diferent nombre d'operons d'ADNr, es va desenvolupar una aproximació teoricopràctica. Amb aquest propòsit, es van seleccionar quatre soques bacterianes de les quals es coneixien ambdós paràmetres i es van analitzar els RFLP de diferents mesclades. Els resultats obtinguts van demostrar que tots dos factors contribuïen significativament a l'hora d'obtenir els perfils genètics. D'aquesta forma, un nombre alt d'operons d'ADNr permetia una eficiència de detecció més gran, i un grau d'homologia més baix entre els encebadors i les seves seqüències diana implicava una disminució d'aquesta.



<http://www.iscifi.es>



<http://www.fisio.buap.mx>



<http://www.drpez.com>



LAB M, International Diagnostics Group plc.



LAB M, International Diagnostics Group plc.

I. Introducció

I.1 Diversitat microbiana, un enigma sense resoldre

I.2 Caracterització d'ecosistemes naturals: mètodes microbiològics clàssics i moleculars

I.3 16S ARNr, cronòmetre evolutiu

I.4 Tècniques de biologia molecular aplicades en estudis d'ecologia microbiana

I.4.1 Anàlisi qualitativa d'una comunitat

I.4.1.1 Extracció d'àcids nucleics

I.4.1.2 Anàlisi dels extractes d'ADN

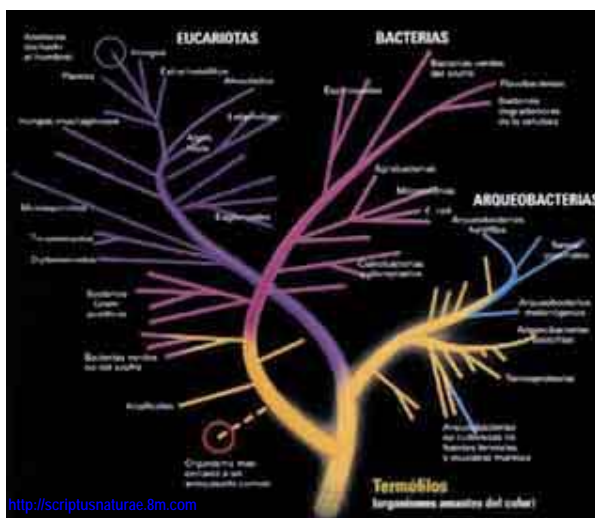
I.4.1.2.1 Anàlisi total de la comunitat

I.4.1.2.2 Anàlisi parcial de la comunitat

I.4.1.3 Anàlisi dels extractes d'ARN

I.4.2 Anàlisi quantitativa d'una comunitat

I.4.2.1 FISH



<http://scriptusnaturae.8m.com>

El descobriment dels microorganismes procariotes es remunta al segle XVII. Més tard, quan Robert Koch i Albert Neisser van demostrar que els bacteris eren els causants de diferents malalties, es va posar de manifest la gran importància d'obtenir cultius axènics o purs dels bacteris implicats en aquestes malalties, per a poder-los així aïllar i caracteritzar. L'ús de medis de cultiu sòlids, obtinguts inicialment per Koch l'any 1881 amb talls asèptics de patata i gelatina i un any després per Fannie i Hesse amb un polisacàrid derivat de les algues vermelles anomenat *agar*, i/o de medis líquids va permetre aconseguir aquesta fita i va ser la base per al desenvolupament de la taxonomia bacteriana, la genètica, l'ecologia, la fisiologia i d'altres disciplines relacionades. Com a conseqüència d'aquests fets i de molts altres no esmentats, va ser a finals del segle XIX que la microbiologia va consolidar-se com a ciència (<http://www.asmtusa.org/mbrsrc/archive/SIGNIFICANT.htm>).

La composició del medi i les condicions fisicoquímiques de temperatura, pH, disponibilitat d'aigua, llum, la presència o absència d'oxigen, etc. en les quals es mantenen els cultius determinen el tipus de bacteri capaç de créixer. D'aquesta manera, variant la composició i/o les condicions de creixement d'un medi, podem obtenir un aïllament selectiu de bacteris. Per exemple, els bacteris fototròfics anoxigènics verds i vermells del sofre creixen en un medi similar, però diferències de pH i de quantitat de llum ens permetran aïllar els uns o els altres (Pfennig i Trüper, 1981 i 1992a-b). És més, la variació de les concentracions de sulfur d'hidrogen (H₂S) i de la font de carboni del medi pot fer fins i tot que el grau de selecció sigui de nivell d'espècie (Pfennig i Trüper, 1981 i 1992a-b). Així doncs, els medis de cultiu sembla que són adequats a l'hora d'aïllar diferents tipus de bacteris, però, a la vegada, aquesta característica els fa vulnerables a l'anomenada *gran anomalia del recompte en placa* (Great Plate Count Anomaly) (Amann *et al.*, 1995): els recomptes directes dels organismes fets al microscopi no coincideix mai amb els recomptes realitzats en placa (Roszak i Colwell, 1987).

La raó d'aquesta anomalia és que els bacteris poden ser tant viables com no viables depenent de si la seva membrana està intacta o danyada (Grégori *et al.*, 2001). A la vegada, els viables poden ser actius, cultivables o no cultivables, o inactius davant una determinada activitat enzimàtica i/o metabòlica. Per tant, l'explicació que el nombre total de bacteris no coincideixi amb els recomptes en placa és deguda al fet que només una mínima part del total dels bacteris creixen en cultiu, els actius cultivables. Així doncs, l'anomalia del recompte en placa pot ser deguda, principalment, a: unes condicions de cultiu que no són les més adequades per al creixement de determinats bacteris (Aagot *et al.*, 2001; Bull *et al.*, 2000), la conversió de bacteris cultivables a l'estat no cultivable (Grey i Steck, 2001; Olivier *et al.* 1991; Roszak *et al.*, 1984), la manca de mètodes d'aïllament vàlids (LaRivière *et al.*, 1991) i la presència de bacteris endosimbionts o ectosimbionts no cultivables en placa (Drozanski, 1991; Görtz, 1986).

I.1 Diversitat microbiana, un enigma sense resoldre

Fins a la dècada passada, la majoria d'esforços per cultivar bacteris en medis de cultiu havien estat enfocats a l'estudi d'organismes aerobis i de patògens humans, per la qual cosa no era sorprenent que no es conegués la major part d'organismes no cultivables dels ambients no associats a aquests àmbits.

El 1978 Hoppe va determinar que organismes actius metabòlicament, els quals representaven la microbiota marina predominant, no creixien en medi sòlid i estimava que els bacteris cultivables representaven tan sols entre un 0,01-12,5% dels bacteris viables de la població. Més tard, altres autors asseguraven que al voltant del 10% del total dels bacteris trobats en la natura havien estat cultivats (Somerville *et al.*, 1989). D'altres afirmaven que més del 99,9% de bacteris marins i del sòl no eren cultivables (Amann *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1990). Actualment, l'estimació de la diversitat total d'espècies bacterianes presents en la natura és d'aproximadament 10^6 - 10^7 (Cowan, 2000), i només són cultivables entre l'1-12% del total (taula I-1) (Bull *et al.*, 1992). Aquest percentatge, a més, és molt variable segons la naturalesa de la mostra que es vol estudiar (taula I-2) (Amann *et al.*, 1995).

Taula I-1. Diversitat microbiana descrita per Bull (1992) i modificada per Cowan (2000)

Grup	Espècies totals estimades	Espècies conegudes ^b	Proporció (%) de les conegudes vs. totals
Virus	130.000 ^a	5.000	[4] ^c
Archaea	? ^d	<500	?
Bacteris	40.000 ^a	4.800	[12]
Fongs	1.500.000	69.000	5
Algues	60.000	40.000	67

^a, Valors subestimats, probablement entre 1-2 ordres de magnitud. ^b, Valors de mitjans dels anys noranta que augmentaran entre un 10-50%. ^c, Valors molt subestimats. ^d, Valors molt més grans que els indicats en estudis d'ecologia microbiana cultivodependents

Mostra	Proporció (%) de bacteris cultivables
Aigua salada	0,001-0,1
Aigua dolça	0,25
Llac mesotròfic	0,1-1
Estuari no contaminat	0,1-3
Fangs actius	1-15
Sediments	0,25
Sòl	0,3

Taula I-2. Proporció de bacteris cultivables en mostres terrestres i aquàtiques (Amann *et al.*, 1995)

I.2 Caracterització d'ecosistemes naturals: mètodes microbiològics clàssics i moleculars

Per a comprendre la dinàmica i l'estabilitat d'un ecosistema natural és necessari estudiar-ne l'estructura, l'activitat i la funció de les poblacions microbianes que l'integren (Lee *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1997).

Fins a la dècada dels noranta, la majoria d'estudis de les comunitats microbianes presents en ecosistemes naturals es van basar en mètodes de caracterització clàssics (Busse *et al.*, 1996). La principal limitació d'aquests mètodes era que tan sols podien ser utilitzats amb bacteris prèviament aïllats i cultivats. La selectivitat dels medis de cultiu descrita anteriorment i la gran complexitat de la majoria d'ecosistemes naturals, afavorida per l'àmplia gamma de nutrients i per la fluctuació dels paràmetres fisicoquímics que s'hi troben, determinaren que la majoria d'estudis realitzats fins llavors fossin incomplets, ja que la identificació i la funció dels bacteris no cultivables, els quals representaven la major part del total dels bacteris presents en la comunitat, eren ignorades, desconegudes o subestimades. No obstant això, tot i les seves limitacions, l'aplicació d'aquests mètodes clàssics va permetre caracteritzar les poblacions microbianes presents en els ecosistemes naturals.

Posteriorment, i complementàries a aquestes tècniques clàssiques, s'han descrit i aplicat tècniques moleculars, les quals permeten analitzar i comparar la composició, activitat i estructura de les comunitats microbianes, incloent-hi la part cultivable i la no cultivable. En funció de la molècula que es vulgui analitzar, les tècniques moleculars emprades actualment són molt diverses (Busse *et al.*, 1996). Entre aquestes trobem l'anàlisi d'àcids grassos (Macarrón, 1998; Ritchie *et al.*, 2000; Spring *et al.*, 2000), lípids polars, quinones (Hiraishi *et al.*, 1999), poliamines, diaminoàcids, àcids micòlics, sucres totals, patrons de proteïnes i lipopolisacàrids (LPS) en gels d'electroforesi de poliacrilamida (PAGE), polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció (RFLP) (Weidner *et al.*, 1996), ADN genòmic en gels d'electroforesi en camp polsant (PFGE) (Méndez-Álvarez *et al.*, 1996), ADN polimòrfic amplificat a l'atzar (RAPD) (Méndez-Álvarez *et al.*, 1998), detecció de bacteris per hibridació *in situ* utilitzant sondes marcades amb radioactivitat o fluorescència (Amann *et al.*, 1990; Zarda *et al.*, 1997), hibridació ADN-ADN (Voordouw *et al.*, 1991) i ADN-ARNr (De Vos i De Ley, 1983), anàlisi dels gens de l'àcid ribonucleic ribosomal 16S (16S ARNr) i seqüenciació (Barns *et al.*, 1996; Dojka *et al.*, 2000; Nübel *et al.*, 2001). Entre

totes aquestes possibles molècules que permeten els estudis moleculars, destaca la gran importància que ha tingut el 16S ARNr com a base de molts estudis d'ecologia microbiana (Olsen *et al.*, 1986).

I.3 16S ARNr, cronòmetre evolutiu

L'evolució biològica es produeix en quedar fixades diferents mutacions en espècies diferents. Aquests canvis mutacionals estables, fixats en l'ADN que codifica per a una determinada molècula, determinen que poblacions amb un avantpassat comú es distancii evolutivament. Així doncs, la distància evolutiva existent entre dues espècies es pot mesurar per les diferències en la seqüència d'aminoàcids o nucleòtids entre molècules homòlogues de les dues espècies (Madigan *et al.*, 1997).

Perquè una molècula sigui un bon cronòmetre filogenètic cal que doni una mesura real del canvi evolutiu. Per aquest motiu, un cronòmetre ideal compliria els requisits següents: distribució universal dintre del grup objecte d'estudi, funció homòloga o idèntica, fàcil d'alinejar per poder identificar les regions amb seqüències conservades i les que presenten variabilitat i, finalment, que la freqüència de canvi de la seqüència de la molècula escollida tingui una relació directa amb la distància evolutiva mesurada (Madigan *et al.*, 1997). Amb la finalitat de trobar aquest cronòmetre evolutiu, Woese i Fox (1977) van començar a investigar la filogènia dels procariotes classificant-los mitjançant l'ARNr, com a alternativa a l'anàlisi d'ADN, perquè és una molècula que presenta tots els requisits descrits per a un cronòmetre filogenètic adequat. Entre els diferents ARNr procariòtics [5S (120 nucleòtids), 16S (1.500 nucleòtids) i 23S (3.000 nucleòtids)], van proposar l'ús de les molècules d'ARNr més llargues, 16S o 23S, ja que la informació obtinguda és, a diferència del 5S, suficient i fiable per a realitzar estudis de filogènia i de diversitat basats en l'anàlisi comparativa de les seqüències en les bases de dades (Olsen *et al.*, 1986; Fox *et al.*, 1977) (<http://rdpwww.life.uiuc.edu>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>).

Inicialment, l'anàlisi comparativa de diferents 16S ARNr va demostrar que era un sistema de classificació dels bacteris més útil que el basat en els caràcters fenotípics i, a més a més, que la història de la vida es podia dividir en tres línies primàries o dominis anomenats actualment *Archaea*, *Bacteria* i *Eucarya* (Woese i Fox, 1977). Una anàlisi més exhaustiva i àmplia dels 16S ARNr va demostrar posteriorment que dintre dels diferents dominis hi havia agrupacions de bacteris anomenades *divisions*, i fins aleshores van ser dotze les divisions trobades en el domini *Bacteria* (Woese, 1987).

Després de ser descrita per Saiki i col·laboradors (1988) la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), es van desenvolupar tècniques moleculars noves que, a diferència de les descrites anteriorment, no es basaven en la comparació directa de les molècules de 16S ARNr. Entre aquestes hi havia les que amplificaven els gens (ADN) que codificaven pels 16S ARNr i les que permetien la seqüenciació genòmica i l'anàlisi posterior de les seqüències. El desenvolupament de totes aquestes tècniques va contribuir que hi hagués un augment dels estudis no cultivodependents i que fins a l'any 1998 hi hagués descrites 36-40 divisions filogenètiques dintre del domini *Bacteria*, entre les quals hi ha actualment més de 76.000 seqüències de 16S ARNr (figura I-1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hi ha divisions bacterianes, amb pocs o sense cap membre cultivable, que es troben àmpliament distribuïdes i semblen dominants en alguns ambients (Dojka *et al.*, 2000). L'obtenció de dades fisiològiques d'aquests membres no cultivables és difícil però la seva identificació representa, entre altres coses, un gran potencial en possibles aplicacions biotecnològiques (Bull *et al.*, 2000; Eschenfeldt *et al.*, 2001).

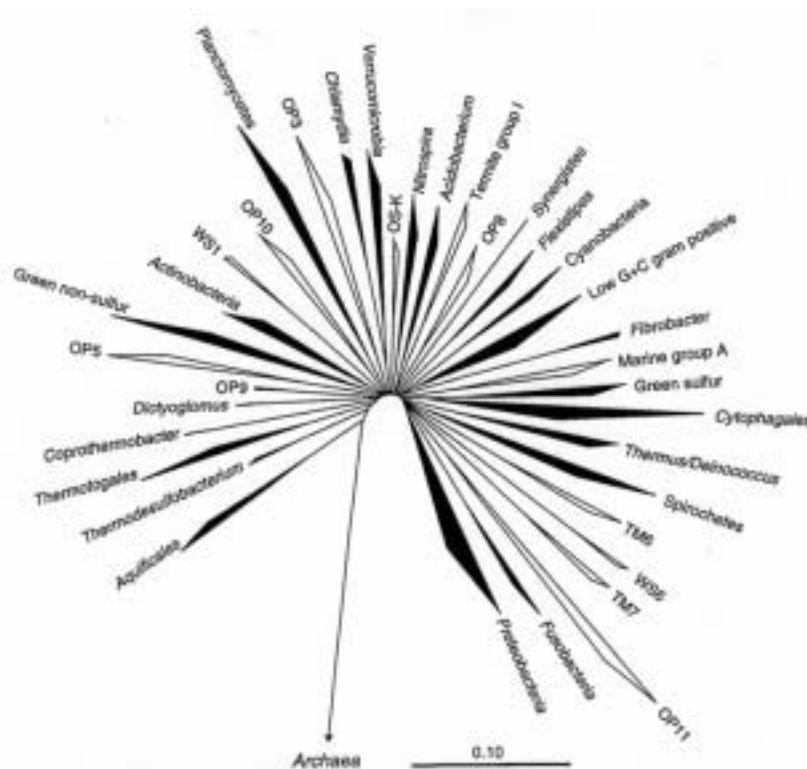


Figura I-1. Arbre de la distància evolutiva del domini *Bacteria*. Les divisions amb bacteris cultivables estan marcades en negre i les divisions amb bacteris no cultivables estan marcades en blanc. L'escala de la barra indica 0,1 canvis per nucleòtid (Hugenholtz *et al.*, 1998)

1.4 Tècniques de biologia molecular aplicades en estudis d'ecologia microbiana

Inicialment, les tècniques moleculars de caracterització genètica van ser desenvolupades per discriminar i identificar soques bacterianes pures. Posteriorment, aquestes tècniques es van adaptar a

l'estudi dels ecosistemes naturals, on hi ha una mescla complexa de seqüències, cosa que permet obviar els possibles errors derivats del cultiu dels bacteris. Les principals tècniques de biologia molecular emprades actualment en estudis d'ecologia microbiana en ambients naturals es mostren en la figura I-2 (Head *et al.*, 1998). Mentre que la majoria de tècniques moleculars utilitzen els àcids nucleics (ADN i/o ARN) per dur a terme l'anàlisi qualitativa d'una comunitat, la detecció dels 16S ARNr mitjançant la fixació cel·lular i la hibridació amb sondes marcades ens permet obtenir-ne informació quantitativa. L'anàlisi directa del conjunt d'àcids nucleics o *extracte*, on majoritàriament trobem ADN, encara que també s'hi troba ARN, permet obtenir informació qualitativa del total analitzat de la comunitat. En canvi, l'amplificació de fragments específics d'ADN per PCR o d'ARN per transcripció reversa (RT-PCR), els quals poden ser posteriorment clonats i seqüenciats o bé analitzats mitjançant tècniques de caracterització o *fingerprinting* genètica, només permet analitzar parcialment la mostra d'aquesta comunitat. Finalment, amb l'enriquiment i aïllament previs en cultiu dels organismes presents en la comunitat, l'aplicació de tècniques moleculars també permet la seva caracterització genètica i/o identificació, encara que, tal com ja s'ha dit anteriorment, aquesta anàlisi resultarà parcial, ja que només serà dels organismes cultivables.

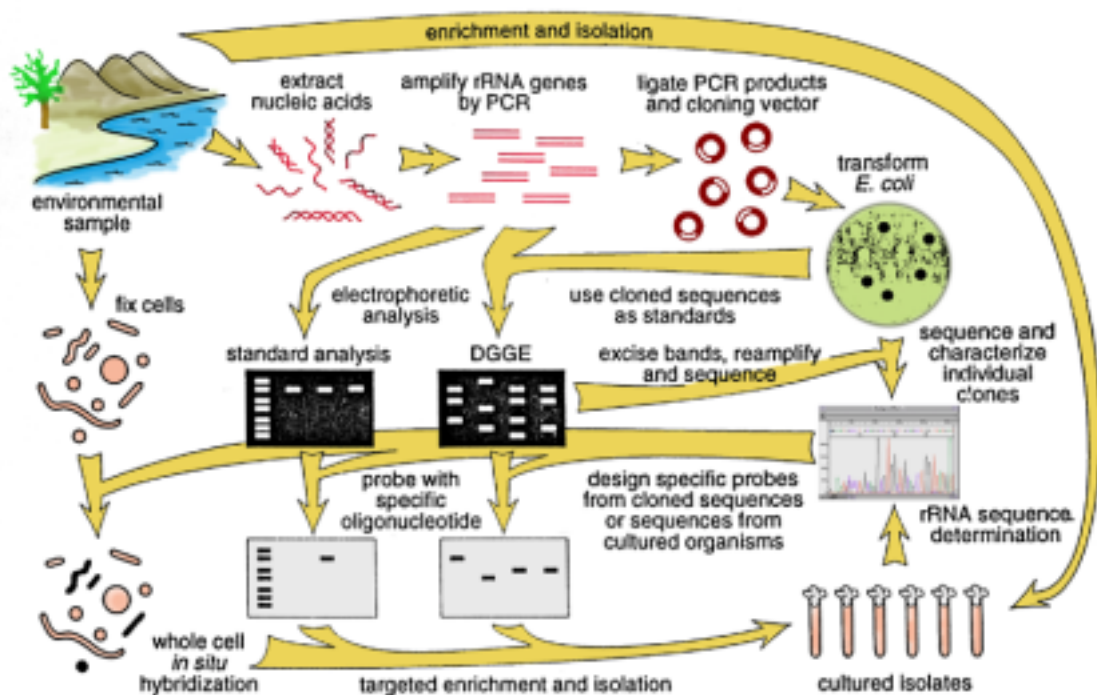


Figura I-2. Tècniques de biologia molecular emprades en estudis d'ecologia microbiana (Head *et al.*, 1998)

I.4.1 Anàlisi qualitativa d'una comunitat

I.4.1.1 Extracció d'àcids nucleics (ADN i/o ARN)

L'extracció dels àcids nucleics es pot realitzar mitjançant mètodes directes i indirectes (Leff *et al.*, 1995). En els mètodes directes, els àcids nucleics són extrets directament de la mostra juntament amb tots els elements que constitueixen la matriu (partícules de sòl, etc.) (Chandler *et al.*, 1997; Ranjard *et al.*, 2000). En canvi, en els mètodes d'extracció indirectes els bacteris són trencats i els àcids nucleics extrets, separant prèviament la resta de la matriu (Carsten *et al.*, 1992; Jacobsen *et al.*, 1992; Pillai *et al.*, 1991). La selecció del mètode d'extracció dels àcids nucleics depèn del tipus de mostra inicial de la qual es parteix. Així doncs, hi ha descrits diferents mètodes d'extracció, per a mostres d'aigua (Weidner *et al.*, 1996), sediments (Jackson *et al.*, 1997), sòls (Hurt *et al.*, 2001; Kuske *et al.*, 1997), tapissos microbians (Moyer *et al.*, 1994), etc. Els mètodes indirectes són utilitzats sobretot en mostres d'aigua, on s'extreu l'ADN separant prèviament les cèl·lules per centrifugació o per filtració, mentre que en la resta de casos solen utilitzar-se mètodes directes.

L'extracció d'àcids nucleics es pot realitzar mitjançant tractaments físics, químics o per combinació d'ambdós. Entre els tractaments físics destaquen la congelació-descongelació successiva de la mostra i l'ús de l'anomenat *bead-beater* per a facilitar el trencament de la paret cel·lular dels bacteris (Chandler *et al.*, 1997; Van Elsas *et al.*, 1995; Yeates *et al.*, 1997). D'altra banda, els tractaments químics més habituals són l'ús de detergents i lisozim (Moré *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1996). No obstant això, el més freqüent és aplicar una combinació dels dos tipus de tractaments durant l'extracció per obtenir així un millor rendiment (Yeates *et al.*, 1997; Van Elsas *et al.*, 1995). A diferència de l'extracció de l'ADN, la petita grandària de la molècula d'ARN permet aplicar tractaments físics més dràstics, ja que no existeix tant perill de trencament de la molècula (Leff *et al.*, 1995; Moran *et al.*, 1993).

El procés d'extracció dels àcids nucleics es considera un pas crític on s'ha d'eliminar la presència de compostos indesitjables associats a la mostra. Entre aquests hi ha compostos coneguts pel fet de ser potents inhibidors de l'enzim *Taq* polimerasa utilitzat en la PCR, reduir la sensibilitat de la PCR, ser potents inhibidors o reductors de l'eficiència d'enzims de restricció, reduir l'eficiència de transformació i l'especificitat de la hibridació amb ADN (Chandler *et al.*, 1997b; Moré *et al.*, 1994; Tebbe *et al.*, 1993; Tsai i Olson, 1992; Zhou *et al.*, 1996). Per a eliminar tots aquests compostos, i tenint en compte que un nombre elevat d'etapes de purificació pot reduir dràsticament l'eficiència de recuperació de l'ADN (Johnston *et al.*,

1996), és necessari tenir molta cura a l'hora de seleccionar el mètode d'extracció més adequat en funció de l'ambient natural que es vol analitzar.

En mostres on s'apliquen mètodes directes, principalment en sòls i sediments, durant o després del procés d'extracció dels àcids nucleics s'aplica gairebé sempre alguna etapa de purificació (Miller *et al.*, 1999). Entre les més habituals trobem: l'addició de polivinilpolipirrolidona (PVPP) o bromur d'hexadeciltrimetilamoni (CTAB) en el tampó d'extracció (Liu *et al.*, 1997; Moyer *et al.*, 1994), la precipitació selectiva d'ADN (Johnston *et al.*, 1996), la centrifugació amb gradient de densitat amb CsCl-Bromur d'etidi (Carsten *et al.*, 1992; Selenska-Pobell, 1995), l'electroelució (Chandler *et al.*, 1997b; Rochelle *et al.*, 1991), la cromatografia amb columnes d'hidroxiapatita (Buckley *et al.*, 1998), la filtració en gel (Sephadex G-200, Sepharose 4B, i Sephadex G-50) (Tsai i Olson, 1992), els gels d'electroforesi (Myrold *et al.*, 1995; Kuske *et al.*, 1997) i la dilució de l'ADN (Chandler *et al.*, 1997b; Wikström *et al.*, 1996). Actualment, l'extracció d'ADN i/o ARN mitjançant l'ús de d'equips comercials ha permès obviar les etapes addicionals de purificació necessàries, sobretot en extractes de sòl, sediment o fangs actius (Borneman *et al.*, 1996; Hurt *et al.*, 2001).

Un factor addicional a l'hora de seleccionar els mètodes d'extracció i purificació dels àcids nucleics és el tipus d'anàlisi que es vol fer *a posteriori*. Per exemple, l'anàlisi de l'estructura de la comunitat mitjançant les seqüències dels gens dels 16S ARNr per PCR cal fer-la amb ADN d'elevat pes molecular, d'aproximadament 23 kb, i amb un mètode que tingui una eficiència d'extracció alta (Kuske *et al.*, 1997).

I.4.1.2 Anàlisi dels extractes d'ADN

A partir de l'extracte d'ADN total d'una comunitat podem obtenir dos tipus diferents d'informació en funció de la tècnica aplicada (Ranjard *et al.*, 2000). D'una banda, s'obté informació total de la comunitat quan la investigació se centra en l'anàlisi de tot l'extracte d'ADN, per exemple, per fraccionament, hibridació creuada o desnaturalització tèrmica i reassociació de l'ADN total. D'altra banda, obtenim informació parcial de la comunitat quan la investigació se centra en l'anàlisi d'una part de l'extracte d'ADN, per exemple, de seqüències específiques del genoma amplificades per PCR.

I.4.1.2.1 Anàlisi total de la comunitat. S'investiga tota la informació genètica de l'extracte d'ADN. Cal remarcar que els errors associats al procés d'amplificació, i descrits en l'apartat I.4.1.2.2.1, no hi són presents quan s'analitza tot l'extracte. No obstant això, la necessitat de grans quantitats d'ADN total d'alta qualitat ($\geq 50 \mu\text{g}$), tant de puresa com d'integritat, i la possible coextracció d'ADN de cèl·lules bacterianes

vives i d'ADN contaminant (ADN extracel·lular, ADN de bacteris no viables, ADN de fongs o d'altres eucariotes) poden alterar el resultat final de l'anàlisi (Blum *et al.*, 1997). Entre les tècniques que ens permeten analitzar el total de la comunitat trobem:

– Hibridació creuada d'ADN genòmic. Es posa en contacte l'ADN total d'una comunitat, marcat fluorescentment o radioactivament, sobre un filtre amb un d'una altra comunitat. Després de realitzar tots els passos de la hibridació, el grau de marcatge ens indica com són de similars les poblacions bacterianes d'aquestes dues comunitats (Lee i Furhman, 1990). És un mètode que no permet detectar diferències entre poblacions que tenen un grau de similitud molt alt (Xia *et al.*, 1995). L'ADN fixat sobre un filtre es pot creuar també amb oligonucleòtids específics de grup, la qual cosa permet, entre d'altres, la identificació i quantificació específica del grup analitzat (Voordouw *et al.*, 1991).

– Desnaturalització tèrmica i reassociació d'ADN total. El que es mesura és la composició de les bases i la complexitat de l'ADN total d'una comunitat. A partir de l'anàlisi de les corbes de fusió de l'ADN, la composició de les bases se sol expressar com a percentatge en mols de guanina + citosina (% G+C). Quan el rang de distribució del % G+C de l'ADN d'una comunitat és estret, ens indica que hi ha poblacions dominants, mentre que si és ampli és indicatiu de la presència de molts grups bacterians. A més, pel que fa al gènere, el % G+C de l'ADN cromosòmic és característic per a molts grups bacterians, i l'abundància relativa d'ADN d'un determinat % G+C és un indicador de l'abundància relativa dels grups associats en la comunitat bacteriana estudiada (Holben i Harris, 1995). La complexitat s'estudia en ADN en solució mitjançant cinètiques de reassociació d'ADN obtingut per desnaturalització tèrmica sota condicions definides i mesurat amb l'espectrofotòmetre com l'increment d'absorbància de 260 a 275 nm. Llavors, la complexitat de l'ADN problema es pot comparar amb la complexitat d'un ADN conegut, com és el d'*Escherichia coli*, essent normalment un mínim de 200-250 vegades més gran la complexitat de l'ADN d'ambients naturals. La seva aplicació permet detectar variacions en la composició de les comunitats de mostres diferents (Torsvik *et al.*, 1998) o de la mateixa mostra abans i després de ser contaminada (McGrath *et al.*, 1995), amb la qual cosa es pot determinar el nombre de genomes bacterians diferents presents en les mostres i, per tant, es pot dir quina és la més diversa. No obstant això, la seva lentitud, la presència d'ADN contaminant i la manca de variació del % G+C en casos on s'ha demostrat que la composició microbiana és molt diferent respecte a la inicial, per addició d'algun contaminant a l'ambient, fan que el seu ús sigui molt limitat (Ranjard *et al.*, 2000; Torsvik *et al.*, 1998).

– Fraccionament d'ADN total dependent de la seva composició de bases utilitzant gradients de densitat. Es basa en la variació del contingut de G+C de l'ADN procariòtic, que oscil·la entre 24-76%

(Holben i Harris, 1995). S'afegeix un agent intercalant, bisbenzimidazole, el qual s'uneix preferentment a A+T i així amplia les diferències de gravetat de l'ADN segons la seva composició de G+C. Llavors, l'ADN extret se centrifuga en un gradient de clorur de calci, que proporciona un perfil característic, basat en la distribució de l'ADN segons el seu percentatge de G+C. Proporciona una visió general de l'estructura de la comunitat, cosa que permet detectar variacions en la composició de les comunitats bacterianes en ambients naturals (Nüsslein i Tiedje, 1999) i a més es pot obtenir el mateix tipus d'informació explicada anteriorment a partir de la distribució del % G+C de l'ADN de la comunitat.

I.4.1.2.2 Anàlisi parcial de la comunitat. La investigació se centra en l'anàlisi d'una part de l'extracte d'ADN, per exemple, de seqüències específiques del genoma amplificades prèviament per PCR. Les seqüències més comunament estudiades són els gens de l'operó ribosomal, especialment el gen *rrs* (16S ADN_r) i l'espaiador intergènic (IGS) 16S-23S entre els gens *rrs* i *rrl*. Aquests mètodes inclouen el clonatge i la seqüenciació o bé la caracterització genètica de fragments obtinguts per PCR. Avui dia són les més utilitzades perquè permeten estudiar la diversitat, l'estructura genètica i l'abundància relativa de les espècies que integren la comunitat.

I.4.1.2.2.1 PCR: amplificació dels gens dels 16S ARNr. La PCR consta de tres etapes: i) la fusió, a temperatures normalment d'entre 90-95 °C, d'ADN de doble cadena (ADN_{dc}) per a obtenir-ne de cadena senzilla (ADN_{cs}); ii) la unió dels encebadors (15-25 nucleòtids) a l'ADN_{cs} motlle, on la temperatura de l'etapa depèn de la seqüència dels encebadors, també anomenats *primers* o oligonucleòtids; iii) l'allongament d'ADN_{cs} motlle, a temperatures normalment d'entre 70-74 °C, per a obtenir còpies d'ADN_{dc}. Per repetició de les tres etapes anteriors durant 20-40 cicles podem obtenir una quantitat exponencial d'ADN de cadena doble. Al final és característic, i molts cops indispensable, realitzar una etapa de 7-10 minuts amb la temperatura utilitzada en la tercera etapa perquè les cadenes no acabades puguin finalitzar la seva síntesi (Acinas *et al.*, 1997; Martínez-Murcia *et al.*, 1995).

L'eficiència d'amplificació de la PCR depèn de molts factors a causa de les moltes limitacions que té la tècnica (Wilson, 1997; Wintzingerode *et al.*, 1997). La llargada i concentració de l'ADN diana, el grau d'homologia entre els encebadors i la seqüència diana i el nombre de còpies d'aquesta (Suzuki *et al.*, 1996; Farrelly *et al.*, 1995) fan que es desestimïn o se sobrevalorin determinades espècies. Altres desavantatges que hi trobem són: l'amplificació inespecífica per excés de *Taq* polimerasa o concentració d'encebadors, l'amplificació de poc producte per poca quantitat d'enzim o massa ADN diana (Chandler *et al.*, 1997a), l'obtenció de *primers-dimers* en la mescla de la reacció per mala elecció o elevada concentració d'encebadors (Blanc *et al.*, 1997), la mala elecció de la temperatura d'unió dels encebadors a

l'ADNcs motlle i del nombre de cicles, la inhibició de la reacció per presència d'àcids húmics i derivats fenòlics, la difícil quantificació del producte de la PCR per comparació amb quantitats d'ADN conegudes (Degrange i Bardin, 1995), l'amplificació selectiva de determinades seqüències on hi ha petites diferències en les regions universals conservades quan la unió dels encebadors es fa a elevada astringència (Head *et al.*, 1998), l'amplificació preferent de les seqüències més abundants (Ward *et al.*, 1992), l'amplificació discriminatòria de l'ADN motlle amb un alt % G+C deguda a la baixa eficiència de separació de les cadenes durant el pas de desnaturalització de la PCR (Reysenbach *et al.*, 1992), la formació de productes quimèrics (30-35% dels productes generats durant la coamplificació de motlles semblants) per unió de dues seqüències diferents durant l'amplificació d'aquestes (Liesack *et al.*, 1991; Wang i Wang, 1996), etc. No obstant això, actualment, la majoria de les tècniques no cultivodependents basades en la PCR són les més utilitzades en l'àmbit de l'ecologia microbiana.

Els encebadors utilitzats durant el procés d'amplificació de l'ADN se sintetitzen a partir d'estudis teòrics basats en l'alineament i la comparació de les zones conservades de seqüències presents en les bases de dades, com ho poden ser les dels 16S ARNr. L'alineament i la comparació de les seqüències dels 16S ARNr dels diferents dominis, grups, famílies, gèneres, espècies, etc. descrites ens determinaran l'especificitat dels encebadors i, per tant, de la PCR (Marchesi *et al.*, 1998). Inicialment, estudis realitzats en mostres d'ambients naturals demostren que en aquestes hi ha moltes seqüències desconegudes fins al moment dels gens dels 16S ARNr, la qual cosa corroborava que en les bases de dades, on gairebé el total de seqüències s'havien obtingut a partir de cultius axènics, no hi havia una representació bona de la diversitat bacteriana present en la natura. Així doncs, es demostrava l'error sistemàtic produït en estudis on s'utilitzen mètodes cultivodependents respecte a estudis on s'utilitzen mètodes no cultivodependents.

L'aplicació d'aquesta tècnica ha permès detectar bacteris presents en mostres naturals a concentracions molt baixes (0,3 pg d'ADN diana o de 1-100 bacteris en 100 g de mostra), siguin o no cultivables (Pillai *et al.*, 1991; Steffan i Atlas, 1991). A més, s'ha emprat per detectar específicament bacteris indicadors de determinades malalties (Baudart *et al.*, 2000), diferenciar bacteris no manipulats dels manipulats genèticament en ambients complexos (Steffan i Atlas, 1991), aïllar i clonar seqüències d'ADN específiques (Kowalchuk *et al.*, 1997), relacionar filogenèticament espècies diferents (Yamamoto *et al.*, 1998), detectar gens o activitats metabòliques de diferents grups bacterians presents en la natura (Eschenfeldt *et al.*, 2001; Lai-King *et al.*, 1997), etc.

1.4.1.2.2 Clonació i caracterització dels 16S ADNr amplificats per PCR. A partir de l'extracte d'ADN total de cultius o mostres naturals, els gens dels 16S ARNr es poden amplificar per PCR, clonar

dintre de vectors i després fer llibreries. Els clons obtinguts poden caracteritzar-se genèticament per anàlisi del polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció (RFLP), i així es poden agrupar pel grau de similitud o dissimilitud existent entre ells, i es poden seqüenciar per a identificar-los (Moyer *et al.*, 1994; Vaneechoutte *et al.*, 1992).

I.4.1.2.2.3 Caracterització genètica. Ens proporciona un patró genètic de la comunitat, basant-se en la separació física dels àcids nucleics d'espècies diferents prèviament amplificats per PCR, sense la necessitat de construir llibreries gèniques. En funció dels encebadors seleccionats per fer l'estudi, podem caracteritzar genèticament la comunitat en conjunt o un grup bacterià determinat d'aquesta comunitat. El gran avantatge d'aquestes tècniques és la seva utilitat quan es volen comparar comunitats bacterianes, canvis sobtats d'aquestes comunitats per addició de tòxics, metalls pesants, canvis genètics deguts a fluctuacions ambientals, etc. En contraposició, no ens donen informació en termes d'abundància de les espècies ni de la seva composició. La distribució de les bandes s'ha d'interpretar amb molta cura, ja que una banda pot ser la conseqüència de diferents espècies, sobretot quan s'analitzen espècies amb seqüències ribosomals molt semblants, i una mateixa espècie pot donar més d'una banda degut a l'heterogeneïtat dels gens dels 16S ARNr (Nübel *et al.*, 1996). La caracterització genètica es du a terme per amplificació de determinades seqüències i la resolució d'aquestes per migració diferencial electroforètica en gels d'agarosa o poliacrilamida, segons la seva grandària (ARDRA, anàlisi de restricció d'ADNr amplificat; T-RFLP, terminal RFLP; RISA, anàlisi de l'espaiador intergènic ribosomal) o de la seva seqüència (DGGE, gel d'electroforesi amb gradient desnaturalitzant; TGGE, gel d'electroforesi amb gradient de temperatura). Els patrons complexos de bandes obtinguts solen ser analitzats en termes de similitud o dissimilitud i ser representats en dendrogrames. No obstant això, l'anàlisi de components principals (ACP) o d'escala multidimensional (MDS) pot ser útil a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts i poder correlacionar els patrons amb fonts de variació externes (Borneman *et al.*, 1996).

a) Anàlisi de restricció d'ADNr amplificat (ARDRA). Genèricament anomenada RFLP, fou descrita per Lazo (1987). A partir d'ADN total d'una comunitat microbiana s'amplifica una determinada regió amb l'ajut d'encebadors universals (16S ADNr, d'espaiadors dels transcrits interns d'ADNr, de fragments terminals dels 16S ADNr, etc.) i es talla amb un o més enzims tetramèrics d'alta freqüència de tall (Vaneechoutte *et al.*, 1992). Els fragments de restricció obtinguts se separen per electroforesi en gels de poliacrilamida o d'algun tipus especial d'agaroses, com són la NuSieve o la MetaPhor (FMC Bioproducts), els quals permeten resoldre fragments molt petits. Aquesta tècnica ens permet identificar poblacions bacterianes per hibridació amb sondes específiques sobre els patrons genètics obtinguts i realitzar estudis de dinàmiques de poblacions bacterianes en ambients naturals (Busse *et al.*, 1996; Vaneechoutte *et al.*,

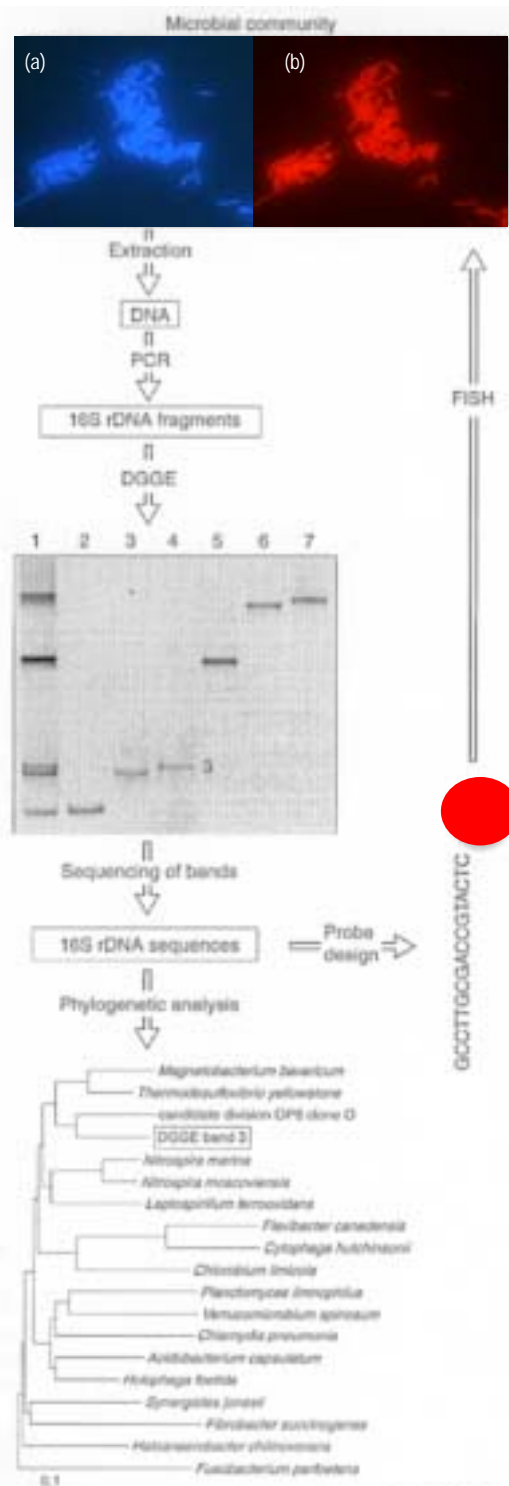
1992). Un pas molt crític és l'elecció dels enzims de restricció, ja que de la seva seqüència diana depenen els resultats o perfils obtinguts. Així doncs, la necessitat de provar bateries d'enzims diferents per obtenir resultats discriminatoris i, per tant, no dubtosos i per tenir una bona resolució es fa palpable (Acinas *et al.*, 1997).

b) T-RFLP (terminal-RFLP). L'ús d'encebadors marcats fluorescentment és una alternativa a l'ARDRA, amb la qual s'obtenen patrons més senzills quant al nombre de bandes. En aquesta tècnica, l'ADN total de la comunitat s'extreu i s'amplifiquen els 16S ADNr amb un encebador marcat fluorescentment en l'extrem 5'. A continuació, es tallen els productes obtinguts amb un enzim de restricció tetramèric i els productes marcats proximals a l'encebador s'analitzen en un gel d'electroforesi de poliacrilamida, on són classificats per la seva grandària i freqüència d'aparició mitjançant l'ús de la tecnologia de seqüenciació. El sistema de detecció amb làser incrementa la resolució i l'especificitat, i ens permet saber el nombre i abundància de les unitats taxonòmiques operacionals (OTU) a partir de l'alçada i l'àrea dels pics (Horz *et al.*, 2001). La recent creació d'una base de dades dels fragments de restricció terminals, on podem trobar la majoria dels 16S ADNr, està facilitant l'anàlisi teòrica i pràctica de comunitats microbianes presents en ambients naturals complexos (Marsh *et al.*, 2000) (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/analyses.html>).

c) Anàlisi de l'espaiador intergènic ribosomal (RISA). Implica l'anàlisi de l'IGS per PCR dels gens 16S-23S rRNA, el qual varia entre 50 bp i 1,5 kb depenent de l'espècie analitzada (Gürtler *et al.*, 1996). Es poden utilitzar també encebadors marcats fluorescentment per a fer la detecció més resolutiva i específica, igual que en l'anàlisi dels T-RFLP, però la base de dades disponible en aquest cas és molt reduïda (Ranjard *et al.*, 2000). La gran variabilitat de tamany de l'espaiador pot permetre la detecció de lleugers canvis en l'estructura genètica de la comunitat (Acinas *et al.*, 1999) i canvis entre comunitats o espècies molt semblants (Toth *et al.*, 2001). A més, la seqüenciació dels fragments permet identificar poblacions específiques dintre d'una comunitat (Tan *et al.*, 2001).

d) Separació electroforètica utilitzant un gradient desnaturalitzant químic (DGGE) o físic (TGGE). Mitjançant l'ús d'encebadors universals i/o específics de grup, els quals són normalment complementaris a zones conservades dels gens dels 16S ARNr, s'amplifica una regió determinada del genoma de les diferents poblacions microbianes de la comunitat. Per DGGE o TGGE, els fragments parcials dels gens dels 16S ARNr d'una mateixa mida però que difereixen en les seves seqüències en almenys un nucleòtid se separen per electroforesi en gels de poliacrilamida (Muyzer *et al.*, 1999; Muyzer i Smalla, 1998).

La diferent composició de bases dels ADNr obtinguts per PCR fa que els productes tinguin diferent punt de fusió. La separació dels fragments amplificats o *amplicons* es fa en gels de poliacrilamida, els quals tenen un gradient lineal d'un agent desnaturalitzant d'ADN químic (urea i formamida en DGGE), o un agent físic (temperatura en TGGE), amb la qual cosa es creen perfils complexos com a conseqüència de la diversitat dels fragments amplificats.



Inicialment els fragments es mouen per la seva mida però en un moment determinat, a causa de les condicions elevades de desnaturalització, l'ADN comença a desnaturalitzar-se. La desnaturalització parcial retarda l'avanç de la molècula en el gel, i així s'observen canvis en la seva mobilitat segons la composició de bases. Quan les condicions de desnaturalització són extremes, acaben separant-se les dues cadenes.

Els patrons de DGGE obtinguts es poden analitzar directament mitjançant l'aplicació d'índex de similitud (Gillan *et al.*, 1998) o bé de forma indirecta. De forma indirecta, els fragments poden ser separats del gel, reamplificats, reanalitzats per DGGE i seqüenciats (figura I-3). Llavors, les seqüències poden ser comparades amb d'altres d'extretes de les bases de dades (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Els patrons obtinguts també es poden transferir a una membrana i/o analitzar amb sondes específiques dissenyades a partir de les seqüències dels 16S ADNr.

Figura I-3. Anàlisi de l'estructura d'una comunitat bacteriana per PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1999). a) Comunitat microbiana tenyida amb DAPI. b) Comunitat microbiana tenyida amb una sonda específica del domini *Bacteria*

Ambdues tècniques, DGGE i TGGE, necessiten optimitzar-se, calibrar els corresponents gradients lineals dels agents desnaturalitzants químic o físic i unir una cua de GC als encebadors per evitar la fusió total de l'ADNc i, com a conseqüència, millorar la separació i resolució dels fragments en el gel d'electroforesi. La seva fiabilitat, reproductibilitat, rapidesa i la possibilitat d'estudiar moltes mostres a la vegada fan que siguin uns dels mètodes més emprats actualment en estudis d'ecologia microbiana. Entre les aplicacions més freqüents hi ha la identificació de poblacions microbianes (Murray *et al.*, 1998), la detecció de canvis poblacionals derivats de fluctuacions espaciotemporals dels paràmetres fisicoquímics o de l'addició de compostos contaminants (Ferris i Ward, 1997; Ovreäs *et al.*, 1998; Sievert *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 1998), la detecció específica de bandes per hibridació amb sondes marcades (Kowalchuk *et al.*, 1998; Ovreäs *et al.*, 1997), etc.

A causa de la divergència existent dintre dels gens multicòpia dels ARNr, de l'alta ràtio ARNr/ADN en les cèl·lules metabòlicament més actives i de la comigració de bandes de diferent seqüència a la mateixa posició del gradient, el nombre de bandes i la seva intensitat no estan relacionades amb el nombre d'espècies i la seva abundància relativa en aquesta comunitat. A més, l'amplificació selectiva de la PCR determina que en ambients on hi ha poblacions microbianes minoritàries i majoritàries, la identificació de les primeres sigui molt difícil (Muyzer *et al.*, 1996). La necessitat d'obtenir productes inferiors a 500-700 parells de bases, fàcilment separables per aquesta tecnologia, limita també la mesura de la diversitat de les poblacions que integren la comunitat, ja que és més difícil trobar encebadors universals per a amplificar fragments petits d'ADNr (Muyzer i Smalla, 1998).

Actualment, hi ha d'altres estudis d'ADN parcial d'una comunitat basats en l'anàlisi de gens que codifiquen per determinats enzims que són molt més variables que els 16S ADNr, que permeten detectar poblacions relacionades funcionalment però que es distribueixen de forma diferent en l'ambient natural (Eschenfeldt *et al.*, 2001; Zehr i Hiorns, 1998).

1.4.1.3 Anàlisi dels extractes d'ARN

En els darrers anys i complementaris als descrits anteriorment, estan augmentant d'una forma molt considerable els mètodes d'anàlisi d'una comunitat basats en l'estudi directe de l'extracte d'ARN o bé de determinades seqüències (ARNm, ARNr, etc.) d'aquest ARN. En el primer cas, l'anàlisi de l'extracte d'ARN sobre un suport sòlid i la posterior hibridació amb sondes específiques marcades ens permeten obtenir una

estimació de l'abundància relativa de la seqüència complementària a la sonda, sempre i que després es comparin les intensitats obtingudes en la hibridació amb quantitats conegudes d'ARN de referència (Amann *et al.*, 1995; MacGregor, 1999). Actualment, el més habitual però és analitzar una part de l'extracte, com poden ser l'ARNm o gens estructurals (*pmoA*), cosa que permet relacionar les diferents espècies amb les funcions d'aquestes dintre de l'esmentada comunitat per transcripció reversa (RT) *in situ* o *in vitro* RT-PCR (MacGregor, 1999; Spring *et al.*, 2000) o bé analitzar poblacions actives de bacteris i estudiar la regulació de la seva activitat per factors ambientals com el pH, la temperatura, el O₂, els ions metàl·lics, etc (Murrell i Radajewski, 2000). En aquests casos, i utilitzant un encebador d'ADN i una polimerasa viral, la RT transcriu ADN a partir d'ARN i finalment es pot amplificar l'ADN per PCR.

I.4.2 Anàlisi quantitativa d'una comunitat

L'aplicació de totes les tècniques descrites anteriorment permet estudiar la diversitat genètica d'una comunitat però no dona informació quantitativa ni funcional de les poblacions que la integren, sobretot quan l'anàlisi està basada en l'estudi de l'extracte d'ADN. Com a alternativa, i obviant tots els problemes descrits i derivats, majoritàriament, de l'extracció dels àcids nucleics i de la PCR, Olsen i col·laboradors (1986) i més tard Amann i col·laboradors (1990) proposen l'ús de sondes marcades d'ADN complementàries a les seqüències conservades dels gens dels ARNr, identificades mitjançant l'alineament d'aquests gens de les bases de dades. La finalitat és identificar i quantificar les diferents poblacions bacterianes (16S ARNr) presents en una comunitat pel que fa a domini, ordre, gènere, espècie i a grups de soques dintre d'una mateixa espècie (Amann, 1995). De forma addicional, i a partir de les seqüències dels 16S ARNr aïllats de mostres d'ambients naturals, el disseny de noves sondes permet analitzar directament els bacteris d'interès en les mostres de camp (figura I-4).

Actualment, l'anàlisi d'ARN d'una comunitat es fa majoritàriament mitjançant tècniques d'hibridació, principalment del 16S ARNr. La hibridació no és més que la unió de seqüències de nucleòtids amb d'altres seqüències homòlogues anomenades *sondes*. Les sondes més utilitzades, normalment, en hibridació *in situ* són cadenes curtes d'ADNcs, de 15-25 nucleòtids, sintetitzades químicament i dissenyades a partir de les seqüències dels gens dels 16S ARNr presents en les bases de dades. El grau d'especificitat d'aquestes sondes depèn de si són complementàries a zones altament conservades dels gens dels 16S ARNr dintre d'una espècie o bé específiques de grup. La reassociació d'ambdues cadenes complementàries depèn de diferents factors, entre els quals cal destacar la temperatura, el temps de contacte, la concentració de sals, el grau de mal aparellament o *mismatch* entre els parells de bases i la longitud i concentració de la seqüència diana i de la sonda.

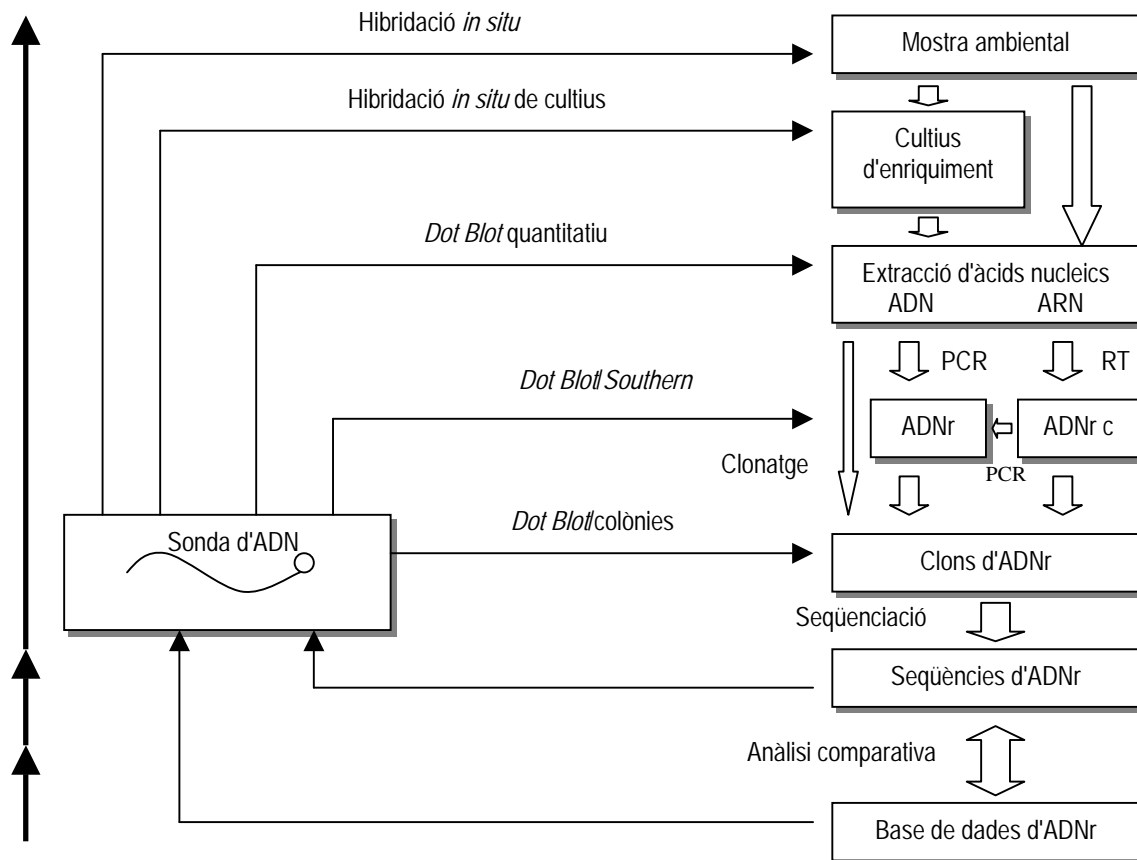


Figura I-4. Utilització de sondes complementàries a seqüències d'ARNr per a caracteritzar mostres ambientals per tècniques d'hibridació (Amann *et al.*, 1997)

La detecció d'ARNr ens ajuda a conèixer la composició de les poblacions presents en una comunitat i, sobretot, el seu estat metabòlic, ja que el contingut de ribosomes generalment s'incrementa amb la velocitat de creixement. No obstant això, aquesta relació no sempre és lineal i pot quedar afectada per molts factors que cal tenir en compte, com són la velocitat de creixement, la intensitat de la llum, la temperatura i el nombre de còpies d'ARNr, entre d'altres (MacGregor, 1999).

L'anàlisi d'aquesta molècula mitjançant tècniques d'hibridació es pot dividir principalment en dos grans grups: la hibridació sobre un suport sòlid de l'ARNr amb sondes marcades i la fluorescència d'hibridació *in situ* (FISH) de l'ARNr de cèl·lules senceres amb sondes marcades (figura I-4).

Els principals passos del procés d'hibridació sobre un suport sòlid són la unió dels àcids nucleics diana al suport sòlid, la prehibridació amb agents bloquejants per a evitar unions inespecífiques, hibridació amb la sonda marcada (radioactivament, fluorescentment o amb anticossos units a enzims), el rentat de l'excés de sonda no unida a la diana i la detecció per autoradiografia, fluorescència o per colorimetria. Els

suports més utilitzats per fer aquest tipus d'anàlisi han estat les membranes de niló o nitrocel·lulosa i els medis de cultiu en placa (Phillips *et al.*, 1999). Encara que presenta totes les limitacions associades al cultiu de bacteris, si la hibridació es fa sobre cultius en placa permet detectar i enumerar directament organismes presents en vectors o hostes per aixafament o *squashing* (Amann *et al.*, 1995). En canvi, quan el suport sòlid és una membrana, la hibridació de l'ARNr adherit a aquesta amb sondes específiques de grup permet obtenir informació semiquantitativa sempre i que el grau de la hibridació es compari amb quantitats conegudes d'ARNr de referència (MacGregor, 1999). No obstant això, cal recordar, però, que l'extracció dels àcids nucleics, la naturalesa de la mostra, les espècies presents, el trencament diferencial de diferents tipus de cèl·lules, etc. poden ser la causa d'errors en fer aquest tipus d'anàlisi. A més, en la majoria dels casos es fa necessari l'ús de jocs de sondes que ens permetin detectar hibridacions creuades inespecífiques. Això és, per exemple, utilitzar a la vegada una sonda universal del domini *Bacteria* i sondes específiques de grup dintre d'aquest domini, i serà la suma dels percentatges d'hibridació de les sondes específiques el percentatge total d'hibridació de la sonda universal del domini assajat (Snaidr *et al.*, 1997; Zarda *et al.*, 1997). El senyal produït per la hibridació sobre un suport sòlid es pot detectar o bé en forma de taca o *blot* o bé com una banda definida quan la hibridació, com a alternativa a la detecció amb bromur d'etidi, es fa sobre patrons d'àcids nucleics transferits a membrana (Hahn *et al.*, 1990; Teske *et al.*, 1998).

Encara que aplicables també en molts casos a l'estudi d'ADN, per a revelar relacions taxonòmiques entre diferents espècies o soques bacterianes, les tècniques més noves d'anàlisi d'ARN per hibridació estan enfocades a l'estudi o seguiment de l'expressió gènica d'organismes o poblacions difícils de cultivar o no cultivables. En són un exemple els *microarrays* o *macroarrays* o micromatrius o macromatrius d'oligonucleòtids per a detectar 16S ARNr a partir d'extractes d'ARN no purificats (Small *et al.*, 2001). L'extracte marcat s'hibrida amb oligonucleòtids units a les matrius diminutes (plaques de vidre, membranes de niló o xips de silici) i complementaris de gens diferents, i les diferències en la intensitat d'hibridació indiquen el nivell d'inducció dels diferents gens.

I.4.2.1 FISH

Mitjançant l'ús d'aquesta tècnica s'obvien tots els errors associats a l'extracció dels àcids nucleics i a la PCR. Les cèl·lules se solen fixar directament al camp amb un dissolvent orgànic, com poden ser els aldehids (paraformaldehid, formaldehid o glutaraldehid) o amb alcohols (metanol o etanol). La fixació de la mostra augmenta la permeabilitat de les cèl·lules, sense alterar-ne la seva morfologia, respecte a les sondes utilitzades, i evita la destrucció dels ribosomes. Les cèl·lules, en suspensió o unides a

portaobjectes recoberts amb gelatina, són submergides o immerses en un tampó d'hibridació on s'inclou la sonda marcada i es realitza el procés d'hibridació (figures I-2 i I-4). L'aplicació de FISH permet detectar directament en l'ambient natural seqüències de bacteris no cultivables i bacteris manipulats genèticament (GEM) (Amann, 1995). A més, el marcatge de totes les cèl·lules presents en la mostra amb 4', 6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) o d'altres colorants, respecte a les cèl·lules marcades amb sondes universals o específiques de grup filogenètics, ens permet estudiar la composició i l'estructura de les diferents poblacions presents en una comunitat en termes d'abundància i organització espacial (Gulledge *et al.*, 2001; Snaidr *et al.*, 1997) i estudiar les dinàmiques poblacionals existents (Alfreider *et al.*, 1996).

Durant el procés d'hibridació, l'optimització de la concentració de la sonda (Amann *et al.*, 1990), l'amplificació del senyal produït per la sonda amb l'ajut d'enzims conjugats o per marcatge múltiple (Lee *et al.*, 1993; Zarda *et al.*, 1991), l'ús de cloramfenicol per a inhibir la degradació dels ARNr (Ouverney i Fuhrman, 1997), etc. poden ajudar a augmentar la sensibilitat de la FISH deguda a la manca d'ARNr diana o a problemes d'accessibilitat a l'ARNr diana derivats de l'elevada estabilitat de la seva estructura secundària o per unió a proteïnes ribosomals. Amb la mateixa finalitat, s'ha demostrat que l'ús combinat de sondes específiques marcades i sondes ajudadores o *helpers* no marcades augmenta el senyal obtingut per FISH per la major accessibilitat de la seqüència diana (Fuchs *et al.*, 2000). L'ús de sondes marcades radioactivament també augmenta la sensibilitat de l'anàlisi, però, al mateix temps, produeix taques d'uns quants micròmetres al voltant de les cèl·lules diana, la qual cosa fa difícil que es puguin estudiar cèl·lules petites agrupades (Devereux *et al.*, 1992).

L'alta especificitat de les sondes respecte a les seqüències diana provoca moltes vegades la manca de detecció en cèl·lules metabòlicament inactives o amb un nombre baix de ribosomes o d'ARNr diana. Encara que és possible detectar per FISH una cèl·lula diana entre 10^6 cèl·lules no diana, treballar per sota de 10^3 cèl·lules pot representar un esforç humà i econòmic molt gran per a fer els recomptes en el microscopi. Per aquest motiu, en molts casos cal concentrar les mostres, mitjançant filtració o centrifugació. També és molt útil monitoritzar els recomptes mitjançant l'ús de diferents filtres en el microscopi per eliminar o reduir el soroll de fons produït per la presència de determinades substàncies o elements autofluorescents, la digitalització de les imatges amb detectors connectats a sistemes informàtics, l'ús de microscòpies alternatives, com és la de rastreig amb làser confocal, sobretot quan les cèl·lules es troben immobilitzades damunt de materials autofluorescents, etc. (Amann *et al.*, 1995).

En resum, l'ARNr es pot detectar específicament en cèl·lules intactes en l'ambient natural, cosa que permet determinar la distribució espaciotemporal i l'estat metabòlic de determinats grups (Amann *et*

al., 1995). L'ús de tècniques addicionals a la hibridació, com la citometria de flux (Gregori *et al.*, 2001; Vives-Rego *et al.*, 2000) o el microscopi de rastreig amb làser confocal (Amann i Kühl, 1998), ens ajuda a automatitzar el procés de recompte i ens dóna informació en tres dimensions de l'estructura de la comunitat i d'associacions entre les diferents poblacions, respectivament.

Després d'analitzar les diferents metodologies moleculars més emprades avui dia, i depenent dels objectius marcats per l'investigador, s'arriba a la conclusió que cal tenir molta cura en seleccionar la tècnica que es vol aplicar, ja que cadascuna ens proporciona un tipus d'informació diferent. Així doncs, el clonatge i la seqüenciació dels productes obtinguts per PCR dels gens dels 16S ARNr a partir dels extractes d'ADN d'una comunitat ens proporcionen informació sobre la seva diversitat, siguin o no cultivables els bacteris. En canvi, si el que es vol és discriminar entre clons diferents, n'hi ha prou de fer l'anàlisi dels seus patrons de restricció (De Bruijn, 1992). Els estudis de reassociació d'ADN total d'una comunitat ens permeten tenir una idea de la diversitat genètica total de les poblacions bacterianes (Torsvik *et al.*, 1998), mentre que l'anàlisi del nombre de bandes presents en els patrons de DGGE (Muyzer *et al.*, 1993) ens proporciona informació sobre l'estructura de la comunitat de forma més resolutiva. L'anàlisi directa dels 16S ADNr-RFLP no ens informa ni de l'abundància de les espècies presents en una comunitat ni de la seva composició, però la similitud o dissimilitud obtinguda entre els patrons genètics després d'aplicar aquesta tècnica ens és de gran utilitat per a detectar canvis poblacionals que es donen en els ecosistemes per alteració de les seves propietats fisicoquímiques. En canvi, la transferència dels patrons genètics a membranes de nitrocel·lulosa i la hibridació posterior amb sondes específiques permeten identificar i estudiar la dinàmica de les poblacions assajades. Si la DGGE es combina amb seqüenciació o hibridació, es pot obtenir informació sobre la diversitat i la connexió filogenètica dels membres presents en la comunitat (Ovreås *et al.*, 1997). Finalment, si el que ens interessa és obtenir informació global quantitativa de les poblacions actives que integren la comunitat, l'aplicació de sondes específiques de dominis o grups filogenètics determinats per FISH és la millor alternativa (Hahn *et al.*, 1992; Amann, 1995).

Un cop vista en detall la infinitat de limitacions dels mètodes moleculars descrits fins a l'actualitat al llarg d'aquest capítol, podem afirmar que aquests no són mètodes substituïdors dels convencionals, sinó que cal utilitzar-los com a mètodes complementaris. Així doncs, les perspectives de futur en l'ecologia microbiana es deriven de la selecció i combinació de les tècniques més adients per a conèixer la funció i la fisiologia dels bacteris, l'estructura de l'ecosistema i la relació existent entre els bacteris i el seu entorn.

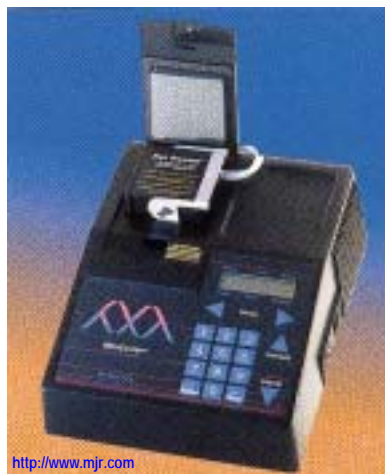
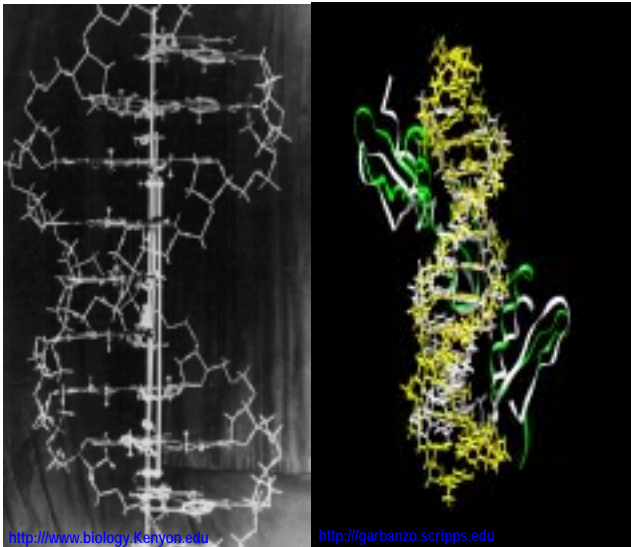
OBJECTIUS GENERALS DEL TREBALL

En la realització d'aquest treball ens vam proposar estudiar diferents sistemes estratificats, un de bentònic (tapissos microbians del delta de l'Ebre) i tres de planctònics (els estanyols d'en Cisó i el Vilar del sistema càrstic de Banyoles i el llac Gran d'Estanya). Aquests sistemes han estat àmpliament caracteritzats per mètodes clàssics al llarg dels anys, mentre que l'aplicació de mètodes moleculars ha estat pobra. En aquest estudi s'han aplicat bàsicament tècniques moleculars i s'han combinat amb les clàssiques per a ampliar el coneixement d'aquests sistemes i per a obtenir la informació necessària que ens permeti assolir els objectius generals que ens vam marcar a l'inici del treball:

1. Estudiar la dinàmica espaciotemporal de les poblacions bacterianes presents en els sistemes estratificats bentònics (tapissos microbians del delta de l'Ebre) i planctònics (estanyols d'en Cisó i el Vilar i llac Gran d'Estanya) mitjançant l'anàlisi dels RFLP.
2. Determinar el límit de detecció dels RFLP mitjançant l'avaluació de la influència del nombre d'operons i de l'homologia dels encebadors en la PCR.
3. Estudiar les variacions de les poblacions bacterianes entre els períodes d'estratificació i d'holomixi al llac Gran d'Estanya mitjançant l'ús de DGGE.
4. Analitzar per FISH les poblacions bacterianes actives presents al llac Gran d'Estanya durant els períodes d'estratificació i d'holomixi.
5. Relacionar els resultats obtinguts amb les diferents tècniques moleculars amb els paràmetres fisicoquímics descrits en els diferents sistemes estratificats.



II. Materials i mètodes



II.1 Soques tipus. Condicions de creixement

II.2 Zones de mostreig

II.2.1 Tapissos microbians del delta de l'Ebre

II.2.2 Estanyols d'en Cisó i el Vilar

II.2.3 Llac Gran d'Estanya

II.3 Mostreig i tractament de les mostres

II.3.1 Dies de mostreig i presa de les mostres

II.3.2 Mesures de camp

II.3.2.1 Intensitat de llum incident, conductivitat, temperatura, salinitat i oxigen dissolt

II.3.3 Anàlisis fisicoquímiques

II.3.3.1 Determinació del sulfur d'hidrogen

II.3.3.2 Determinació del pH

II.3.4 Anàlisis bioquímiques

II.3.4.1 Pigments

II.3.4.2 Proteïnes

II.3.5 Anàlisis biològiques

II.3.5.1 Laminació dels tapissos

II.3.5.2 Microscòpia

II.3.6 Anàlisis moleculars

II.3.6.1 Extracció d'ADN genòmic

II.3.6.2 PCR-RFLP

II.3.6.3 PCR-DGGE

II.3.6.4 FISH

II.3.7 Anàlisi estadística

II.3.8 Número d'accés de seqüències

II.1 Soques tipus. Condicions de creixement

II.1.1 Soques tipus

Durant l'estudi es van emprar set soques tipus del domini *Bacteria* (*Chlorobium phaeobacteroides* BF 8600, *Escherichia coli* CGSC 5073, *E. coli* K-12, *Salmonella typhimurium* LT2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 i *B. cereus* ATCC 10876) i una del domini *Archaea* (*Haloferax mediterranei* ATCC 33500).

Les soques *C. phaeobacteroides* BF 8600, *E. coli* CGSC 5073 i *B. subtilis* ATCC 6633 van ser emprades com a control positiu del domini *Bacteria* en la PCR. Les quatre soques restants d'aquest domini es van utilitzar per a dur a terme l'experiment teoricopràctic descrit en el capítol V, i el nombre d'operons d'ADNr que hi ha per cèl·lula en cadascuna d'aquestes soques tipus es detallen en la taula II-1 (<http://rrndb.cme.msu.edu/rrndb/>).

Soques tipus	Nombre d'operons d'ADNr
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	3
<i>E. coli</i> K-12	7
<i>S. typhimurium</i> LT2	7
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	12

Taula II-1. Soques tipus emprades en l'experiment teoricopràctic

El control positiu del domini *Archaea* en la PCR fou *H. mediterranei* ATCC 33500, dipositada en la col·lecció americana de soques tipus (American Type Culture Collection, Rockville, Md.) i cedida pel Dr. Francisco Rodríguez Valera.

II.1.2 Condicions de creixement

Els medis de cultiu líquids utilitzats i les condicions emprades per a fer créixer les soques tipus van ser els que es detallen a continuació: *C. phaeobacteroides* BF 8600 a 25 °C en medi mínim Pfennig a pH 6,6-6,9 i il·luminació contínua de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Pfennig i Trüper, 1981, 1992a); *E. coli* CGSC 5073, *E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2 en medi Luria-Bertani (LB) a 37 °C i ON (Miller, 1972); *B. subtilis* ATCC 6633 en LB a 30 °C i ON; *R. sphaeroides* 2.4.1 en medi 290A (LB suplementat amb glucosa [0,1% p/v] i $\text{CaCl}_2 \cdot$

3H₂O [0,0375% p/v]) a 30 °C durant 48-72 h; *B. cereus* ATCC 10876 en medi agar nutritiu (NA) (extracte de carn [0,5% p/v], peptona [1% p/v], NaCl [0,5% p/v]) a 30 °C ON (<http://www.uv.es/medios/1M.htm>), cedida per la col·lecció espanyola de soques tipus (CECT) (<http://www.uv.es/cect>). *H. mediterranei* ATCC 33500 es va fer créixer en aigua salada al 25% (p/v) suplementada amb extracte de llevat al 0,5% (p/v) (Rodríguez-Valera *et al.*, 1981). Quan fou necessari, els cultius de les soques tipus es van realitzar en medi sòlid, en el mateix medi detallat anteriorment, però suplementat amb agar a l'1,5% (p/v).

II.2 Zones de mostreig

II.2.1 Tapissos microbians del delta de l'Ebre

Les comunitats bentòniques verticalment estratificades objecte d'estudi es localitzen a la regió mediterrània de la península Ibèrica (figura II-1A), concretament a la península dels Alfacs (40° 40' N, 0° 40' E), que és la més meridional del delta de l'Ebre (Mir *et al.*, 1991). Les condicions climàtiques del delta de l'Ebre es caracteritzen per tenir un rang de temperatura mitja anual de 3-27°C, oscil·lacions importants de temperatura entre l'estiu i l'hivern, una precipitació mitjana anual de 500 mm, vents forts de component nord i un balanç negatiu de precipitació-evaporació a causa de la intensa radiació i de la manca de precipitacions, especialment durant l'estiu (Martínez-Alonso, 1997).



Figura II-1. A) Localització geogràfica de la zona de mostreig a la península Ibèrica (●). B) Plànol del delta de l'Ebre: punt de mostreig (●). C) Plana arenosa on es localitzen els tapissos microbians del delta de l'Ebre estudiats



La zona de mostreig (figura II-1B, C) es troba limitada per la badia dels Alfacs a l'oest i per la presència de les salines de la Trinitat a l'est. L'elecció d'aquest punt de mostreig, punt 3 (P3), fou deguda al fàcil accés dintre de l'àrea limitada pel Parc Natural del Delta de l'Ebre (Decret 332/1986, de 23 d'octubre, de la Generalitat de Catalunya), l'existència de molts estudis previs, detallats en la introducció del capítol III, i al fet que, a diferència d'altres possibles punts d'estudi, s'hi troben tapissos microbians força desenvolupats.

II.2.2 Estanyols d'en Cisó i el Vilar

Els dos estanyols objecte d'estudi es localitzen al nord-est de la península Ibèrica (figura II-2A). Ambdós estanyols, el d'en Cisó ($42^{\circ} 07' 35''$ N, $2^{\circ} 45' 05''$ E) (figura II-2B) i el del Vilar ($42^{\circ} 07' 10''$ N, $2^{\circ} 44' 50''$ E) (figura II-2C), pertanyen al sistema càrstic de Banyoles (Girona) i es troben situats en la comarca del Pla de l'Estany, a una alçada de 175 m sobre el nivell del mar. Les condicions climàtiques del Pla de l'Estany es caracteritzen per tenir precipitacions superiors als 600 mm anuals, 15°C d'oscil·lació tèrmica entre els estius frescos i els hiverns freds, i vents de nord-oest (garbí) i del nord (tramuntana) molt forts (<http://insma.udg.es>).



Figura II-2. A) Localització geogràfica de la zona de mostreig a la península Ibèrica (●). B) Estanyol d'en Cisó. C) Estanyol del Vilar

L'estanyol d'en Cisó és holomíctic i té una fondària i un diàmetre màxims d'11 i 21 metres, respectivament (Abellà, 1980), els quals han anat variant al llarg dels anys per la deposició de nous sediments, enfonsaments dels marges, caiguda d'arbres, etc. (García-Cantizano, 1992; García-Gil *et al.*, 1985; Mas, 1982; Massana *et al.*, 1993; Sanz, 1986). Situat a menys d'un quilòmetre de l'estanyol d'en Cisó, l'estanyol del Vilar és meromíctic i la seva fondària màxima, llargada i amplada són 9, 170 i 81 metres, respectivament (Abellà, 1980). Compost per dues cubetes, l'estanyol del Vilar presenta la fondària màxima a la cubeta 2, on es van realitzar els mostrejors, que està connectada amb l'estany de Banyoles per un canal superficial.

II.2.3 Llac Gran d'Estanya

El llac Gran d'Estanya es localitzen a la comunitat autònoma d'Aragó, al nord-est de la península Ibèrica, concretament a la província d'Osca. La zona de mostreig està situada a menys d'un km del municipi d'Estanya, pertanyent a la comarca de la Baixa Ribagorça, a una alçada de 670 m sobre el nivell del mar i a una altitud de 42° 02' nord i una longitud de 0° 32' est (figura II-3A). En aquesta comarca trobem un clima mediterrani continentalitzat, on les condicions climàtiques es caracteritzen per tenir uns estius calorosos, d'entre 22-24 °C de mitjana durant el mes d'agost, i uns hiverns freds, d'entre 6.5-8 °C durant el mes de gener. La precipitació mitjana anual és inferior a 400 mm. El vent dominant a l'hivern i començament de la primavera és el de nord-oest, vent sec i fred anomenat cerç o *cierzo*, mentre que a l'estiu és el de sud-est, vent molt càlid i sec anomenat botorn o *bochorno* (<http://www.aragonesasi.com>).

El llac Gran d'Estanya està constituït per dues cubetes, que presenten forma de vuit, de 12 i 20 m de fondària màxima, les quals es troben separades per una franja d'una fondària d'entre 2 i 3 m. La superfície total i el volum d'aigua del llac són de 188.306 m² i de 983.728 m³, respectivament (Gaju, 1987). Les dues cubetes queden separades quan emergeix dita franja, fet que succeeix, habitualment, durant anys o períodes de temps de molta sequera. Els mostrejors es van realitzar a la cubeta situada al sud-est (figura II-3B), la qual presenta la fondària màxima. L'elecció d'aquest punt fou deguda a que presenta un fàcil accés dintre de l'àrea protegida (amb els permisos del Departament de Medi Ambient d'Aragó i de l'Ajuntament de Benabarre) i a l'existència d'estudis previs (Àvila *et al.*, 1984; Gaju, 1987; Guerrero *et al.*, 1987a; Mir, 1997).



Figura II-3. A) Localització geogràfica de la zona de mostreig a la península Ibèrica (●). B) Vista del llac Gran d'Estanya des de la part sud: punt de mostreig (●). C) Extracció de la mostra, de 10 m de fondària, del dia 20/09/01, amb l'ajut de l'ampolla Ruttner, on s'observa clarament la coloració rosada deguda a la presència de bacteris fototròfics anoxigènics del sofre del tipus *Chromatiaceae*

II.3 Mostreig i tractament de les mostres

II.3.1 Dies de mostreig i presa de les mostres

Als tapissos microbians del delta de l'Ebre, els mostrejos es van realitzar a la mateixa hora, les 12.00 del migdia, els dies 28/04/97 (S), 07/07/97 (Su), 16/10/97 (A) i 19/01/98 (W). La presa de les mostres es va dur a terme amb l'ajut de plaques de Petri i un ganivet. La placa de Petri servia per a marcar l'àrea del tapís microbià, que posteriorment era tallada, i per a guardar la mostra extreta. Una vegada obtingudes les mostres, es van conservar a la foscor i a 4 °C fins a arribar al laboratori per a evitar canvis quantitius i/o qualitius de les poblacions microbianes.

Als estanyols d'en Cisó i el Vilar, els mostrejos es van realitzar els dies 22/05/00 (S), 17/07/00 (Su), 09/10/00 (A) i 23/01/01 (W), entre les 10.00-13.00 h. Les diferents mostres de la columna d'aigua,

seleccionades per les seves característiques fisicoquímiques, s'extreien amb l'ajut d'una embarcació pneumàtica del tipus zodiac, que ens permetia accedir fins al punt de mostreig, i una ampolla Ruttner transparent (Hydro-Ex, Upsala) d'1,8 litres de capacitat (figura II-3C).

Al llac Gran d'Estanya, els mostrejos es van dur a terme a les 12.00 del migdia, els dies 20/09/01 (Su) i 19/02/02 (W), i la presa de les mostres va ser igual que la descrita als estanyols d'en Cisó i el Vilar.

En aquests ambients lacustres, una part d'aquestes mostres es guardava en ampolles de polipropilè de 500 ml de capacitat, a la foscor i a 4 °C, per a fer les anàlisis pertinents al laboratori al cap de 3-4 hores després de la presa, mentre que la determinació del sulfur d'hidrogen es començava a processar en el camp (apartat II.3.3.1). Al llac Gran d'Estanya, i per a dur a terme les anàlisis descrites en els apartats II.3.5.2 i II.3.6.4, 100 ml de cadascuna de les mostres es van fixar *in situ* al 3,7% amb formaldehid durant 2-4 hores a 4 °C.

II.3.2 Mesures de camp

II.3.2.1 Intensitat de llum incident, conductivitat, salinitat, temperatura i oxigen dissolt

En la columna d'aigua, la intensitat de llum incident es va mesurar amb un mesurador (Li-189, LiCor) que presenta un sensor de resposta uniforme en l'interval 400-700 nm. La intensitat de llum en la superfície dels tapissos microbians es va mesurar amb un mesurador (*Luxmeter* HD 8366, Delta Ohm) que té un sensor de silici i un rang que va de 0,1 lx a 199,9 klx.

La conductivitat i la salinitat es van mesurar amb un conductímetre (YSI 33 S-T-C, Yellow Spring Instruments). La temperatura es va mesurar amb els termòmetres que porten incorporats l'ampolla Ruttner i l'oxímetre (Oxi 92, Crison). El valor final de la temperatura es va obtenir fent la mitjana de les dues mesures.

L'oxigen dissolt de les diferents fondàries de la columna d'aigua es va mesurar amb un oxímetre (Oxi 92, Crison).

II.3.3 Anàlisis fisicoquímiques

II.3.3.1 Determinació del sulfur d'hidrogen

La determinació del sulfur d'hidrogen es va fer seguint el mètode colorimètric del blau de metilè (Trüper i Schlegel, 1964). En el camp i una vegada extretes les mostres del llac, 13,5 ml d'aquestes es fixaven amb acetat de zinc a una concentració final de 0,1 N i es guardaven a la foscor i a 4 °C, fins a arribar al laboratori. Llavors, a 10 ml de la solució fixada se li afegia 1 ml de DPDS al 0,2% per acidificar el medi, redissoldre el precipitat i reaccionar amb els ions S^{2-} per a formar el blau de leuometilè. Finalment, s'afegien 100 µl de sulfat fèrric amònic (10% de $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ i 2 ml de H_2SO_4 en aigua destil·lada) per reduir l'ió Fe^{3+} a Fe^{2+} i alliberar el blau de metilè en quantitat proporcional al sulfur que hi havia en la mostra. Després d'incubar la mescla durant 30 minuts a la foscor, es va mesurar l'absorbància a 670 nm en un espectrofotòmetre (Du-70, Beckman) i, a partir d'una recta patró feta amb sulfur sòdic, es va calcular la concentració de sulfur d'hidrogen.

II.3.3.2 Determinació del pH

El pH de les diferents fondàries de la columna d'aigua es va mesurar al laboratori amb un pH-metre (420A, Orion).

II.3.4 Anàlisis bioquímiques

II.3.4.1 Pigments

La concentració de clorofil·la *a* (Chl *a*), bacterioclорofil·la *a* (Bchl *a*) i bacterioclорofil·les *c*, *d* i *e* (Bchl *c*, *d* i *e*) es va determinar filtrant 200 ml de cadascuna de les mostres sobre filtres Sartorius d'acetat de cel·lulosa de 0,45 µm de porus, on hi havia 5 ml d'una solució saturada de carbonat magnèsic, per a formar una capa homogènia sobre el filtre i evitar-ne la colmatació ràpida i la degradació àcida de les clorofil·les durant l'extracció (Humphry i Woottom, 1966). La mostra, amb el carbonat, es va retirar del filtre rascant amb una espàtula estèril i es va guardar a la foscor i a 4 °C amb acetona al 90% durant tota la nit (ON). L'endemà es van eliminar el carbonat i les restes cel·lulars per centrifugació. El sobrenedant es va transvasar a un tub nou i, resguardant-lo de la llum, es mesurava l'espectre d'absorció entre 300-900 nm en l'espectrofotòmetre (Du-70, Beckman). La concentració dels pigments fotosintètics es va determinar

emprant les fórmules descrites per Strickland i Parsons (1972), Takahashi i Ichimura (1968) i Caraco i Puccoon (1986), per les quals:

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = (11,6 A^*_{665} - 1,31 A^*_{645} - 0,14 A^*_{630}) v V^{-1}$$

$$\text{Bchl } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = 25,2 A^*_{773} v V^{-1}$$

$$\text{Bchl } c, d \text{ i } e \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = 10,2 A^*_{654} v V^{-1}$$

on v és el volum total de l'extracte en mil·lilitres, V és el volum de la mostra en litres, i $A^*_x = A_x - A_{830}$.

Si bé Strickland i Parsons recomanen restar l'absorbància de fons de la mostra emprant A_{750} , en mostres on hi ha bacterioclòrils, això no es pot fer, ja que aquestes absorbeixen justament al voltant de 750 nm. Per això restem A_{830} , on no hi ha cap pigment que interfereixi en la determinació (Gasol, 1988; Montesinos *et al.*, 1983).

II.3.4.2 Proteïnes

La concentració de proteïnes de les diferents fondàries de la columna d'aigua es va realitzar a partir de les cèl·lules, un cop extrets els pigments amb acetona, utilitzant el mètode colorimètric del blau de Coomassie (Bradford, 1976). El sediment amb les cèl·lules es va resuspendre amb NaOH 1 N a 100 °C durant 10 minuts (Herbert *et al.*, 1971). Llavors, la determinació de la concentració de proteïnes es va dur a terme amb un equip comercial seguint les recomanacions del fabricant (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce Chemical). Després d'incubar la mescla durant 30 min a la foscor, es va mesurar l'absorbància a 595 nm amb l'espectrofotòmetre (Du-70, Beckman) i, per extrapolació a una recta patró feta amb albúmina sèrica bovina (BSA), es va calcular la concentració de proteïnes.

II.3.5 Anàlisis biològiques

II.3.5.1 Laminació dels tapissos microbians del delta de l'Ebre

Amb l'ajut d'una lupa binocular (SZ-PT, Olympus), es va determinar el nombre, el color i el gruix de les diferents laminacions dels tapissos microbians del delta de l'Ebre. El gruix de cadascuna de les laminacions es va obtenir fent la mitjana d'un mínim de 30 mesures, nombre que es va escollir perquè l'interval de confiança fos del 95% a partir de la distribució t de Student (Sokal i Rohlf, 1983). De cada

laminació es van guardar 0,1 grams a -20 °C. En la figura II-4 es pot observar una mostra d'una secció vertical d'un tapís on es posen de manifest les diferents capes pigmentades.

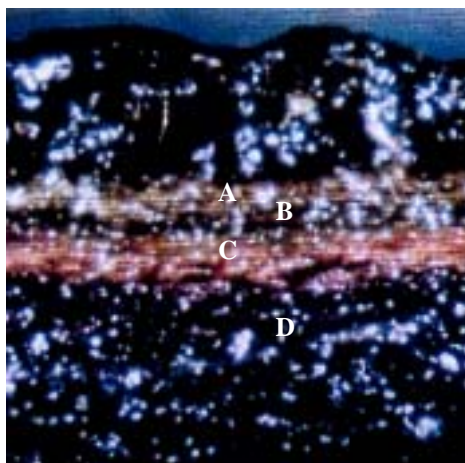


Figura II-4. Perfil vertical dels tapissos microbians del delta de l'Ebre. Laminacions: A, groc-marró; B, verd; C, taronja-roig; D, sediment negre. Imatge cedida per Maira Martínez Alonso

II.3.5.2 Microscòpia

II.3.5.2.1 Caracterització microscòpica

La caracterització microscòpica de les comunitats microbianes presents en els tapissos microbians del delta de l'Ebre es va fer *in vivo*. Així doncs, una vegada determinats el nombre, el color i el gruix de les diferents laminacions, l'observació i la caracterització de les diferents poblacions microbianes es van realitzar directament a partir de mostra sense fixar amb l'ajut d'un microscopi (BH-2, Olympus). La caracterització microscòpica de les comunitats microbianes presents en el llac Gran d'Estanya es va realitzar a partir de les mostres fixades al camp amb formaldehid (apartat II.3.1).

Mitjançant un equip d'exposició automàtica (PM-10AK, Olympus) acoblat al microscopi (BH-2, Olympus) es van obtenir les imatges de les poblacions microbianes dominants.

II.3.5.2.2 Recòmptes cel·lulars

Per fer els recomptes cel·lulars de les soques tipus, es va centrifugar un mil·lilitre dels cultius líquids a 12.000 rpm durant 2 min, es va descartar el sobrenadant i les cèl·lules recuperades es van rentar dues vegades amb 1 ml de PBS 1X (130 mM NaCl; 10 mM de tampó fosfat sòdic). Al final es van tornar a

resuspendre amb 1 ml d'aquesta solució. 100 µl d'aquesta suspensió cel·lular es van mesclar amb 10 ml de PBS 1X per a obtenir una solució homogènia i després es van filtrar en filtres de 0,22 µm (GTTP, Millipore). Finalment, el filtre es va tenyir amb DAPI (1 µg ml⁻¹) i els recomptes cel·lulars es van realitzar al microscopi de fluorescència (BH, Olympus). A partir del recompte de més de 1.000 cèl·lules, i tenint en compte totes les dilucions realitzades fins al moment, es van calcular les concentracions cel·lulars.

Per calcular el nombre de cèl·lules per ml al llac Gran d'Estanya, 500 µl de cada fondària van ser mesclats amb 10 ml de PBS 1X, filtrats en filtres de 0,22 µm (GTTP, Millipore) i tenyits amb DAPI (1 µg ml⁻¹). Els recomptes cel·lulars es van realitzar al microscopi de fluorescència (Axioskop, Zeiss).

II.3.6 Anàlisis moleculars

II.3.6.1 Extracció d'ADN genòmic

Les cèl·lules obtingudes a partir d'un mil·lilitre de cultiu líquid de les soques tipus i les mescles bacterianes, descrites en l'annex 2, es van centrifugar a 14.000 rpm durant 10-20 minuts i, descartant el sobrenadant, es van guardar a -20 °C per a extreure posteriorment l'ADN genòmic. En canvi, les cèl·lules de *H. mediterranei* ATCC 33500 es van obtenir directament del cultiu sòlid amb un escuradents estèril i es van guardar a -20 °C.

L'extracció de l'ADN genòmic de les diferents laminacions dels tapisos microbians es va realitzar a partir dels 0,1 grams separats i guardats a -20 °C després del procés de laminació i caracterització microscòpica de les làmines. En les mostres recollides als estanyols d'en Cisó i el Vilar, 250 ml d'aigua de cadascuna de les fondàries es van centrifugar a 14.000 rpm durant 20 minuts i els pèl·lets obtinguts es van guardar a -20 °C. A més, en aquest cas, es van filtrar 100 ml d'aigua en filtres de 0,22 µm de porus (Durapore, Millipore) i es van guardar a -20 °C, la qual cosa ens permetria comparar els resultats obtinguts a partir de mostres centrifugades i filtrades. En les mostres del llac Gran d'Estanya es van filtrar 100 ml d'aigua de cada fondària i els filtres es van guardar a -20 °C.

L'extracció d'ADN genòmic es dugué a terme mitjançant l'ús del protocol descrit per Zhou i col·laboradors (1996), lleugerament modificat, es fa tal com s'indica:

1. Es mescla la mostra amb 1 ml de tampó d'extracció [100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA (pH 8,0); NaCl 1,5 M; CTAB 1%] i 10 μ l de lisozim (50 μ g μ l⁻¹) en un eppendorf d'1,5 ml de capacitat i incubació a 37 °C durant 1 hora (cada 15 minuts es fan inversions suaus).
2. S'hi afegeixen 5 μ l de proteinasa K (10 μ g μ l⁻¹) i 100 μ l de SDS 20% i incubació a 65 °C durant 6 hores (cada 30 minuts es fan inversions suaus).
3. Es refreden les mostres durant 10 minuts a temperatura ambient.
4. S'hi afegeixen 0,3 ml de fenol:cloroform:isoamílic (24:24:1) i s'agiten molt suaument de les mostres durant 5 minuts en un agitador oscil·lant (*table oscillant* AB-1, SBS), per a mesclar totalment el contingut dels tubs i evitar el trencament de l'ADN.
5. Se centrifuga a 14.000 rpm (*Centrifuge* 5415 C, *Eppendorf*) durant 10 minuts a temperatura ambient i es transfereix el sobrenedant a tubs nous.
6. Es repeteixen els passos 4 i 5.
7. S'hi afegeixen 0,3 ml de cloroform:isoamílic (24:1). Agitació molt suau durant 5 minuts.
8. Se centrifuga a 14.000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient i es transfereix el sobrenedant a tubs nous.
9. Es repeteixen els passos 7 i 8 dues vegades.
10. Es precipita l'ADN en 0,6 volums d'isopropanol a -20 °C durant 12 hores.
11. Se centrifuga a 14.000 rpm durant 15 minuts a 4 °C. Es retira el sobrenedant.
12. Es fa un rentat amb 1 ml d'etanol al 70% durant 5 minuts a 4 °C.
13. S'elimina el sobrenedant. Es renta amb 0,5 ml d'etanol al 70% i durant 5 minuts a 4 °C.
14. S'elimina el sobrenedant i s'asseca el pèl·let a temperatura ambient durant 1 hora.
15. Es resuspen el pèl·let en 40 μ l de 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Se solubilitza l'ADN a 55 °C durant 10 minuts.
16. Es guarda a -20°C.

Independentment del seu origen, i un cop extret l'ADN genòmic, es van fer dilucions (1/10, 1/100 i 1/1000) dels extractes. L'ADN, diluït o no, i amb electroforesi prèvia a 70V durant 45 minuts en gels d'agarosa de punt de fusió intermedi (FMC Bioproducts) a l'1% en TAE 1X (40 mM Tris acetat [pH 7,2], 1 mM d'EDTA) i posterior tinció amb bromur d'etidi (0,5 mg l⁻¹) (Sambrook *et al.*, 1989), fou visualitzat sota llum ultraviolada utilitzant una càmera digital (Kodak DC 120, Invitrogen). A partir del senyal emès per l'ADN, es quantificava la concentració final d'aquest en els extractes (Méndez-Álvarez *et al.*, 1998). A més, en el mateix pas s'observava el grau de puresa i la integritat de l'ADN dels extractes, sent més pur i menys fragmentat quan l'extracte es visualitza en forma de banda i sense fons o senyal en la resta del carril electroforètic.

II.3.6.2 PCR-RFLP

II.3.6.2.1 Optimització de la concentració de clorur magnèsic emprat en la PCR

Amb l'amplificació prèvia de l'ADN total dels sistemes estratificats estudiats, i amb la finalitat d'optimitzar la quantitat de producte amplificat, es van provar diferents concentracions de clorur magnèsic en la mescla de la reacció (apartat II.3.6.2.2) de la PCR per a amplificar els gens dels 16S ARNr bacterians, utilitzant com a patró *C. phaeobacteroides* BF 8600. El resultat obtingut es mostra en la figura II-5.

Les concentracions més òptimes de $MgCl_2$ per a amplificar per PCR aquests gens, amb els encebadors específics del domini *Bacteria* (Invitrogen) indicats en la taula II, van ser 1,5 mM de $MgCl_2$ i 1,75 mM de $MgCl_2$. Es va triar la primera, ja que és la concentració òptima trobada en altres estudis quan s'empren aquests encebadors i perquè és la més econòmica quant a la quantitat del compost utilitzat.

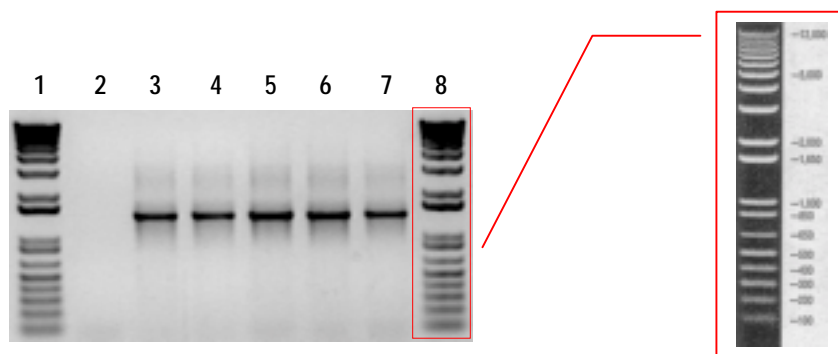


Figura II-5. Amplificació dels gens dels 16S ARNr de *C. phaeobacteroides* BF 8600 amb encebadors del domini *Bacteria* per a determinar la concentració òptima de clorur magnèsic en la reacció de PCR control positiu (negatiu). Carrils: 1 i 8, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, control negatiu; 3, 1 mM $MgCl_2$; 4, 1,25 mM $MgCl_2$; 5, 1,5 mM $MgCl_2$; 6, 1,75 mM $MgCl_2$; 7, 2 mM $MgCl_2$

II.3.6.2.2 PCR

A partir de 5-40 ng ml^{-1} d'ADN genòmic, es van amplificar els gens procariòtics dels 16S ARNr presents en les mostres d'aigua, laminacions dels tapisos microbians i mescles bacterianes. Els encebadors, la mescla de reacció i les condicions de la PCR es descriuen a continuació.

Nom	Seqüència dels encebadors	Temperatura d'unió dels encebadors	Amplificació
FORB	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	55 °C	Domini <i>Bacteria</i>
Archaea	5' TTCCGGTTGATCCTGCCGGA 3'	55 °C	Domini <i>Archaea</i>
REVB	5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'	55 °C	Domini <i>Bacteria</i> i <i>Archaea</i>

Taula II-2. Encebadors emprats per amplificar els gens procariontics dels 16S ARNr per PCR (Martínez-Murcia *et al.* 1995; Yeates *et al.* 1997)

La mescla de reacció emprada fou:

tampó PCR 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM KCl)	150 µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/µl)	15 µl
50 mM MgCl ₂	45 µl
25 mM de cada dNTP	12 µl
1% W-1	75 µl
Aigua MiliQ	923,5 µl
TOTAL	1220,5 µl

Al final es van dispensar 40 µl de la mescla de reacció en microtubs de 0,5 ml (Rubilabor). Per a arribar a reaccions amb un volum final de 50 µl, es van afegir els encebadors (200 µM de cadascun), l'ADN motlle (5-40 ng) i aigua milliQ.

El programa d'amplificació emprat fou:

(1 cicle) 94 °C 5 min
 (35 cicles) 94 °C 1 min; T^a d'unió de l'encebador 1 min ; 72 °C 2 min
 (1 cicle) 72 °C 10 min

L'observació dels productes de la PCR es va dur a terme en el mateix tipus de gel d'electroforesi emprat per visualitzar i quantificar els extractes d'ADN, tal com s'ha explicat en l'apartat II.3.6.1. El domini *Bacteria* i *Archaea* foren visualitzats en forma d'una banda de 1500 pb a partir de 2 µl i 50 µl, respectivament, del total de la reacció.

Per a obtenir més material de partida en els tapissos microbians del delta de l'Ebre que facilités la posterior reacció amb enzims de restricció i la visualització dels fragments de restricció, es van unir dues aliquotes dels productes de la PCR d'una mateixa laminació, es van evaporar i resuspendre amb un volum petit (10-20 µl). En canvi, en la resta de mostres, aquest pas fou innecessari, ja que la quantitat inicial del producte de la PCR era suficient.

II.3.6.2.3 Restricció i separació electroforètica dels fragments

Els productes de la PCR es van digerir amb els enzims de restricció descrits en la taula II-3, tal com suggeria el fabricant (Amersham). Les reaccions de restricció es van fer amb 20 U d'enzim.

Enzim	Tampó	Temperatura d'incubació (°C)	Temps d'incubació (h)	Seqüència de tall
<i>Hinf</i>	H	37 °C	2	GANTC
<i>Acl</i>	L	37 °C	2	AGCT
<i>Rsa</i>	L	37 °C	2	GTAC

Taula II-3. Condicions i enzims emprats en les reaccions de restricció dels gens dels 16S ARNr

Els fragments de restricció obtinguts a partir dels 16S ADNr amplificats van ser analitzats en gels al 3% d'agarosa MethaPhor (FMC Bioproducts) en TAE 1X a 100 V durant 3 hores. Els gels van ser visualitzats amb bromur d'etidi, tal com s'ha descrit anteriorment, i els fragments de restricció van ser analitzats amb un paquet informàtic d'anàlisi d'imatges (1D Image Analysis, Invitrogen).

II.3.6.3 PCR-DGGE

II.3.6.3.1 PCR

A partir de 5-40 ng d'ADN motlle es van fer les amplificacions per PCR de les diferents poblacions bacterianes presents al llac Gran d'Estanya, tal com es descriu en l'apartat II.3.6.2.2 d'aquest capítol, però els encebadors i les condicions d'amplificació van ser diferents. L'amplificació de les seqüències parcials dels gens dels 16S ARNr del domini *Bacteria* es va dur a terme amb els encebadors 341F-GC i 907RM (taula II-4), els quals s'uneixen a les posicions 344 i 907 d'*E. coli* (Brosius *et al.*, 1981).

Sonda	Diana	Seqüència (5'-3')	Especificitat	Referència
341F-GC ^a	341-356	CCTACGGGAGGCAGCAG	Domini <i>Bacteria</i>	Brosius <i>et al.</i> , 1981
907RM	907-926	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT	Domini <i>Bacteria</i>	Brosius <i>et al.</i> , 1981

Taula II-4. Encebadors utilitzats per amplificar seqüències parcials dels 16S ADNr de les mostres del llac Gran d'Estanya. GC^a, seqüència de 40 nucleòtids rics en GC, unida a l'extrem 5' del primer. La seqüència de la cua de GC és 5'-CGCCCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCCCCGCCC-3'

Les condicions de la PCR (Muyzer *et al.*, 1995) varen ser les que s'indiquen a continuació:

(1 cicle) 94 °C 5 min

(20 cicles) 94 °C 1 min; 65 °C 1 min (-0,5 °C/cicle); 72 °C 3 min

(15 cicles) 94 °C 1 min; 55 °C 1 min; 72 °C 3 min

(1 cicle) 72 °C 7 min

II.3.6.3.2 Separació electroforètica dels productes de la PCR per DGGE

De la mateixa mida però amb diferent composició nucleotídica, les diferents seqüències parcials dels gens del 16S ARNr obtingudes per la PCR, detallada en l'apartat anterior, es van separar per DGGE en un gradient desnaturitzant d'urea-formamida de 20%-70% (Muyzer *et al.*, 1998). Els passos per a la preparació del gel van ser els següents:

1. Es van netejar amb etanol els vidres i accessoris i es van deixar assecar.
2. Es va fer el muntatge del gel i es va comprovar que no hi hagués pèrdues.
3. Es va preparar una solució al 6% de poliacrilamida al 0% desnaturitzant i una altra al 80% (taula II-5). Es van filtrar ambdues solucions amb filtres de 0,22 µm (Millex-GP, Millipore).

Solució estoc (%)	Urea (g)	Formamida (29:1)* (ml)	Acilamida-bisacrilamida* 40% (ml)	TAE 50X (ml)	Aigua milliQ (ml)
0	0	0	7,5	1	41,5
80	16,8	16	7,5	1	41,5

Taula II-5. Composició de les solucions estoc emprades en DGGE. *Desionitzades amb una resina (*mixed bed resin*, Sigma)

4. Es va preparar el gel de carrera, de 0,75-1 mm de gruix i amb un gradient de desnaturalització de 20-70% (taula II-6), a partir de les solucions estoc (0% i 80%) i amb l'ajut d'una bomba peristàltica (flux de 5 ml min⁻¹). Es va deixar assecar durant una hora.

Gradient (%)	Estoc 0% (ml)	Estoc 80% (ml)	APS (ml)	TEMED (ml)
20	7,5	2,5	52,3	6,9
70	1,25	8,75	52,3	6,9
0*	10	0	52,3	6,9

Taula II-6. Composició de les solucions utilitzades per fer el gradient de desnaturalització. *Gel apilador

5. Es va preparar el gel apilador (taula II-6), gruix de 0,75-1 mm i gradient de desnaturalització de 0%, amb l'ajut d'una bomba peristàltica (flux de 5 ml min⁻¹), i es va deixar assecar durant una hora.
6. La separació electroforètica es va dur a terme a 60 °C en una cubeta d'electroforesi Protean II (Bio-Rad) durant 11 hores a 100 V.
7. Es va tenyir el gel amb bromur d'etidi (0,5 µg ml⁻¹) durant 30 minuts i es va destenyir amb aigua destil·lada.
8. Es va visualitzar el gel amb UV.

II.3.6.3.3 Extracció, reamplificació i seqüenciació de les bandes de DGGE

Un cop visualitzat el gel i seleccionades les bandes d'interès, aquestes es van extreure amb l'ajut d'un bisturí i es van guardar a 4 °C ON en un eppendorf d'1,5 ml on hi havien 100 µl d'aigua milliQ, amb la qual cosa es permetia la difusió de l'ADN. La suspensió d'ADN extret es va guardar a -20 °C fins que va ser reamplificat.

La reamplificació es va fer a partir de 5 µl de la suspensió d'ADN i amb els mateixos encebadors utilitzats per fer l'amplificació inicial, 341F i 907RM (taula II-4), però sense la cua de GC, per a facilitar la reacció final de seqüenciació. La quantitat de producte reamplificat es va calcular per comparació amb quantitats d'ADN conegudes (Low Mass DNA Marker, Invitrogen) en gels a l'1% d'agarosa en TAE 1X.

La reacció de seqüenciació de 50-100 ng d'ADN reamplificat es va realitzar amb els mateixos encebadors utilitzats per reamplificar-lo. La seqüència de nucleòtids es va obtenir en la direcció 5'-3' amb

nucleòtids marcats amb fluoròfors amb un equip comercial (BigDye Terminator 3.0, Applied Biosystems). Tot aquest procés es va dur a terme a l'Hospital Universitario de la Candelaria (Santa Cruz de Tenerife).

II.3.6.3.4 Anàlisi de seqüències

Les seqüències parcials dels 16S ADNr obtingudes es van comparar amb les seqüències dipositades en la base de dades del NCBI mitjançant el programa d'alineament *basic local alignment search tool* (BLAST) (Tatusova i Madden, 1999). Posteriorment, les seqüències parcials dels 16S ADNr es van afegir a una base de dades que té unes 25.000 seqüències homòlogues de l'estructura primària de 16S ARNr emprant la funció d'alineament del programa ARB (Strunk *et al.*, 1998). Les seqüències alineades van ser incorporades a un arbre base mitjançant el mètode Parsimonia del programa ARB, utilitzant com a base de dades unes 1.800 seqüències (Strunk *et al.*, 1998). El mètode Parsimonia permet introduir les noves seqüències sense canviar la topologia de l'arbre base (Ludwig *et al.*, 1998). Una vegada que l'arbre base disposava de totes les nostres seqüències, es van seleccionar les que ens interessava que apareguessin en els arbres filogenètics i la resta s'eliminaren.

II.3.6.4 FISH

Les mostres d'aigua del llac Gran d'Estanya, prèviament fixades al camp amb formaldehid al 3,7% durant 2-4 hores a 4 °C, es van concentrar en filtres de 0,22 µm (GTTP, Millipore). Els filtres es van rentar amb 10 ml de PBS 1X, es van assecat a temperatura ambient i es van guardar a -20 °C fins a ser analitzades. La hibridació amb les sondes universals i/o específiques (annex 1), marcades amb sulfoindocianina (CY3) en l'extrem 5', i el rentat posterior es van realitzar com s'indica:

1. Es van tallar els filtres en seccions i es van dipositar sobre el portaobjectes.
2. Es van afegir 8 µl del tampó d'hibridació corresponent sobre els trossos de filtre (taula II-7) i 1 µl (50 ng µl⁻¹) de la sonda que es volia hibridar (annex 1).
3. Es van incubar a la foscor durant 1,5-2 h a 46 °C en una cambra humida on hi havia el tampó d'hibridació corresponent (annex 1).
4. Es van preescalfar 40-50 ml del tampó de rentat corresponent (taula II-8) en un tub de 50 ml de capacitat en un bany a 48 °C durant 15 min.
5. Es va ficar els portaobjectes amb els trossos de filtre dintre del tub on hi havia el tampó de rentat corresponent i es van deixar incubar a 48 °C durant 15-30 min. En aquest pas els filtres es van separar del portaobjectes i van quedar submergits dintre el tampó de rentat.

6. Es van pescar els trossos de filtre i es van assecar els filtres amb paper 3 MM.

Formamida (%) en tampó d'hibridació	Formamida (μ l)	NaCl 5 M (μ l)	Tris-HCl 1 M pH 8.0 (μ l)	SDS 10% (μ l)	Aigua milliQ (μ l)
20	400	360	40	2	1.198
35	700	360	40	2	898
60	1.200	360	40	2	398

Taula II-7. Tampons d'hibridació utilitzats en FISH. Exceptuant l'SDS 10%, la resta dels components van ser filtrats amb filtres de 0,22 μ m (Millex-GP, Millipore)

Tampó de rentat	EDTA 0,5 M pH 9,0 (ml)	NaCl 5 M (ml)	Tris-HCl 1 M pH 8.0 (ml)	SDS 10% (ml)	Aigua milliQ (ml)
20	0.5	2.15	1	0.05	46.3
35	0.5	0.7	1	0.05	47.75
60	0.5	0.04	1	0.05	48.41

Taula II-8. Tampons de rentat utilitzats en FISH. Exceptuant l'SDS 10%, la resta dels components van ser filtrats amb filtres de 0,22 μ m (Millex-GP, Millipore)

7. Es van tenyir amb 10 μ l (1 μ g ml⁻¹) de DAPI durant 2-3 min.
8. Es van rentar amb aigua milliQ i es van assecar els filtres amb paper 3 MM.
9. Es van dipositar els trossos de filtre sobre un portaobjectes nou.
10. Es van afegir unes gotes de Citifluor (Citifluor Ltd.), per a evitar la pèrdua de senyal fluorescent, entre els trossos de filtre del portaobjectes i es va finalitzar el muntatge amb l'addició del cobreobjectes.
11. Es van visualitzar al microscopi de fluorescència (Axioxkop, Zeiss) amb els filtres adequats.
12. Es va fer el recompte de les cèl·lules marcades específicament amb CY3 i les cèl·lules totals marcades amb DAPI d'un mínim de 10³.

II.3.7 Anàlisi estadística

Una vegada obtinguts els patrons de bandes, per RFLP o DGGE, es van analitzar amb el programa informàtic d'anàlisi d'imatges 1D, versió 3.0 (Invitrogen). Cal destacar que els fragments de restricció més petits de 150 parells de bases van ser descartats per evitar confusions amb els possibles fragments resultants de la unió dels encebadors entre si, com a conseqüència d'una elevada homologia entre les seves seqüències (Blanc *et al.*, 1997). Llavors, cada fragment o banda va ser tractat com un únic

caràcter, puntuant la seva presència (1) i la seva absència (0). En el cas de l'anàlisi dels RFLP, per a minimitzar els efectes produïts per un mal alineament de fragments de mida idèntica, en el mateix gel i entre gels diferents, produït per imperfeccions de la mateixa tècnica, es van utilitzar uns valors de tolerància de 0,5% i 1% per a fragments de 150-900 i 900-1.500 parells de bases, respectivament. A partir de la matriu binària es va determinar la similitud dels patrons emprant el coeficient de Jaccard. La matriu de les distàncies obtinguda es va utilitzar per a aplicar el mètode d'agrupament jeràrquic *unweighted pair-group method* (UPGMA) (Sneath i Sokal, 1973), basat en distàncies euclidianes, utilitzant el paquet informàtic Systat (Systat Software Inc., Londres, Regne Unit). El mètode UPGMA permet l'agrupació de mostres diferents segons el grau de similitud existent entre si, però l'aplicació exclusiva d'aquest mètode pot donar-nos una informació errònia quan s'analitzen mostres relacionades entre si amb variables no relacionades linealment (Lessa, 1990).

Emprant la matriu de distàncies obtinguda en el pas anterior, es va fer a més l'anàlisi mètrica d'escala multidimensional o *multidimensional scaling* (MDS) (Lessa, 1990) per contrastar els resultats obtinguts pel mètode UPGMA, utilitzant el mateix paquet informàtic. L'anàlisi MDS es considera un mètode alternatiu a l'anàlisi de components principals (ACP) i a l'anàlisi factorial comuna (AF) (Arabie i Maschmayer, 1988). L'MDS és un mètode estadístic d'anàlisi per a avaluar la proximitat d'un conjunt de mostres quan només es disposa de matrius de similitud o de dissimilitud entre aquestes (<http://www.xlstat.com/119e.htm>) (Borneman *et al.*, 1996). L'objectiu de l'anàlisi és representar espacialment la proximitat entre les diferents submostres, sovint en un espai de baixa dimensió (generalment dues dimensions), revelant relacions entre les submostres i fent més fàcil la interpretació dels resultats obtinguts. Així doncs, la seva aplicació permet detectar agrupacions i subagrupacions de les mostres, d'una forma molt més acurada que el mètode UPGMA, segons el grau de similitud existent entre aquestes, pel fet de no assumir linealitat entre les variables analitzades. Els punts representats en el pla euclidià són més propers entre si com més semblants són les mostres entre si. D'altra banda, l'orientació dels eixos és arbitrària, i es poden rotar en qualsevol direcció sense alterar les distàncies entre les mostres representades (<http://www.statsoftinc.com>).

Per realitzar l'anàlisi estadística de les mostres es van seleccionar diferents proves en funció del nombre (una, dos o superior a dos), del tipus (qualitativa o quantitativa) i de la distribució (normal o lliure) de les variables a analitzar. La distribució de la variable és un factor molt important a l'hora de determinar el tipus de prova estadística a aplicar per avaluar la hipòtesi nul·la d'igualtat, de forma que quan la seva distribució és normal s'utilitzen les denominades proves paramètriques (t de Student, ANOVA, etc.) i quan la seva

distribució és lliure s'utilitzen les denominades proves no paramètriques (Kruskal-Wallis, Friedman, Mann-Whitney, etc.) (<http://www.graphpad.com>; <http://www.statsoftinc.com/textbook/>) (Sokal i Rohlf, 1983).

La *t* de Student és una prova estadística paramètrica utilitzada per comparar dos grups independents quan el que s'avalua és una variable quantitativa que presenta una distribució normal. Aquesta prova es va emprar per comparar la mitjana del nombre de fragments obtinguts a diferents fondàries d'un mateix llac (per exemple, SC5m amb SC6m) o a la mateixa fondària de llacs diferents (per exemple, SC5m i SV5m). Donat que es va realitzar la comparació dels valors mitjans, i que aquests es van obtenir almenys per duplicat, el nombre total de valors de la mostra va ser el total de valors utilitzats per calcular les mitjanes, motiu pel qual el tamany mostral va ser suficientment alt per aplicar aquesta prova.

La prova estadística no paramètrica d'anàlisi de la variància de Kruskal-Wallis s'utilitza per comparar més de dos conjunts de valors independents quan el que s'avalua és una variable quantitativa que presenta una distribució lliure. Aquesta prova es va utilitzar per comparar el nombre total de fragments obtinguts en totes les fondàries o estacions de l'any analitzades, ja que es tracta de més de dos poblacions de valors i mostres no significativament elevades. Davant d'aquest fet, el mètode de Kruskal-Wallis permet generar una subrutina *bootstrapping* de 10.000 mostres, és a dir, simula un ampli rang de mostres estadísticament significatives en base a les mostres reals que s'havien introduït inicialment.

La prova estadística no paramètrica d'anàlisi de la variància de Friedman s'utilitza per comparar mesures repetides dependents quan el que s'avalua és una variable quantitativa que presenta una distribució lliure. Aquesta prova va ser utilitzada per comparar el nombre de fragments de restricció i el nombre de bandes de DGGE obtingudes en fondària i en els diferents períodes de l'any al llac Gran d'Estanya, mitjançant la generació d'una subrutina *bootstrapping* de 10.000 mostres amb la simulació de Montecarlo. A partir d'una taula de valors reals, la simulació de Montecarlo permet generar milers de taules estadísticament possibles. Amb aquestes taules, finalment, s'obté un nombre de mostres suficientment elevat per a que diferents proves estadístiques ens permetin obtenir una probabilitat exacta.

L'anàlisi estadística del nombre de fragments de restricció i bandes de DGGE observats en fondària i al llarg del temps, realitzada amb les proves *t* de Student, Kruskal-Wallis, Friedman i la simulació de Montecarlo, la van dur a terme el Dr. Antonio Cabrera i el Dr. Armando Aguirre a l'Hospital Universitario de la Candelaria (Santa Cruz de Tenerife).

II.3.8 Número d'accés de seqüències

El número d'accés a les seqüències de nucleòtids de les seqüències utilitzades per realitzar l'anàlisi teòrica està disponible a la base de dades del Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): seqüència X53855 per a l'ADNr de *R. sphaeroides* 2.4.1, seqüència AF176322 per a l'ADNr de *B. cereus* ATCC 10876, seqüència Z49264 per a l'ADNr de *S. typhimurium* LT2 i seqüència AE000406 per a l'ADNr d'*E. coli* K-12.



III. Tapissos microbians del delta de l'Ebre

III.1 Introducció

III.1.1 Tapissos microbians

III.1.2 Distribució i localització dels tapissos microbians

III.1.3 Tapissos microbians del delta de l'Ebre

III.1.3.1 Punt de mostreig P3

III.2 Objectius

III.3 Resultats

III.3.1 Paràmetres fisicoquímics

III.3.2 Caracterització macroscòpica i microscòpica

III.3.3 Extracció d'ADN

III.3.4 Amplificació dels gens procariòtics dels 16S ARNr

III.3.5 16S ADN-RFLP

III.3.6 Anàlisi de dades

III.4 Discussió

III.5 Conclusions

III.1 Introducció

III.1.1 Tapissos microbians

Els tapissos microbians són ecosistemes bentònics estratificats localitzats, normalment, en ambients extrems, que es desenvolupen en la interfase aigua-substrat sòlid gràcies als gradients dels paràmetres fisicoquímics que s'estableixen. El gran interès d'aquestes estructures es deriva de la seva homologia amb els estromatòlits (Awramik, 1984) i del fet que, juntament amb les fonts termals marines, són avui dia exemples vius de comunitats de l'època precàmbrica (Bauld, 1984). A més, els organismes presents en els tapissos tenen importància en l'àmbit de la biotecnologia, ja que poden participar activament en la majoria de cicles biogeoquímics (Pierson *et al.*, 1999; Overmann i Van Gemerden, 2000), actuar com a destoxificadors naturals de petroli (Al-Thukair i Al-Hinai, 1993) i d'aigües residuals amb elevades concentracions de metalls pesants (Bender *et al.*, 1994) o utilitzar-se en aplicacions industrials com l'aqüicultura (Phillips *et al.*, 1994).

L'estructura, composició, fisiologia i evolució dels tapissos microbians han estat molt estudiats i àmpliament descrits (Cohen, 1989). Aquests ecosistemes habitualment presenten una estructura laminar, la qual està determinada per les variacions en fondària de diferents paràmetres fisicoquímics, com són la llum (Jorgensen, 1989), temperatura (Skirnisdottir *et al.*, 2000), salinitat (Thomas, 1984), etc. No obstant això, també es poden trobar tapissos microbians no laminats (Guerrero *et al.*, 1993a; Mir *et al.*, 1991, Minz *et al.*, 1999a-b). En els tapissos microbians laminars, el gradient d'un dels paràmetres clau, com és la llum, determina el desenvolupament i el tipus d'organisme fototròfic que es podrà adaptar millor en cada punt al llarg del seu perfil vertical. La distribució específica d'aquestes poblacions fototròfiques, amb els seus pigments corresponents, determina una de les característiques típiques dels tapissos microbians, com és la coloració en cadascuna d'aquestes làmines.

Els tapissos microbians es troben majoritàriament en ambients extrems. En aquests ecosistemes, i malgrat que els paràmetres fisicoquímics determinen els organismes que es troben en cada punt del tapís microbià, la presència de condicions restrictives d'intensitat de llum, elevades temperatures, salinitat, dessecació, etc., determina que, en la majoria dels casos i per poder sobreviure, els organismes hagin hagut d'adaptar la seva fisiologia, alternant el seu metabolisme primari amb altres estratègies fisiològiques. Entre aquestes estratègies podem trobar poblacions que augmenten la quantitat de pigments per cèl·lula per optimitzar el procés fotosintètic (Broch-Due *et al.*, 1978); altres acumulen pigments intracel·lularment o

extracel·lularment com l'escitonemina o els β -carotens per protegir-se d'elevats nivells de radiació solar (García-Pichel i Castenholz, 1991), i algunes afavoreixen metabolismes secundaris o alternatius per viure sota condicions d'extrema salinitat (Thomas, 1984). En altres casos, quan les condicions són extremadament restrictives, la supervivència dels organismes és afavorida per la formació d'una estructura més compacta, en forma de crosta (figura I-1). La compactació del tapís incrementa la resistència davant



Figura I-1. Macroestructura dels tapissos microbians del delta de l'Ebre

alguns dels paràmetres que més poden afectar els organismes que hi viuen, com és la sequera, i, a la vegada, aquesta estructura és un inòcul per quan les condicions de l'ecosistema es tornen més favorables. Aquesta estructura es manté i s'estabilitza per la presència d'exopolímers excretats per *Microcoleus chthonoplastes* i d'altres organismes (D'Amelio *et al.*, 1987) i per inclusions citoplasmàtiques de biopolímers (Mas-Castellà, 1991; Macarrón, 1998). En aquestes situacions, els biopolímers són utilitzats pels organismes que integren el sistema com a font d'energia, carboni i nitrogen (Jensen i Sicko, 1971).

L'estructura dels tapissos microbians evoluciona en funció, entre d'altres factors, de les condicions extremes en què es desenvolupen i de la capacitat adaptativa a escala fisiològica dels organismes que els integren (Antón *et al.*, 2000; Nübel *et al.*, 2000). Així doncs, per exemple, quan la salinitat és alta, els cianobacteris coccoïdals són els majoritaris i els tapissos formats tenen consistència gelatinosa, mentre que amb salinitat baixa els tapissos presenten graus de compactació i laminació superiors a causa de l'entramat que formen els cianobacteris filamentosos com *M. chthonoplastes* i alguns cianobacteris coccoïdals (Thomas, 1984). El grau de compactació entre els organismes i les partícules de sediment que els envolten, principalment sorra fina, argiles i llims, determina el seu drenatge, la seva capacitat de retenció d'aigua, d'intercanvi catiónic i d'aireació, i això els proporciona entre d'altres funcions, la capacitat d'evitar l'erosió del terreny (Grant i Gust, 1987; Parsiegla *et al.*, 1994; Rampone *et al.*, 1993) provocada per diferents factors, com són el vent, corrents marítims, canals d'aigua, ones, etc. (figura I-2).

En els darrers vint-i-cinc anys, els coneixements sobre els tapissos microbians s'han incrementat significativament perquè s'ha dut a terme la millora de tècniques com la microscòpia electrònica (Stal *et al.*, 1985), els microelèctrodes (Revsbech i Jorgensen, 1986) i la fibra microòptica (Pierson *et al.*, 1987). L'aplicació d'aquestes tècniques ha permès, entre altres coses, mesurar gradients químics *in situ*, fer estudis de distribució espectral de la llum i estudiar l'estructura i la composició de les comunitats

microbianes i les relacions interespecífiques i intraespecífiques (Brune *et al.*, 2000; Overmann i Van Gemerden, 2000).



Figura I-2. Estabilització del sediment del delta de l'Ebre pels tapissos microbians enfront els canals d'aigua

III.1.2 Distribució i localització dels tapissos microbians

En el món, la distribució dels tapissos microbians es concentra en ambients salins o hipersalins en zones litorals (Esteve *et al.*, 1992; Martínez-Alonso, 1997; Mir *et al.*, 1991), fonts termals terrestres i marines riques en sulfur d'hidrogen (Ferris i Ward, 1997; Jannasch, 2000; Moyer *et al.*, 1995; Teske *et al.*, 2000), fonts sulfuroses (Martínez *et al.*, 1997), deserts càlids (Novichkova-Ivanova, 1980), llacs alcalins o antàrtics (Cohen, 1989) i en els cràters d'alguns volcans, com el Kilauea a Hawaii (Esteve *et al.*, 1992).

En el territori espanyol, tant a la península Ibèrica com a les illes Canàries, la distribució dels tapissos microbians és molt àmplia, i n'hi ha al voltant de vint zones descrites fins al moment (Esteve *et al.*, 1992). A la regió mediterrània hi ha sis localitzacions on els tapissos microbians han estat descrits i caracteritzats: les salines de San Rafael (Almeria), les salines del cap de Gata (Almeria), la llacuna del cap de Gata (Almeria), les salines Bonmatí de Santa Pola (Alacant), les salines de la Trinitat (Tarragona) i la font de la Puda (Girona).

III.1.3 Tapissos microbians del delta de l'Ebre

Descrits en diferents treballs (Esteve *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1993a; Mir *et al.*, 1991), i localitzats majoritàriament a la península dels Alfacs, els tapissos microbians del delta de l'Ebre són ecosistemes estratificats bentònics que es troben periòdicament inundats i protegits de mar obert per barreres superficials, com les dunes fixades per la vegetació. L'anàlisi de la distribució geogràfica dels tapissos microbians en aquest delta duta a terme per Rampone i col·laboradors (1993) ha permès descriure una de les extensions més grans de tapissos trobades fins al moment al món (figura III-3).

L'anàlisi de la diversitat estructural d'aquests tapissos ha permès classificar-los en cinc tipus diferents, en funció dels organismes dominants que s'hi troben (Guerrero *et al.*, 1993a). En els de tipus I, els tapissos estan poc desenvolupats (formats per una làmina molt prima de filaments entrecuats de cianobacteris que pertanyen majoritàriament a una sola espècie) i estan dominats per *Lyngbya*; l'absència dels bacteris fototròfics anoxigènics del sofre i el poc gruix del sediment negre en són les característiques més diferencials. Els de tipus II i III, dominats respectivament per *Spirulina* i *Oscillatoria*, són poc habituals al delta de l'Ebre. Els de tipus III presenten habitualment una làmina roja deguda als bacteris fototròfics anoxigènics vermells del sofre de la família *Chromatiaceae*. *Lyngbya* i *Microcoleus* coexisteixen en proporcions similars en els de tipus IV, on es pot trobar la làmina de color roig poc gruixuda i sediment negre molt gruixut. L'últim grup, el V, on s'inclouen els tapissos més ben desenvolupats (caracteritzats per la presència de nombroses laminacions que presenten diferent coloració) i dominats per *Microcoleus*, es troben en llocs on les condicions són força estables.



Figura III-3. Vista de la gran extensió dels tapissos microbians del delta de l'Ebre

Al llarg dels anys, l'estudi dels tapissos microbians del delta de l'Ebre amb tècniques clàssiques ha permès: caracteritzar els paràmetres fisicoquímics que s'estableixen al llarg dels seus perfils verticals (Martínez-Alonso, 1997; Mir, 1997), investigar l'ecofisiologia de les poblacions bacterianes (Martínez-Alonso, 1997; Mir, 1997; Navarrete *et al.*, 2000), aprofundir en el coneixement de l'estructura i la biodiversitat de les comunitats (Martínez-Alonso, 1997; Mir *et al.*, 2000; Navarrete, 1999; Solé *et al.*, 2001), mesurar la producció i l'acumulació de materials de reserva (Mas-Castellà, 1991; Navarrete, 1999), determinar la biomassa present amb marcadors com són el nitrogen, carboni orgànic, sofre i pigments (Mir, 1997; Navarrete, 1999), etc. Més recentment, amb l'aplicació de tècniques moleculars basades en l'estudi de marcadors lipídics, s'ha aconseguit obtenir informació complementària sobre l'estructura dels tapissos, la biomassa de les poblacions bacterianes i el seu estat nutricional (Macarrón, 1998; Navarrete, 1999).

A més, cal destacar que l'estudi dels tapissos microbians del delta de l'Ebre mitjançant microscòpia electrònica de transmissió i de rastreig ha permès descriure la presència d'organismes molt interessants des del punt de vista evolutiu, com és *Spirosymplokos deltaeiberi* (Guerrero *et al.*, 1993b), i fisiològic, com és *Titanospirillum velox* (Guerrero *et al.*, 1999).

III.1.3.1 Punt de mostreig P3

Descrits en el punt de mostreig P3 (figura II-1, C) (Mir *et al.*, 1991), i molt sovint inundats amb 2-5 cm d'aigua superficial, els tapissos microbians de tipus IV han estat uns dels més estudiats a causa de l'elevat grau de desenvolupament que presenten.

La taxa de creixement dels tapissos microbians en aquest punt és de $0,43 \pm 0,03$ mm per any (Sánchez-Cabeza *et al.*, 1999) i, normalment, s'observen tres capes acolorides en la seva estratificació vertical i sediment negre en la part inferior (Esteve *et al.*, 1992; Mir *et al.*, 1991). En la capa superior, de color marró groguenc i de 0-1,5 mm de gruix, diatomees com *Nitzschia*, *Navicula*, *Amphora* i cianobacteris coccoïdals (*Gloeocapsa*) són els dominants. La segona capa, de color verd fosc i de 0,5-2 mm de gruix, està dominada per *M. chthonoplastes* i s'hi troben alguns cianobacteris coccoïdals i filaments de *Lyngbya aestuarii*. En la tercera capa, de 0,5-1,5 mm de gruix i de color roig-taronja, els organismes majoritaris són els bacteris fototròfics anoxigènics, però *M. chthonoplastes* i alguns cianobacteris coccoïdals també hi són presents. Per sota d'aquesta laminació, quan la concentració de sulfur d'hidrogen és alta, la llum incident és molt baixa i l'oxigen és absent, podem trobar-ne una altra laminació de color verd on els organismes dominants pertanyen a la família *Chlorobiaceae* (Guerrero *et al.*, 1993a). En el sediment negre del fons, els

bacteris sulfatoreductors són els predominants. La seva activitat sulfatoreductora i la formació de precipitats de sulfur de ferro determina la seva coloració (Mir *et al.*, 1991). No obstant això, cal ressaltar que al llarg de tot el perfil vertical dels tapissos s'observen morfologies molt diverses d'organismes heterotròfics no identificats (Martínez-Alonso, 1997; Mir *et al.*, 1991).

La correlació existent entre els pigments presents en cadascuna d'aquestes laminacions acolorides i els organismes fototròfics dominants que hi viuen ha permès estudiar la distribució espaciotemporal de les diferents poblacions (Esteve *et al.*, 1992; Martínez-Alonso, 1997; Mir *et al.*, 1991). Així doncs, i associada a la presència de diatomees i de cianobacteris, la Chl *a* es localitza majoritàriament en la capa de color verd fosc, encara que a més baixa concentració es troba distribuïda al llarg de tot el perfil vertical del tapís. De la mateixa manera, la Bchl *a* es localitza principalment en una de les làmines, la roja, per la presència majoritària dels bacteris fototròfics anoxigènics, però també és detectada en la laminació verda i en menys quantitat en el sediment negre. En el sediment negre es troben també, encara que a molt baixes concentracions, tots els pigments trobats i caracteritzats a tota la zona pigmentada del tapís microbià (Martínez-Alonso, 1997; Mir *et al.*, 1991). Els màxims d'ambdós pigments, Chl *a* i Bchl *a*, a més d'estar separats en l'espai, ho estan en el temps, cosa que indica que la variació estacional dels paràmetres fisicoquímics afecta l'estructura del tapís i, a la vegada, les poblacions que s'hi troben (Martínez-Alonso, 1997). Els màxims de Chl *a* es troben entre agost i octubre, i els màxims de Bchl *a* es detecten els mesos de juny i juliol. La presència constant durant l'estiu i a l'inici de la tardor d'aigua superficial en els tapissos (Martínez-Alonso, 1997), la qual dificulta la difusió d'oxigen cap a dintre dels tapissos, afavoreix el desenvolupament d'una zona anaeròbica i el creixement subseqüent dels bacteris fototròfics anoxigènics en aquesta època de l'any (De Wit i Van Gemerden, 1989).

III.2 Objectius

Als tapissos microbians del delta de l'Ebre, l'aplicació de tècniques clàssiques i/o, més recentment, marcadors lipídics ha permès estudiar canvis estructurals (Guerrero *et al.*, 1993a), la diversitat microbiana, les interrelacions poblacionals i la distribució espaciotemporal d'aquestes poblacions (Guerrero *et al.*, 1993a; Martínez-Alonso, 1997; Mir, 1997). En la realització d'aquest treball s'ha aplicat per primera vegada, i de forma combinada amb la microscòpia òptica, una tècnica de biologia molecular basada en l'anàlisi dels gens procariòtics dels 16S ARNr presents als tapissos microbians del delta de l'Ebre. Els objectius principals que ens vam marcar van ser:

1. Determinar si hi ha canvis al llarg del temps en l'estructura genètica de les poblacions dominants procariòtiques presents en els tapissos microbians del delta de l'Ebre per anàlisi dels patrons dels 16S ADNr-RFLP.
2. Comparar els resultats observats per microscòpia òptica amb els obtinguts per l'anàlisi dels patrons dels 16S ADNr-RFLP.

III.3 Resultats

L'aplicació combinada de la microscòpia òptica i l'anàlisi dels gens procariòtics dels 16S ARNr presents als tapissos microbians del delta de l'Ebre han estat de gran utilitat per a descriure els canvis poblacionals que es donen en l'espai i en el temps en aquests sistemes estratificats bentònics (Ramírez-Moreno *et al.*, 2003). En aquest capítol es descriuen les diferències estructurals (nombre, gruix i coloració de les diferents laminacions) observades en fondària en aquests sistemes estratificats al llarg d'un cicle anual, les poblacions predominants en cadascuna de les diferents laminacions i dies de mostreig i, finalment, les variacions genètiques derivades de l'anàlisi dels ADNr-RFLP.

III.3.1 Paràmetres físico-químics

La conductivitat, salinitat i temperatura de l'aigua de mar i de l'aigua superficial que cobria els tapissos van ser dades complementàries que es van mesurar en cadascun dels mostresos per a obtenir informació addicional a l'hora d'interpretar tots els resultats. En la taula III-1 es mostren els valors dels diferents paràmetres.

Dies de mostreig	Temperatura (°C)	Intensitat de llum (klx)	Salinitat (‰)	Conductivitat (mS · cm ⁻¹)
28/04/97	22,5 ^a	23,3 ^a	27 ^a	40 ^a
07/07/97	32 ^a	97,5 ^a	36 ^a	58 ^a
	35 ^b	80,2 ^b	>40 ^b	>50 ^b
16/10/97	26 ^a	23,2 ^a	27 ^a	47 ^a
	28 ^b	18,5 ^b	36 ^b	55 ^b
19/01/98	17 ^a	3,5 ^a	23,5 ^a	42 ^a

Taula III-1. Valors de conductivitat, salinitat i temperatura en l'aigua de mar (^a) i en l'aigua superficial (^b) que cobreix els tapissos microbians del delta de l'Ebre. En les mostres de primavera i hivern els valors dels diferents paràmetres no van ser determinats a causa de la manca d'aigua superficial

Les dades meteorològiques dels dos anys consecutius que va durar l'estudi van ser facilitades per la Direcció General de Qualitat Ambiental del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya, a partir dels valors de l'estació meteorològica d'Amposta (annexos 2 i 3). En aquests dos anys, la zona d'estudi va gaudir de les condicions climàtiques típiques de l'àrea mediterrània en què es troba, caracteritzada per temperatures i índex d'irradiació més alts a l'estiu que a la resta d'estacions i per un hivern amb temperatura més baixa i humitat relativa i quantitat de pluja més elevades. En contrapartida a aquestes dues estacions més marcades, trobem un comportament intermedi a la primavera i la tardor.

III.3.2 Caracterització macroscòpica i microscòpica

Els resultats de la caracterització microscòpica i macroscòpica dels tapissos microbians del delta de l'Ebre es mostren en la figura III-4 i la taula III-2, respectivament.

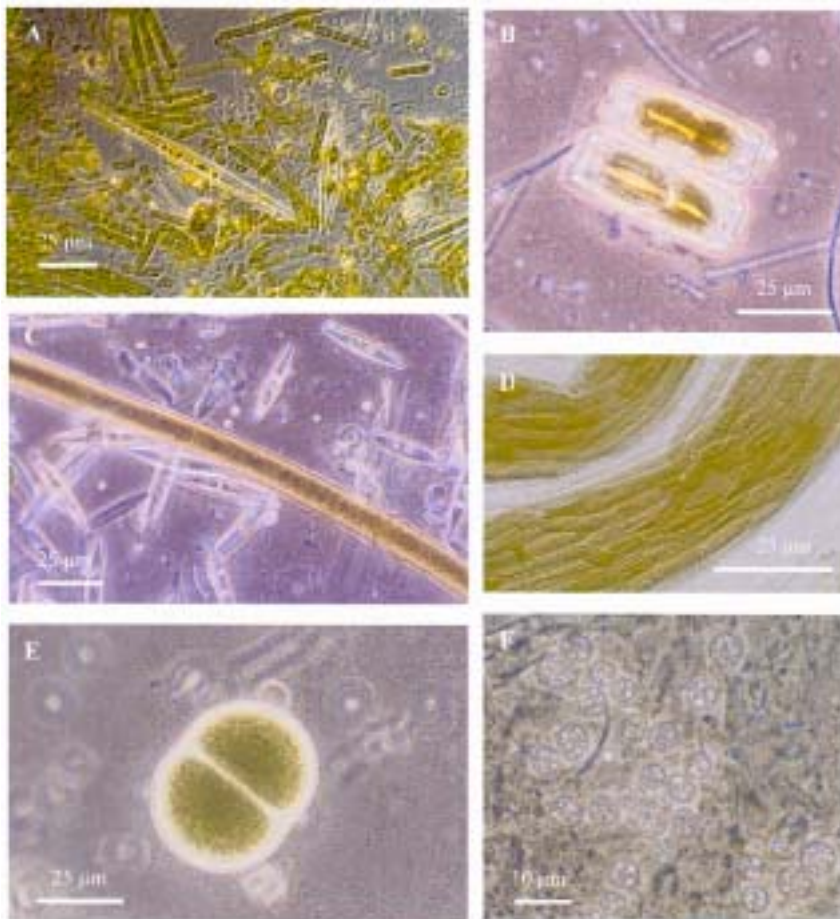


Figura III-4. Caracterització microscòpica dels microorganismes presents en les laminacions dels tapissos microbians del delta de l'Ebre. A, *Nitzschia sigma*; B, *Navicula sp.*; C, *Lyngbya aestuarii*; D, *Microcoleus chthonoplastes*; E, *Chroococcus sp.*; F, bacteri fototròfic anoxigènic

Mostra	Laminacions		Caracterització microscòpica
	Color (codi)	Gruix (mm)	Microorganismes dominants
S (primavera)	verd (S1)	0,72	<i>Gyrodinium sp.</i> , <i>Lyngbya aestuarii</i> , <i>Microcoleus chthonoplastes</i> ,
	negre (S2)	2	Bacteris heterotròfics
	negre (S3)	2	Bacteris heterotròfics
	negre (S4)	2,4	Bacteris heterotròfics
Su (estiu)	marró (Su5)	3,64	<i>Nitzschia sp.</i> , <i>Navicula sp.</i> , <i>Amphora sp.</i> , rotífers, <i>Lyngbya aestuarii</i> , cianobacteris unicel·lulars
	verd (Su6)	2,44	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>
	roig (Su7)	0,50	<i>Chromatium-like</i>
	negre (Su8)	1,44	Bacteris heterotròfics
	A (tardor)	verd fosc (A9)	0,37
A (tardor)	verd (A10)	0,36	<i>Microcoleus chthonoplastes</i> ,
	roig (A11)	0,48	<i>Chromatium-like</i>
	negre (A12)	1,6	Bacteris heterotròfics
	negre (A13)	1,6	Bacteris heterotròfics
	negre (A14)	2	Bacteris heterotròfics
W (hivern)	marró (W15)	0,21	<i>Lyngbya aestuarii</i>
	verd (W16)	0,71	<i>Microcoleus chthonoplastes</i> , cianobacteris unicel·lulars
	roig (W17)	1,36	<i>Chromatium-like</i>
	negre (W18)	2	Bacteris heterotròfics
	negre (W19)	2	Bacteris heterotròfics

Taula III-2. Caracterització macroscòpica de les laminacions dels tapissos microbians del delta de l'Ebre

Tal i com queda reflectit en la taula III-2, la zona pigmentada dels tapissos microbians del delta de l'Ebre va anar variant en gruix (entre 0,72 mm a la primavera i 6,58 mm a l'estiu) i en nombre de laminacions (entre 1 a la primavera i 3 a l'estiu i l'hivern) en funció de l'estació de l'any analitzada. La coloració de les diferents laminacions, tant la verda, com la roja, la negra o la marró, depenia del tipus d'organismes predominants en cada una. Mentre que en les laminacions verdes i marrons els organismes dominants van ser els oxigènics, en les laminacions roges i el sediment negre van ser, respectivament, els fototròfics anoxigènics i els bacteris heterotròfics.

III.3.3 Extracció d'ADN

L'extracció d'ADN genòmic de les diferents laminacions dels tapissos microbians i de les soques tipus es va visualitzar en forma d'una banda superior de 23 kb, tal com es mostra a la figura III-5. En aquesta figura es pot observar que els carrils més bruts, amb més soroll de fons, eren els que pertanyien als extractes crus obtinguts a partir de les laminacions del sediment negre, tant de les mostres de tardor com d'hivern (A12, A13, A14, W18 i W19). Per a minimitzar la presència en aquests extractes bruts de restes cel·lulars i possibles inhibidors de la PCR, aquests es van diluir abans d'amplificar els gens procariòtics dels 16S ARNr.

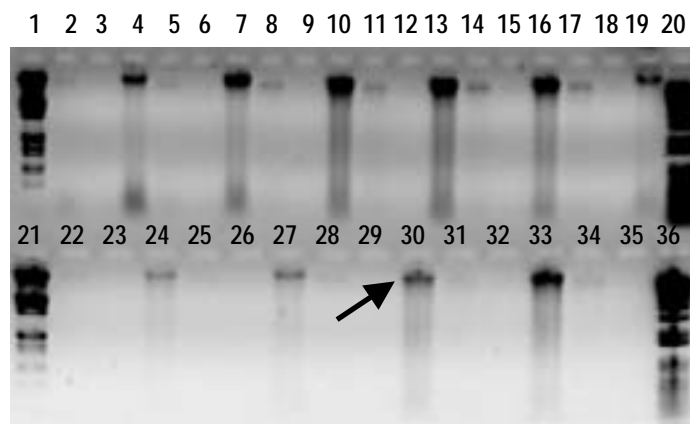


Figura III-5. Extraccions d'ADN genòmic de les diferents laminacions i dies de mostreig dels tapissos microbians del delta de l'Ebre visualitzades en un gel d'electroforesi (negatiu). Carrils: 1, 20, 21 i 36 (marcador de pes molecular III de la Boehringer Mannheim); 4, 7, 10, 13, 16, 19, 24, 27, 30 i 33 (dilució 1/10); 2, 5, 8, 11, 14, 17, 22, 25, 28, 31 i 34 (dilució 1/100); 3, 6, 9, 12, 15, 18, 23, 26, 29, 32 i 35 (dilució 1/1000). Distribució de les mostres en el gel: A9 (carrils 2-3); A10 (carrils 4-6); A11 (carrils 7-9); A12 (carrils 10-12); A13 (carrils 13-15); A14 (carrils 16-18); W15 (carrils 19, 22-23); W16 (carrils 24-26); W17 (carrils 27-29); W18 (carrils 30-32) i W19 (carrils 33-35). La fletxa senyala la banda d'ADN genòmic obtinguda per a la mostra W18m

III.3.4 Amplificació dels gens procariòtics dels 16S ARNr

Els dominis *Bacteria* i *Archaea* es van detectar en totes les estacions de l'any analitzades, en forma de banda de 1.500 pb (figura III-7). Mentre que el domini *Bacteria* es va detectar en totes les mostres i laminacions, el domini *Archaea* va ser present en totes les mostres però fou localitzat només en el sediment negre (S4, Su8, A12-14 i W18-19).

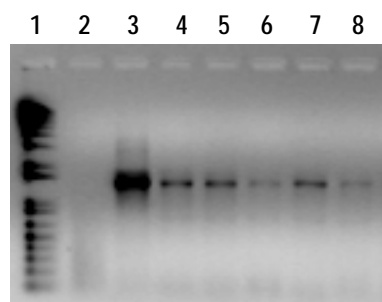


Figura III-7. Amplificacions dels gens dels 16S ARNr, amb encebadors específics per al domini *Bacteria*, de les laminacions de la mostra d'hivern (W) dels tapissos microbians del delta de l'Ebre (negatiu) . Carrils: 1, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, control negatiu; 3, control positiu (*Chlorobium phaeobacteroides* BF 8600); 4 , W15; 5, W16; 6, W17; 7, W18; 8, W19. La fletxa indica la banda de 1.500 pb corresponent als 16S ADNr amplificats

III.3.5 16S ADNr-RFLP

Després d'amplificar per PCR els gens dels 16S ARNr, els productes amplificats van ser digerits amb els enzims de restricció tetramèrics *RsaI*, *HinI* i *AluI*. Cal ressaltar que la quantitat inicial de producte de la PCR obtinguda per al domini *Archaea* fou insuficient per a ser posteriorment visualitzats i, per tant, analitzats els RFLP. En canvi, el nombre de fragments de restricció i la representació esquemàtica dels 16S ADNr-RFLP bacterians obtinguts en cadascuna de les laminacions analitzades es mostren en la taula III-3 i la figura III-8. En la figura III-9 es mostren dos gels amb els patrons de restricció obtinguts amb els enzims de restricció *HinI* i *RsaI*, en les mostres d'hivern i primavera.

Color	Laminacions	<i>RsaI</i>	<i>HinI</i>	<i>AluI</i>	Total
verd	S1	13	13	14	40
negre	S2	13	11	12	36
negre	S3	7	12	9	28
negre	S4	10	14	9	33
marró	Su5	4	4	3	11
verd	Su6	8	4	8	20
roig	Su7	9	3	8	20
negre	Su8	9	9	7	25
verd fosc	A9	14	14	13	41
verd	A10	12	12	11	35
roig	A11	14	8	12	34
negre	A12	10	8	14	32
negre	A13	11	10	9	30
negre	A14	11	9	9	29
marró	W15	11	14	18	43
verd	W16	10	14	13	37
roig	W17	10	10	12	32
negre	W18	10	14	13	37
negre	W19	8	13	12	33

Taula III-3. Nombre de fragments dels 16S ADNr bacterians per restricció amb els enzims *RsaI*, *HinI* i *AluI*

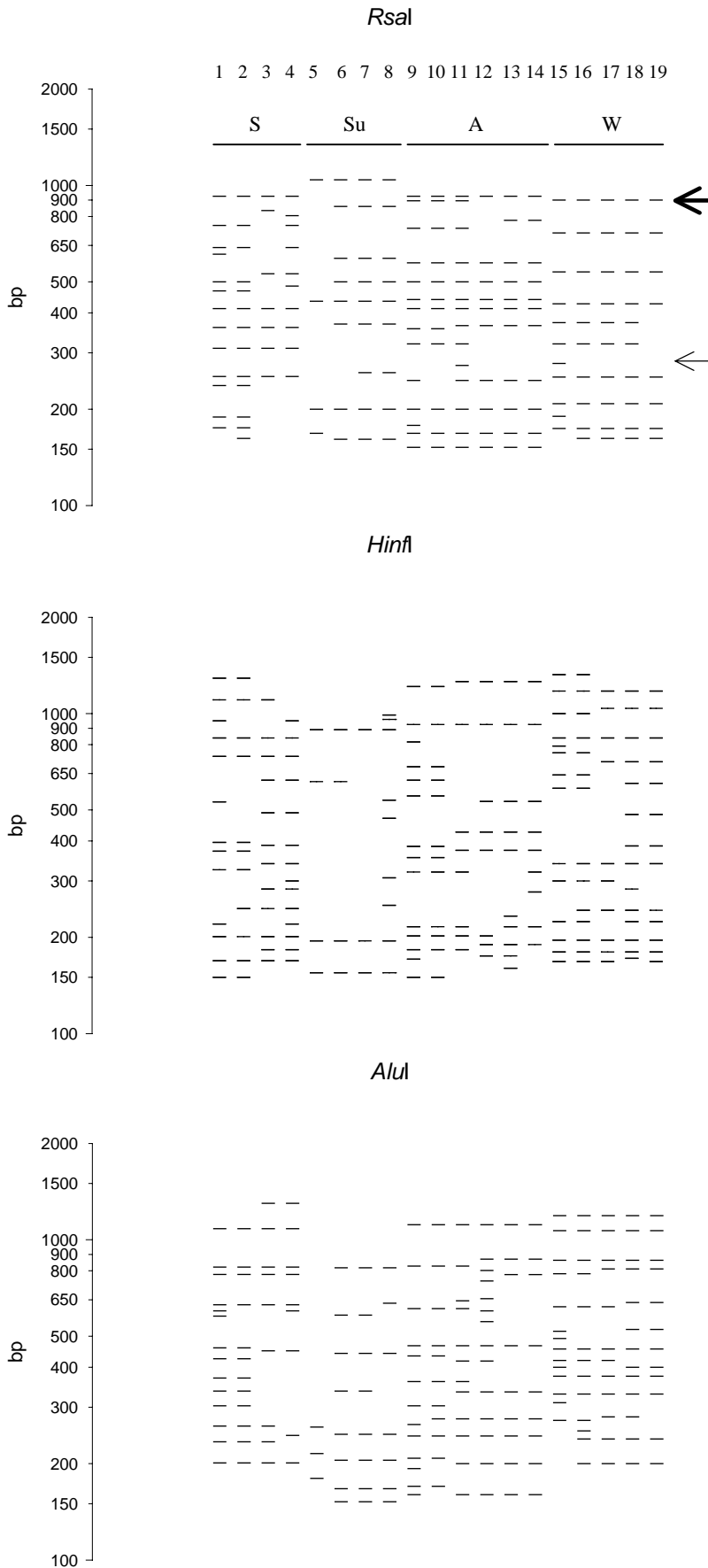


Figura III-8. Distribució estacional i en fondària dels 16S ADNr-RFLP bacterians a la primavera (S), estiu (Su), tardor (A) i hivern (W) després de realitzar digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AluI*. Carrils: 1, S1; 2, S2; 3, S3; 4, S4; 5, Su5; 6, Su6; 7, Su7; 8, Su8; 9, A9; 10, A10; 11, A11; 12, A12; 13, A13; 14, A14; 15, W15; 16, W16; 17, W17; 18, W18; 19, W19. Hi ha alguns fragments comuns a totes les laminacions d'una mateixa mostra (fletxa gruixuda per a la mostra W) i d'altres específics (fletxa prima per a la mostra W)

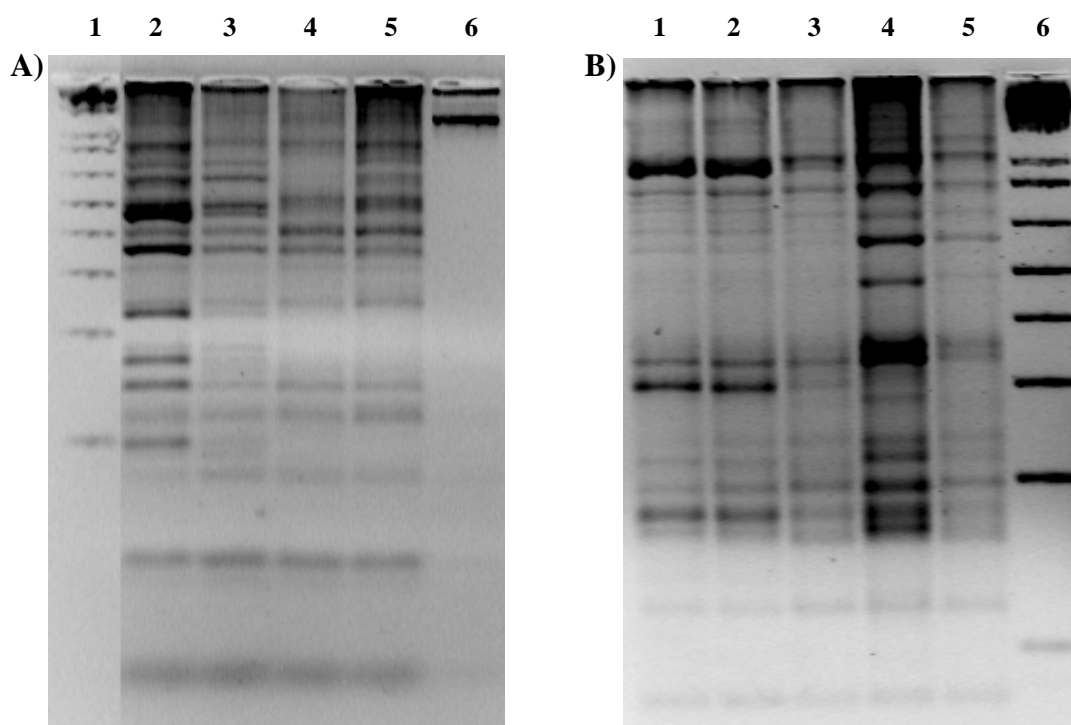


Figura III-9. Patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians de primavera (S) i hivern (W) als tapissos microbians del delta de l'Ebre després de digerir amb els enzims de restricció *RsaI* i *HinfI* (negatiu). A) Digestions amb *RsaI*. Carrils: 1, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (MW) (Invitrogen); 2, S1; 3, S2; 4, S3; 5, S4; 6, control negatiu de la digestió. B) Digestions amb *HinfI*. Carrils: 1, W15; 2, W16; 3, W17; 4, W18; 5, W19; 6, MW

La comparació del nombre total de fragments de restricció bacterians obtinguts en les quatre mostres estacionals mostrava una diferenciació clara entre la mostra d'estiu i la resta d'estacions (taula III-3). En la zona pigmentada de la mostra d'estiu, el nombre total de fragments de restricció detectats fou molt inferior al de la resta d'estacions de l'any. Aquest fet s'evidencià més en la part superficial del tapís on el nombre de fragments de restricció detectats a l'estiu va ser d'onze fragments, mentre que en la resta d'estacions de l'any variava entre 40 fragments en la mostra de primavera i 43 en la mostra d'hivern. A més, cal destacar que, mentre que el nombre total de fragments de restricció va incrementar en fondària a l'estiu, en la resta d'estacions aquest disminuïa. En la mostra de la tardor, però, aquesta disminució en fondària fou més evident que en la resta d'estacions de l'any. Finalment, també cal dir que el nombre total de fragments en el sediment negre de la primavera, tardor i hivern es mantenia amb un nombre de bandes alt i relativament constant dintre de cadascuna de les mostres estacionals. A l'estiu, l'única mostra

analitzada presentava un nombre de fragments més baix. Tot i les diferències en fondària en cadascuna de les mostres estacionals analitzades, quant al nombre total de fragments de restricció observats en cadascuna de les laminacions, en tots els mostrejos es van detectar fragments comuns entre totes les laminacions i fragments específics en alguna de les laminacions (figura III-8).

III.3.6 Anàlisi de dades

Una vegada obtinguts els patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians en les diferents mostres estacionals dels tapissos microbians, la presència o absència dels fragments en cadascun d'aquests ens va servir de base per a obtenir una matriu binària, a partir de la qual es va calcular la similitud dels patrons de bandes emprant el coeficient de Jaccard, tal com s'indica en l'apartat II.3.7. La matriu de les distàncies obtinguda es va utilitzar per a representar gràficament l'agrupació de les mostres segons la seva dissimilitud o similitud amb els mètodes UPGMA (figura III-10) i MDS (figura III-11), respectivament.

Quan les mostres van ser analitzades pel mètode UPGMA, aquestes es van agrupar en quatre grups o *clusters* diferents en funció del dia de mostreig o, el que és el mateix, de l'estacionalitat (figura III-10). L'anàlisi per separat de cadascun d'aquests agrupaments estacionals ens indicava que entre algunes de les laminacions que els componen hi havia una similitud elevada. A l'hivern, l'estiu i la tardor les submostres de la zona pigmentada del tapís (W15-17, Su5-7, A9-11) quedaven separades de les de la zona afòtica (W18-19, Su8, A12-14), mentre que la distribució de les diferents submostres no seguia el mateix patró a la primavera. Cal ressaltar també que, a diferència de la resta d'estacions, només en un dels mostrejos, el de tardor, les submostres de la part oxigènica (formada per les laminacions de color marró, verd i verd fosc) quedaven completament separades de les de la part anoxigènica (formada per les laminacions roges i el sediment negre). Aquest fet va passar perquè sempre s'hi trobaven laminacions amb característiques o propietats intermèdies (S2, Su7 i W17) que feien impossible aquesta separació de les mostres. A l'estiu, la submostra dominada per diatomees, la Su5, quedava molt separada de la resta de submostres, tant oxigèniques com anoxigèniques.

En el mapa MDS (figura III-11), on les mostres s'agrupen segons el grau de similitud existent entre aquestes i es representen en un pla euclidià, els resultats obtinguts foren similars als visualitzats en el dendrograma. Es diferenciaven 4 *clusters* segons el dia de mostreig o l'estacionalitat i, a més a més, hi havia diferents subagrupaments dintre de cadascun dels dies de mostreig. La distribució de les diferents submostres a l'hivern, però, mostrava una petita diferència respecte a la que es va observar en el dendrograma, mentre que a la resta d'estacions de l'any es mantenien similars. En aquest cas, les

submostres de la part oxigènica (W15-16) del tapís microbià de la mostra d'hivern quedaven completament separades de les submostres de la part anoxigènica (W17-19), igual que succeïa a la tardor.

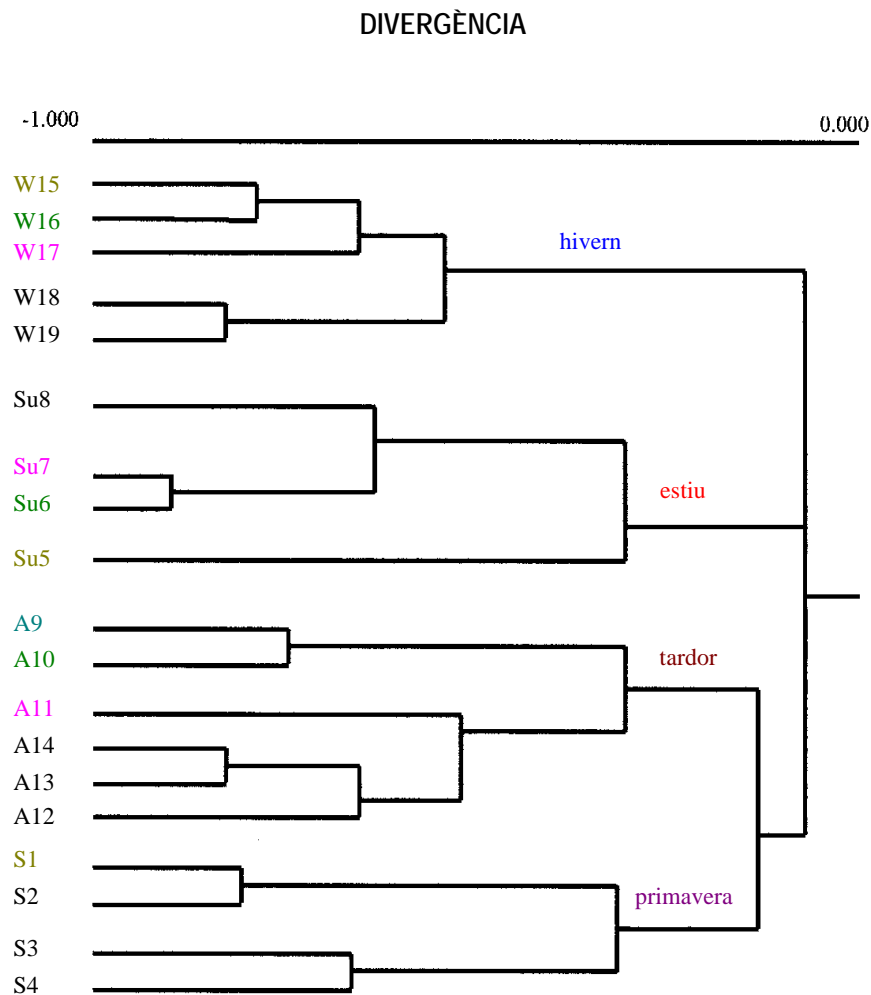


Figura III-10. Dendrograma de dissimilitud dels 16S DNAr-RFLP de les comunitats bacterianes presents als tapissos microbians del delta de l'Ebre per anàlisi de la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinI* i *AluI* amb el mètode UPGMA. L'anàlisi de grups està basada en les distàncies euclidianes quadrades com a mesura de la dissimilitud genètica utilitzant el mètode d'unió per mitjanes o *average linkage method*. El color de cadascuna de les laminacions és el color amb el qual s'han escrit els seus codis

Després de ser analitzat i comparat, amb la prova de Kruskal-Wallis, el nombre total de fragments de restricció obtinguts en les diferents estacions de l'any mostrà diferències estadísticament significatives, amb un valor exacte de 0,008. Dintre de cada estació de l'any, en canvi, les diferències no foren significatives quan aquest nombre va ser comparat en fondària (valors de significació exacta a la primavera, estiu, tardor i hivern de 0,176, 0,216, 0,211 i 0,449, respectivament).

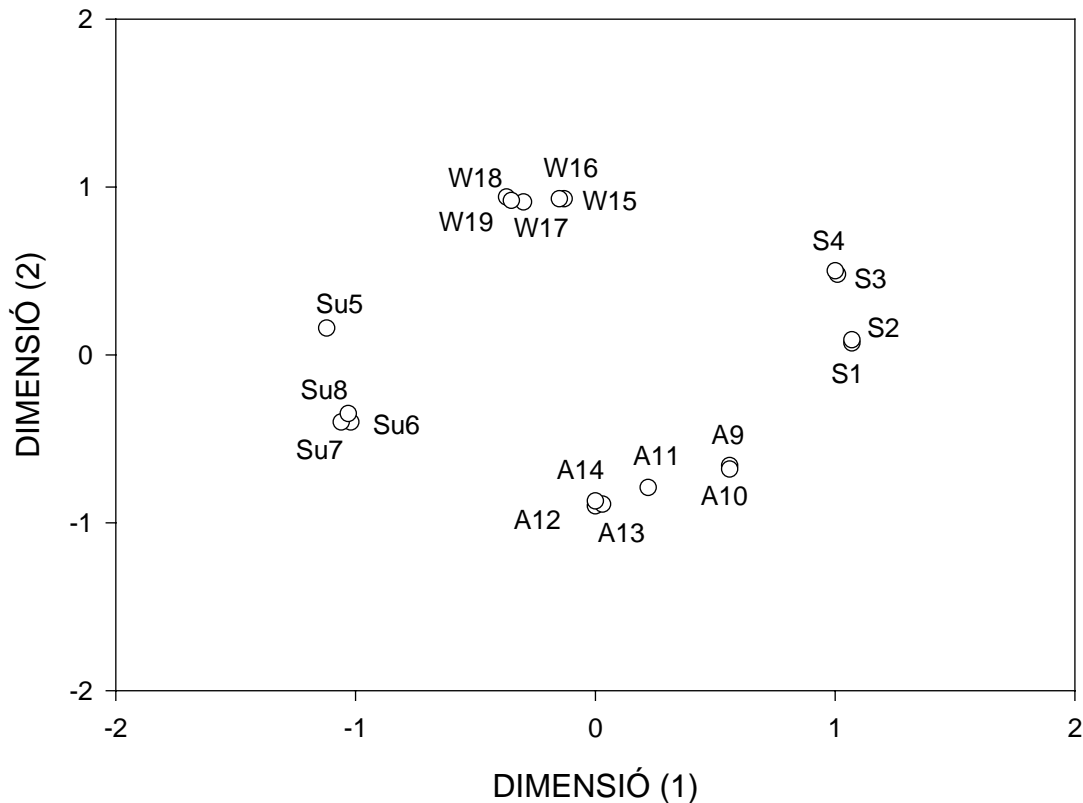


Figura III-11. Mapa MDS on es reflecteixen els canvis de les poblacions bacterianes presents als tapissos microbians del delta de l'Ebre, obtingut per la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AclI*. Els números que acompanyen el símbol (o) es corresponen amb les diferents laminacions

III.4 Discussió

En aquest estudi volíem analitzar i correlacionar les dades obtingudes en l'àmbit macroscòpic, microscòpic i molecular, als tapissos microbians del Delta de l'Ebre. Mitjançant l'anàlisi macroscòpica i microscòpica es va poder tenir una visió general de l'estructura dels tapissos, identificar els organismes dominants en les diferents laminacions i determinar-ne la seva distribució al llarg del perfil vertical en aquests sistemes estratificats. L'anàlisi microscòpica va permetre detectar i identificar les poblacions d'organismes fototròfics (diatomees, algues, cianobacteris, etc.) presents en les diferents laminacions. Les poblacions bacterianes heterotròfiques també van ser detectades, però l'anàlisi morfològica d'aquestes poblacions resultà insuficient per a diferenciar-les grupalment. La detecció d'organismes eucariotes com els copèpodes, nemàtodes i rotífers va ser possible només en una làmina de la mostra d'estiu, la Su5, a causa de la seva baixa concentració en els tapissos microbians estudiats (Martínez-Alonso, 1997).

L'aproximació molecular es va dur a terme mitjançant l'amplificació dels gens procariòtics dels 16S ARNr i la subsegüent anàlisi dels patrons de restricció. Tot i no donar informació quantitativa i de no identificar quins organismes tenim presents en l'ecosistema, l'anàlisi d'aquests patrons és útil per a estudiar dinàmiques poblacionals en ambients naturals on diferents factors abiòtics i biòtics poden induir canvis en les poblacions bacterianes que integren el sistema (Martínez-Murcia *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1997).

Aquesta tècnica ens va permetre, en primer terme, observar que la distribució dels dominis *Bacteria* i *Archaea* era molt diferent. Mentre que les primeres es trobaven presents en totes les mostres i laminacions durant tot l'any, les *Archaeas* només van ser detectades en el sediment negre. La baixa eficiència d'amplificació en aquest grup o la falta de producte de la PCR va ser deguda, probablement, a la presència de molt pocs membres d'aquest domini en les mostres analitzades, tal com es demostra per la baixa taxa d'activitat metanogènica detectada en el sediment negre (0,035 ml de metà per gram; Sanz JL, comunicació personal). No obstant això, no es poden descartar d'altres efectes derivats de l'estructura de l'ADN diana i de la seqüència dels encebadors, àmpliament explicats en el capítol V (Hansen *et al.*, 1998; Reysenbach *et al.*, 1992).

La digestió amb enzims d'alta freqüència de tall dels gens bacterians dels 16S ARNr amplificats prèviament per PCR ens va permetre comparar el nombre de fragments de restricció observats en cadascuna de les laminacions analitzades, la seva distribució en fondària i els patrons obtinguts en les diferents laminacions. Primerament, cal comentar que el nombre de fragments de restricció obtinguts amb cadascun dels enzims en les diferents submostres fou similar al que d'altres autors descriuen en sòls, oscil·lava entre 3 i 18 fragments (Smit *et al.*, 1997). A més, el nombre total de fragments fou similar en laminacions equivalents de diferents estacions de l'any i, llevat de la mostra d'estiu, s'observà una disminució d'aquests en fondària. Tal com s'ha descrit, aquest fenomen podria ser degut al fet que els bacteris es troben concentrats en els primers mm dels tapissos i disminueixen en fondària a mesura que incrementa la quantitat de matèria mineral (Martínez-Alonso, 1997). El fet que el nombre total de fragments de restricció augmentés en fondària en la mostra d'estiu podria ser degut a fluctuacions dels diferents paràmetres biòtics i abiòtics en l'ecosistema. Així doncs, a l'estiu, el baix nombre de fragments de restricció detectats en les laminacions superiors podria ser degut a l'elevat grau d'irradiació solar incident, en el qual un dels seus components, la radiació UV, pot augmentar dràsticament el moviment i les respostes fototàctiques de determinats organismes fotosintètics (Castenholz i García-Pichel, 2000; Kruschel i Castenholz, 1998), els quals poden fer migracions verticals, en aquest cas cap a la part baixa del tapís, per

evitar ser danyats o la mort (Krekeler *et al.*, 1998). A més, la diferència observada entre els patrons de restricció en el sediment negre (S2-4, A12-13 i W18-19) va confirmar que s'estaven produint canvis poblacionals no observables directament per microscòpia, la qual cosa demostra la gran utilitat dels estudis polifàsics. L'increment de sulfurs des de la laminació roja, on ja n'hi ha a baixes concentracions, fins a fondàries superiors als 20 mm pot ser la causa de les diferències observades en els RFLP de les diferents laminacions del sediment, per la sensibilitat diferent al sulfur d'hidrogen dels bacteris que la integren (Fründ i Cohen, 1992; Krekeler *et al.*, 1998; Martínez-Alonso, 1997).

Un altre paràmetre dels RFLP que ens dóna informació és la detecció de fragments específics en moltes de les laminacions analitzades, els quals ens indicaven que alguns ribotips dominants es podien trobar en fondàries concretes. En són un exemple els bacteris fototròfics anoxigènics que presenten Bchl *a* com a pigment majoritari, com és el cas d'un bacteri dominant descrit per Martínez-Alonso (1997), ja que la necessitat de llum i sulfurs com a donadors d'electrons determina que aquests bacteris es trobin en una part molt concreta del tapís constituint la làmina roja (Kondratieva *et al.*, 1992). D'altra banda, la presència de fragments comuns a totes les laminacions d'una mateixa mostra ens podria indicar que alguns dels ribotips estan presents al llarg de tot el perfil vertical del tapís. Aquesta observació no és d'estranyà, ja que molts organismes que es troben en aquests ambients extrems presenten un grau elevat d'adaptabilitat a canvis ambientals, com són diferents tipus de vies metabòliques i/o alternatives (Bebout i García-Pichel, 1995; Brune *et al.*, 2000; García-Pichel *et al.*, 1994; Jorgensen *et al.*, 1986; Krekeler *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1997, 1998). Tal com s'ha descrit, als tapissos microbians del delta de l'Ebre hi ha molts pigments que es troben a baixes concentracions o com a elements traça en totes les laminacions del tapís, incloent-hi el sediment negre (Martínez-Alonso, 1997). Com a exemple, les bacterioclorofil·les es troben al llarg de tot el perfil vertical del tapís. Aquest fet indica que, probablement, els bacteris fototròfics que els presenten poden sobreviure a qualsevol punt d'aquests sistemes estratificats (Caumette i Matheron, 1989). A més, l'anàlisi microscòpica de la distribució vertical dels diferents grups taxonòmics que integren els tapissos microbians del delta de l'Ebre ens aporta dades a favor d'aquesta hipòtesi, ja que molts grups com els cianobacteris coccoïdals (grups de *Cyanothece*, *Gomphosphaera* i *Gloeocapsa*), cianobacteris filamentosos (*Microcoleus chthonoplastes*), bacteris fototròfics anoxigènics i bacteris heterotròfics oxigènics o anoxigènics es troben distribuïts homogèniament al llarg de tot el perfil vertical i podrien ser la causa de l'aparició de fragments de restricció comuns en totes les laminacions d'una mateixa mostra (Martínez-Alonso, 1997; Minz *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2002).

A l'hora d'analitzar els resultats obtinguts per aquesta tècnica, però, cal anar amb molta cura, ja que l'elevat grau de conservació dels gens dels 16S ARNr ens pot induir a cometre errors. Així doncs, no

podem descartar que bacteris diferents, relacionats o no filogenèticament, presentin els mateixos llocs de restricció i que, per tant, donin els mateixos patrons de restricció, tot i correspondre a organismes diferents (Urakawa *et al.*, 1997, 1998). Durant la realització de l'estudi, i per a minimitzar aquest efecte, es van emprar tres enzims de restricció diferents, tal com es descriu en d'altres estudis (Acinas *et al.*, 1997; Urakawa *et al.*, 1997, 1998). També cal destacar que la falta de sensibilitat del mètode, derivada del procés d'amplificació per PCR i la tinció del gel d'electroforesi amb bromur d'etidi, pot subestimar la presència de ribotips no dominants, com serien, per exemple, els bacteris sulfatoreductors en la zona fòtica dels tapissos (Martínez-Alonso, 1997).

L'anàlisi dels patrons de restricció obtinguts en les diferents laminacions i la seva comparació mitjançant els mètodes UPGMA i MDS van permetre concloure que aquests presentaven una distribució estacional. Aquest fet concorda amb l'anàlisi estadística duta a terme en aquest ecosistema, que determina que les diferències observades en l'àmbit molecular són estadísticament significatives estacionalment (valor exacte de 0,008) i no en fondària (valor exacte d'entre 0,176-0,449). A més, aquests resultats corroboren estudis previs basats en l'anàlisi de diferents factors biòtics i abiòtics, els quals demostren que tapissos microbians desenvolupats, constituïts per diferents grups d'organismes distribuïts al llarg de gradients verticals, sofreixen any rere any fluctuacions que són una conseqüència derivada de l'estacionalitat (Martínez-Alonso, comunicació personal). Així doncs, mentre que alguns treballs determinen que l'estructura de les poblacions és determinada per l'estratificació vertical (Acinas *et al.*, 1997), en el nostre estudi es mostra que les fluctuacions estacionals que es donen en els tapissos microbians del delta de l'Ebre són les més importants per a determinar-ne l'estructura. No obstant això, es van poder discriminar subagrupaments en fondària a causa dels gradients abruptes dels diferents paràmetres abiòtics (llum, oxigen, sulfur d'hidrogen, etc.) que s'estableixen.

III.5 Conclusions

Les conclusions principals que s'han extret de l'estudi realitzat als tapissos microbians del delta de l'Ebre són les següents:

1. L'ús combinat de metodologies ens permet obtenir informació complementària dels tapissos microbians estudiats i salvar les deficiències de cadascuna de les metodologies emprades per separat. Així doncs, diferències observables en l'àmbit molecular no ho van ser en l'àmbit macroscòpic i microscòpic.

2. El mètode d'extracció dels àcids nucleics aplicat als tapissos microbians del delta de l'Ebre ens ha permès extreure ADN de puresa i integritat suficients per poder amplificar per PCR els gens procariòtics dels 16S ARNr i fer la subsegüent anàlisi dels RFLP.
3. El domini *Bacteria* es troba en tots els dies de mostreig i laminacions analitzades, mentre que el domini *Archaea* només es detecta en el sediment negre (S4, Su8, A12-14 i W18-19).
4. La complexitat dels patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians tendeix a augmentar en fondària en totes les mostres analitzades, exceptuant la mostra d'estiu, on mostra un comportament invers. A més, la detecció de fragments de restricció específics en determinades laminacions i fragments de restricció comuns en totes les laminacions d'una mateixa mostra ens indica que algunes poblacions predominants es troben en fondàries específiques i d'altres al llarg de tot el perfil vertical del tapís microbià, respectivament.
5. La comparació dels patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians de totes les laminacions, mitjançant l'anàlisi de similitud amb els mètodes UPGMA i MDS, mostra una distribució de tipus estacional. Duta a terme amb la prova de Kruskal-Wallis, l'anàlisi estadística del nombre total de fragments de restricció obtinguts en les diferents estacions de l'any mostra diferències estadísticament significatives (valor exacte de 0,008). En canvi, les diferències no són significatives quan aquest nombre es compara en fondària (valors de significació exacta a la primavera, estiu, tardor i hivern de 0,176, 0,216, 0,211 i 0,449, respectivament) en cadascuna de les estacions de l'any.



IV. Estanyols d'en **Cisó** i el **Vilar**

IV.1 Introducció

IV.1.1 Zona càrstica de Banyoles

IV.1.1.1 Estudis a l'estanyol d'en Cisó

IV.1.1.2 Estudis a l'estanyol del Vilar

IV.2 Objectius

IV.3 Resultats

IV.3.1 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics

IV.3.2 Extracció d'ADN

IV.3.3 Amplificació per PCR dels gens procariòtics dels 16S ARNr

IV.3.4 16S ADNr-RFLP

IV.3.5 Anàlisi de dades

IV.4 Discussió

IV.5 Conclusions

IV.1 Introducció

Els llacs de les zones temperades són sistemes planctònics verticalment estratificats, com a conseqüència dels gradients fisicoquímics que s'hi estableixen en fondària. Alguns dels elements que trenquen l'homogeneïtat vertical d'aquestes masses d'aigua, cosa que afavoreix la diferenciació de capes, són l'aparició d'una quimioclina i el procés d'extinció de la llum i la distribució dels diferents elements químics en fondària (oxigen, sulfur d'hidrogen, fosfat, nitrit, nitrat, etc.) (Gasol, 1988; Mitchell, 1987). L'estratificació d'aquests ecosistemes determina que les poblacions d'organismes que hi viuen se situïn en punts del perfil vertical on les condicions els són més favorables per a créixer.

IV.1.1 Zona càrstica de Banyoles

Els estudis de la zona càrstica de Banyoles i el seu entorn es van iniciar l'any 1946 (Margalef, 1946). Primerament, es va descriure la microbiota fototròfica de l'estany de Banyoles (Planas, 1973), el zooplàncton (Miracle, 1976) i els bacteris que l'integren (Abellà, 1980). Posteriorment també es van estudiar els estanyols del seu voltant, el Vilar (García de Emiliani, 1973; Abellà, 1980; Guerrero *et al.*, 1980; Montesinos i Esteve, 1984; Brugada i Montesinos, 1986), el d'en Cisó (Guerrero i Abellà, 1978) i l'estanyol Nou (Turet, 1981). L'estanyol d'en Cisó ha estat sens dubte, per les característiques que presenta, el que ha rebut molta més atenció i estudi.

IV.1.1.1 Estudis a l'estanyol d'en Cisó

L'estanyol d'en Cisó és holomíctic (mescla total de l'aigua de la columna) i té una fondària i un diàmetre màxims d'11 i 21 metres, respectivament (Abellà, 1980; Garcia-Gil *et al.*, 1985). Aquest estanyol ha estat àmpliament estudiat des que va ser descobert pels investigadors, atrets per la coloració rogenca de la seva aigua superficial deguda a la presència de bacteris fototròfics (Gasol *et al.*, 1990; Guerrero i Abellà, 1978; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993). Durant el període en què l'aigua està barrejada (holomixi), l'estanyol és totalment anaeròbic i presenta concentracions de sulfur d'hidrogen força elevades. En canvi, en el període d'estratificació, l'epilímnion esdevé aeròbic, mentre que l'hipolímnion es manté anaeròbic i amb concentracions de sulfur d'hidrogen elevades. En el període de barreja es pot observar el creixement d'alguns eucariotes, com les algues (Gasol i Pedrós-Alió, 1991), protists fototròfics (Gasol *et al.*, 1990; Pedrós-Alió *et al.*, 1987; Turet, 1981), ciliats (Dyer *et al.*, 1986; Gasol, 1988; Gasol *et al.*, 1992), metazous (Gasol, 1988), rotífers i crustacis (Alfonso i Miracle, 1987), però bàsicament la comunitat de l'estanyol està

formada per organismes procariotes, entre els quals destaquen els bacteris fototròfics (Guerrero *et al.*, 1985, 1987). Cal ressaltar també que en aquest estanyol s'ha descrit, més recentment, la presència de membres del domini *Archaea* (Casamayor *et al.*, 2000, 2001b).

La primera descripció de les característiques fisicoquímiques de l'estanyol d'en Cisó i de la distribució espaciotemporal dels bacteris fototròfics anoxigènics del sofre, verds i vermells, la va dur a terme Guerrero i Abellà (1978). Treballs posteriors han anat descrivint molts altres aspectes relacionats amb els bacteris fototròfics, com són: la seva identificació i abundància (Abellà, 1980; Esteve *et al.*, 1981; Gasol, 1988; Gasol *et al.*, 1990; Montesinos *et al.*, 1983), distribució (Abellà *et al.*, 1980; Gasol *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1983; Montesinos i Esteve, 1984; Montesinos i Van Gemerden, 1986; Pedrós-Alió *et al.*, 1983, 1984) o les relacions interespecífiques com la competència (Abellà *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1983), la simbiosi (Esteve *et al.*, 1988) i la predació (Esteve *et al.*, 1983; Gaju *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1986).

Entre els anys 1984 i 1987, es va fer un seguiment molt exhaustiu del biotop i de la biocenosi de l'estanyol d'en Cisó (Gasol, 1988). Es van estudiar, entre d'altres, quins organismes hi havia en tota la biomassa planctònica de la comunitat, la seva abundància, la seva distribució en l'espai i l'evolució de les poblacions al llarg del temps. Es va determinar que *Cryptomonas*, diatomees i *Peridinium* són els únics organismes fototròfics eucariotes que aporten una biomassa significativa. A més, mentre que a l'hivern el 100% de la biomassa a l'estanyol és pràcticament procariota, a l'estiu varia entre el 25% i el 60% en funció de l'any. D'aquesta biomassa total, el 70% a l'hivern i el 50% a l'estiu són biomassa fototròfica, mentre que la biomassa no fototròfica a l'hivern és tota d'origen bacterià i a l'estiu es diversifica molt. Addicionalment, la caracterització de l'estratificació vertical de la comunitat microbiana metalímnica de l'estanyol d'en Cisó ha aportat moltes dades ecofisiològiques i de migració vertical dels organismes metalímniques, entre els quals hi ha *Cryptomonas phaseolus* i els bacteris fototròfics del sofre (Gasol *et al.*, 1990; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993).

L'anàlisi funcional de les comunitats microbianes presents a l'estanyol d'en Cisó ha demostrat que la fixació anual de carboni és de 200-275 gC m⁻² i que en aquesta hi participen organismes fototròfics oxigènics, organismes fototròfics anoxigènics i organismes capaços de fixar carboni en la foscor (García-Cantizano, 1988 i 1992; Guerrero *et al.*, 1985; Montesinos i Esteve, 1984). De la fixació anual de carboni, la fotosíntesi oxigènica és responsable del 17%, la fotosíntesi anoxigènica del 25% i el 57% restant es fixa en la foscor. Cal remarcar, però, que l'activitat dels organismes implicats en aquesta fixació presenta variacions espacials, diàries i estacionals (García-Cantizano, 1992).

Si s'analitza l'estructura de l'estanyol i els factors que la controlen, en funció de l'abundància dels diferents organismes, s'observa que la comunitat planctònica epilimnica queda completament separada de la comunitat de la part metalimnica i hipolimnica (Gasol, 1988). D'altra banda, l'anàlisi de components principals de les dades fisicoquímiques i biològiques obtingudes al llarg del temps ha demostrat que el principal factor estructurador de la variabilitat de la comunitat és la fondària, que explica el 26% de la variació, mentre que tindria una importància menor l'estacionalitat, a la qual correspondria un 18% (Gasol, 1988). Els resultats trobats a l'estany de Banyoles i en d'altres sistemes lacustres reforcen la hipòtesi que l'eix principal d'estructuració de la comunitat passa de ser la variació estacional a ser-ho la variació en fondària en augmentar el grau d'estabilitat tèrmica del llac (a causa de la morfologia i la vegetació que l'envolten) i la presència de sulfur d'hidrogen (Àvila *et al.*, 1984; Bosshard *et al.*, 2000; Gasol, 1988).

IV.1.1.2 Estudis a l'estanyol del Vilar

Situat a menys d'un quilòmetre de l'estanyol d'en Cisó, el Vilar és un estanyol eutròfic crenogènic meromíctic (mescla parcial de la columna d'aigua amb aigües freàtiques sulfatades que entren pel fons de l'estanyol) (Guerrero *et al.*, 1980), format per dues cubetes i amb una fondària màxima, longitud i amplada inicials de 9, 170 i 81 metres, respectivament (Abellà *et al.*, 1980). La pròpia naturalesa de l'estanyol del Vilar determina que la cubeta 2, la més fonda i que està connectada amb l'estany de Banyoles per un canal superficial, pugui arribar a fondàries superiors als 30 metres per la presència de sediment en suspensió a les zones centrals (Abellà, 1980). L'estanyol del Vilar presenta una capa d'aigua profunda (monimolímnió), altament mineralitzada i de densitat superior, que no es barreja amb les capes superiors (mixolímnió). L'estratificació del mixolímnió a l'estiu, juntament amb la dificultat per a barrejar-se el monimolímnió amb la capa d'aigua superior, facilita l'aparició de condicions anoxigèniques amb concentracions elevades de sulfur d'hidrogen (Abellà, 1980; Àvila *et al.*, 1984; Guerrero, 1987). Igual que succeeix en el d'en Cisó, a l'estanyol del Vilar s'ha descrit també la presència d'organismes eucariotes, com són les algues *Cryptomonas sp.* i *Crucigenia* (Brugada i Montesinos, 1986; Casamayor *et al.*, 2000) i els ciliats (Casamayor *et al.*, 2000). Entre els organismes procariotes descrits trobem bacteris heterotròfics, bacteris fototròfics, als quals s'han dirigit la major part dels treballs (Abellà, 1980; Casamayor *et al.*, 2002), i membres del domini *Archaea* (Casamayor *et al.*, 2000, 2001b).

L'estanyol del Vilar fou descrit àmpliament per Abellà (1980), qui va determinar la distribució dels diferents paràmetres fisicoquímics, biològics, bioquímics, la producció primària fotosintètica i l'activitat sulfatoreductora en la columna d'aigua. Des de llavors i fins a l'actualitat, en aquest ecosistema s'han

identificat i quantificat diferents poblacions bacterianes fototròfiques (Abellà, 1980; Casamayor *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 1987), se n'ha analitzat la distribució (Abellà, 1980), s'han determinat els factors que regulen la biomassa i la quantitat de pigments que presenten (Abellà, 1980; Guerrero *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1983), s'han estudiat les variacions espaciotemporals (Abellà, 1980; Guerrero *et al.*, 1987) o les relacions interespecífiques com la competència (Montesinos *et al.*, 1983).

En aquest estanyol, la fixació anual de carboni és du a terme majoritàriament per fotosíntesi oxigènica, el 83% (Montesinos, 1982). No obstant això, la importància de la fixació en la foscor i per fotosíntesi anoxigènica envers la fixació per fotosíntesi oxigènica pot augmentar en funció de la fondària i l'època de l'any analitzades (García-Cantizano, 1988 i 1992). Aquest fet es demostra quan s'analitza la quimioclina durant els mesos d'estiu, on la fixació en la foscor pot arribar fins a valors del 81% de la producció total (García-Cantizano, 1988 i 1992).

L'anàlisi comparatiu dels paràmetres fisicoquímics i biològics que s'estableixen en diferents ecosistemes planctònics estratificats, entre els quals es troba l'estanyol del Vilar, permet diferenciar les fondàries que pertanyen al mixolímnió de l'estanyol, caracteritzades per variables com la temperatura, la llum, la Chl *a* i l'oxigen, de les fondàries de la quimioclina i del monimolímnió on variables com el sulfur d'hidrogen i la conductivitat en són característiques (Mir, 1997).

IV.2 Objectius

L'estudi de llacs que pertanyen al sistema càrstic de Banyoles, com són els estanyols d'en Cisó i el Vilar, durant llargs períodes de temps, ha permès obtenir informació molt completa sobre l'estructura, la composició i les dinàmiques poblacionals dels organismes que viuen en ambdós sistemes planctònics estratificats, principalment per l'aplicació de metodologies clàssiques d'anàlisi (Gasol, 1988; Mir, 1997; Gasol *et al.*, 1990; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993). Amb la finalitat d'aprofundir en l'estudi de les variacions que es donen estacionalment, però emprant de forma combinada tècniques convencionals i de biologia molecular, ens vam marcar els objectius següents:

1. Determinar les variacions espaciotemporals de les poblacions dominants procariòtiques en ambdós estanyols, el d'en Cisó i el Vilar, mitjançant l'anàlisi dels patrons dels 16S ADNr-RFLP, i la relació d'aquestes amb les fluctuacions dels paràmetres fisicoquímics que s'hi estableixen.

2. Comparar els resultats obtinguts en ambdós ecosistemes, com ara els estanyols d'en Cisó i el Vilar, amb els obtinguts en un altre sistema planctònic estratificat (llac Gran d'Estanya) i un de bentònic (tapissos microbians del delta de l'Ebre). Aquest objectiu serà tractat en la discussió general (capítol VII).

IV.3 Resultats

IV.3.1 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics

En les figures IV-1 i IV-2 es mostra la distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics (concentració d'oxigen dissolt, concentració de sulfur d'hidrogen, temperatura, llum, conductivitat, pH, concentració de pigments i proteïnes) obtinguts en ambdós estanyols durant un cicle anual d'estudi. En aquests estanyols, el període de barreja s'observà durant l'hivern i l'estratificació tèrmica es va mantenir durant la primavera i l'estiu, mentre que a la tardor els estanyols presentaven unes característiques intermèdies. No obstant això, i a causa de la naturalesa meromíctica de l'estanyol del Vilar, en totes les estacions de l'any s'observà una capa d'aigua al fons de l'estanyol (monimolimnion), molt més densa i mineralitzada, que no es barrejava amb les capes d'aigua de la part superior (mixolimnion).

A l'estanyol d'en Cisó, excloent la llum incident que disminuïa en fondària des de $120 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 0 m fins a $0,1 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 2 m, tots els paràmetres es mantenien força uniformes en tota la columna d'aigua durant el període de barreja (figures IV-1 i IV-2). Durant aquest període, els valors obtinguts per als diferents paràmetres van ser d' $1 \pm 0,15$ mg de proteïna per litre, $118,3 \pm 19,3 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$, $20,84 \pm 2,6 \mu\text{g Bchl } a \text{ l}^{-1}$, $8,43 \pm 1,05 \mu\text{g Bchl } c, d \text{ i } e \text{ l}^{-1}$, conductivitat de $1.295 \pm 19,9 \mu\text{Mhos cm}$, $8,66 \pm 0,43 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,68 \pm 0,13 \text{ mg O}_2 \text{ ml}^{-1}$, concentració de sulfur d'hidrogen de $0,147 \pm 0,01 \text{ mM}$ i pH de $7,37 \pm 0,03$. En canvi, durant el període d'estratificació, la termoclina que separa l'epilimnion de l'hipolimnion es localitza a diferents fondàries depenent de l'estació de l'any analitzada (figura IV-1). Durant aquest període d'estratificació, mentre que el pH i la conductivitat disminuïen en fondària a l'estiu, a la primavera els seus valors es mantenien molt semblants en tota la columna d'aigua. El valor màxim de Chl *a* fou de $761,3 \mu\text{g l}^{-1}$ a 2 m a la primavera, $64,38 \mu\text{g l}^{-1}$ de Bchl *a* a 7 m a la tardor i $568,52 \mu\text{g l}^{-1}$ de Bchl *c, d i e* a 2 m a la primavera. Els perfils de sulfur d'hidrogen i oxigen obtinguts en totes les estacions de l'any analitzades, exceptuant la mostra d'hivern, foren inversos.

A l'estanyol del Vilar, la llum incident disminuïa en fondària de forma més gradual que a l'estanyol d'en Cisó, i arribava al valor mínim de $0,15 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 8 m en el període de barreja (figura IV-1). La resta de paràmetres es mantenien força uniformes des de 0 fins a 8 m de la columna d'aigua, i s'obtenien valors de $0,518 \pm 0,08$ mg de proteïna per litre, $2,81 \pm 1,71 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$, $913,78 \pm 81,98 \mu\text{Mhos cm}^{-1}$ de conductivitat, $8,99 \pm 0,61 \text{ }^\circ\text{C}$, $5,36 \pm 2,05 \text{ mg O}_2 \text{ ml}^{-1}$, $6,32 \cdot 10^{-4} \pm 5,38 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$ de sulfur d'hidrogen i pH de $7,72 \pm 0,05$. En aquest cas, les concentracions de Bchl *a* i de Bchl *c, d i e* foren molt baixes, i només

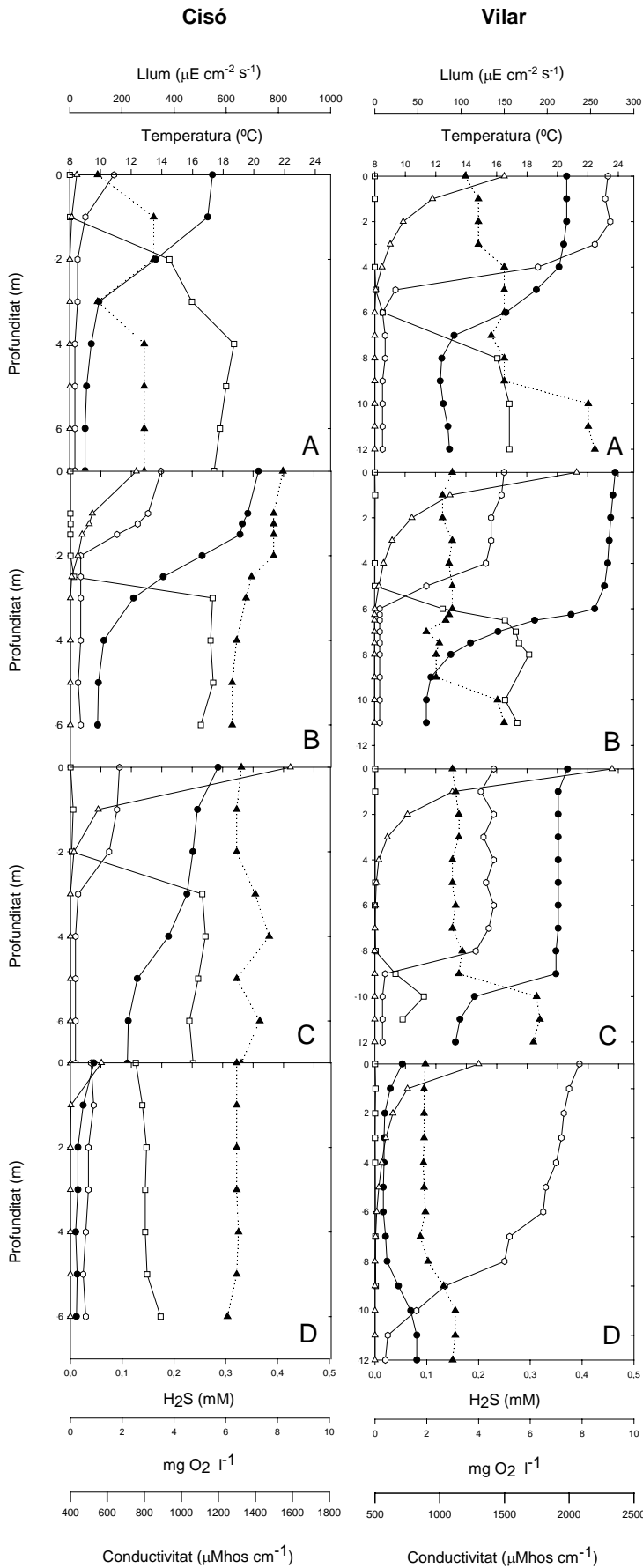


Figura IV-1. Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics en els estanyols d'en Cisó i el Vilar. A) Primavera (S) (22 de maig de 2000). B) Estiu (Su) (17 de juliol de 2000). C) Tardor (A) (9 d'octubre de 2000). D) Hivern (W) (23 de gener de 2001). Concentració de sulfur d'hidrogen en mM (—□—), concentració d'oxigen en mg l⁻¹ (—○—), temperatura en graus centígrads (—●—), llum en μE cm⁻² s⁻¹ (—▽—) i conductivitat en μMhos cm⁻¹ (.....▲.....)

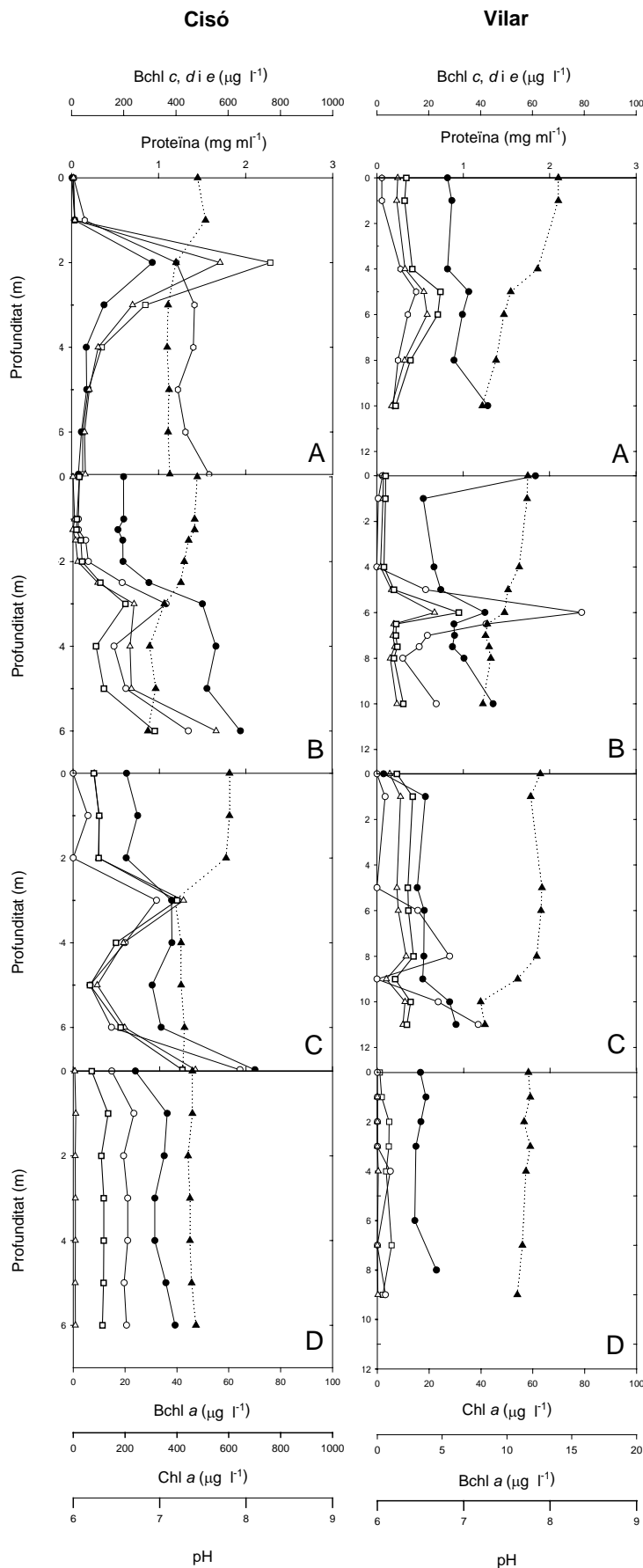


Figura IV-2. Distribució vertical de clorofil·la *a* (Chl *a*) (—□—), bacterioclòròfil·la *a* (Bchl *a*) (—○—), bacterioclòròfil·la *c, d i e* (Bchl *c, d i e*) (—◄—), pH (.....◄.....) i concentració de proteïnes (—●—) als estanyols d'en Cisó i el Vilar. A) Primavera (S) (22 de maig de 2000). B) Estiu (Su) (17 de juliol de 2000). C) Tardor (A) (9 d'octubre de 2000). D) Hivern (W) (23 de gener de 2001)

van ser detectades en aquesta època de l'any a 4 i 9 m de fondària, on la concentració de sulfur d'hidrogen fou molt petita. En el monimolímnion, la concentració d'oxigen dissolt disminuïa en fondària i els valors més alts de conductivitat i temperatura van ser detectats des de 10 m fins al fons. En el període d'estratificació, la quimioclina es trobava localitzada entre els 9 i els 10 m de fondària i separava el mixolímnion del monimolímnion (figura IV-1). A la primavera, la temperatura i el pH disminuïen esglaonadament en fondària, la concentració de proteïna es mantenia força constant i la conductivitat augmentava. A l'estiu, en canvi, la conductivitat es mantenia en fondària fins a arribar al monimolímnion, la temperatura disminuïa de forma molt brusca entre els 6 i els 8 m, el pH disminuïa suaument en fondària i la concentració de proteïna mostrava dos pics a 0 i 6 m. Llevat de la mostra d'hivern, i igual com succeïa a l'estanyol d'en Cisó, els perfils de sulfur d'hidrogen i oxigen obtinguts en la resta d'estacions de l'any analitzades foren inversos. Els valors màxims de Chl *a*, Bchl *a* i Bchl *c, d* i *e* van ser de 31,66 µg l⁻¹, 15,81 µg l⁻¹ i 22,29 µg l⁻¹ a l'estiu i a 6 m, respectivament.

Els valors de la concentració de proteïnes i de pigments es van integrar, i els resultats obtinguts es mostren gràficament en la figura IV-3 i numèricament en els annexos 4 i 5. A l'estanyol d'en Cisó, la comparació dels valors integrats de les proteïnes mostraven variacions entre les diferents estacions de l'any analitzades; el valor més baix era l'obtingut a la primavera (1.877 mg m⁻²) i els més alts i similars entre ells, en la resta d'estacions de l'any (6.280- 7.816 mg m⁻²) (figura IV-3). Les concentracions més elevades de Chl *a* (1.324 mg m⁻²) i Bchl *a* (276 mg m⁻²) s'obtingueren a la primavera, mentre que la de Bchl *c, d* i *e* (1.625 mg m⁻²) ho fou a la tardor. A l'estanyol del Vilar, els valors de proteïna obtinguts a l'estiu i la primavera van ser similars i superiors als detectats a la tardor i l'hivern (figura IV-3). En aquest estanyol, les concentracions més elevades de Chl *a* (137 mg m⁻²) i Bchl *c, d* i *e* (109 mg m⁻²) es van observar a la primavera, mentre que la Bchl *a* ho fou a l'estiu (20 mg m⁻²).

Si comparem els valors obtinguts en ambdós estanyols ens adonem que els valors integrats de proteïna a l'estanyol del Vilar són més grans que els detectats a l'estanyol d'en Cisó. No obstant això, en ambdós ecosistemes l'ordre de magnitud es manté. En canvi, els valors dels pigments són molt superiors a l'estanyol d'en Cisó respecte al del Vilar, i s'observa fins a un ordre de magnitud de diferència. En ambdós sistemes planctònics, la concentració màxima de Chl *a* va ser detectada a la primavera, mentre que els valors màxims de Bchl *a* Bchl *c, d* i *e* van ser detectats en diferents estacions de l'any.

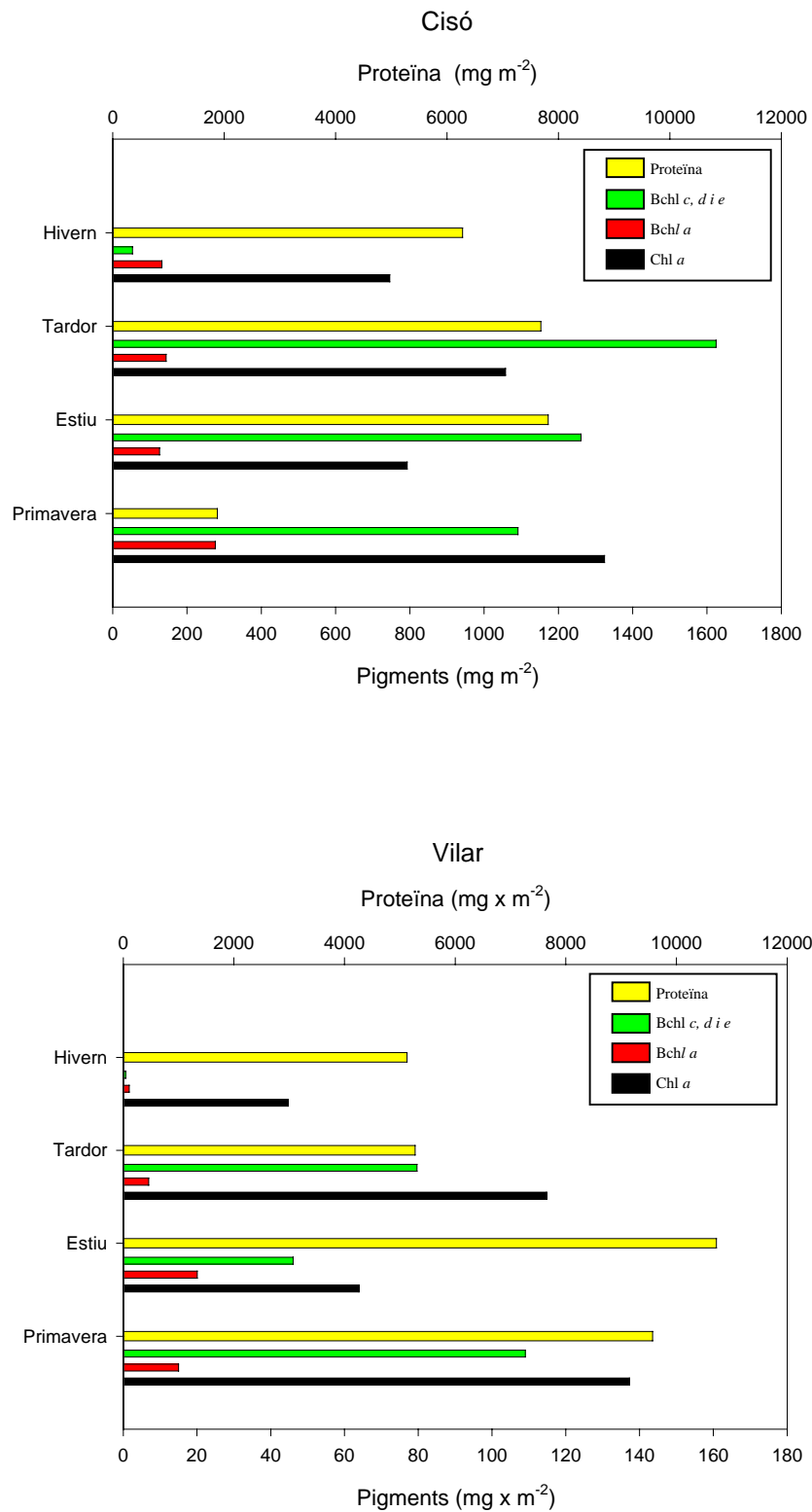


Figura IV-3. Valors integrats de pigments i proteïnes als estanyols d'en Cisó i el Vilar

IV.3.2 Extracció d'ADN

L'extracció de l'ADN genòmic de les diferents mostres i fondàries i de les soques tipus es van visualitzar en forma d'una banda superior a les 23 kb, tal com es mostra a la figura IV-4.

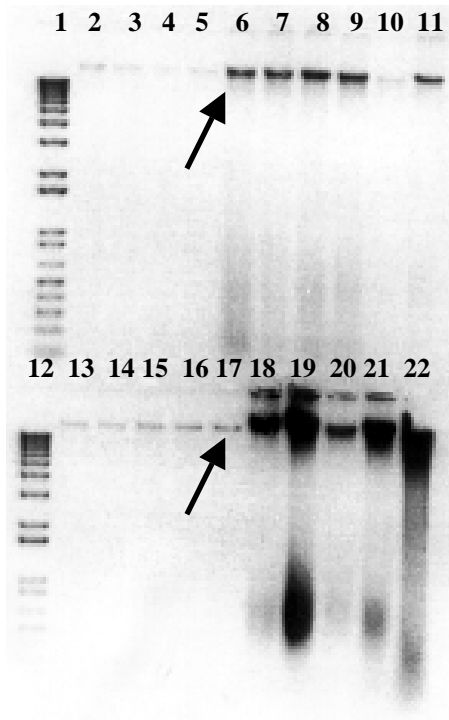


Figura IV-4. Extraccions d'ADN genòmic de les diferents fondàries de la mostra d'estiu (Su) de dos estanyols del sistema càrstic de Banyoles, el d'en Cisó (C) i el del Vilar (V), visualitzades en un gel d'electroforesi (negatiu). Carrils: 1 i 12 marcadors de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, SuV0m; 3, SuV1m; 4, SuV4m; 5, SuV5m; 6, SuV6m; 7, SuV6,5m; 8, SuV7m; 9, SuV7,5m; 10, SuV8m; 11, SuV10m; 13, SuC0m; 14, SuC1m; 15, SuC1,25m; 16, SuC1,5m; 17, SuC2m; 18, SuC2,5m; 19, SuC3m; 20, SuC4m; 21, SuC5m; 22, SuC6m. La fletxa senyala la banda d'ADN genòmic obtinguda d'aproximadament 23kb

En aquesta figura, per exemple, podem observar que l'ADN extret de la part més fonda dels dos estanyols, Cisó (SuC2,5m, SuC3m, SuC4m, SuC5m i SuC6m) i Vilar (SuV6m, SuV6,5m, SuV7m, SuV7,5m, SuV8m i SuV10m), presentava, durant l'estiu, els carrils més bruts, amb una coloració marró de l'extracte cru, fet que ens indicava la possible presència d'inhibidors de la PCR. Aquest fet es repetia en la resta d'estacions de l'any. Per a minimitzar la presència d'aquests possibles inhibidors de la PCR i aconseguir la màxima rendibilitat d'aquesta reacció, els extractes crus de les capes més profundes es van diluir fins a 10^{-2} .

IV.3.3 Amplificació per PCR dels gens procariòtics dels 16S ARNr

Els dominis *Bacteria* i *Archaea* es van detectar en totes les estacions de l'any en els dos estanyols analitzats, Cisó (C) i Vilar (V), en forma de banda de 1.500 pb. Mentre que el domini *Bacteria* es va detectar en tots els dies de mostreig i fondàries, el domini *Archaea* estava present en tots els dies de

mostreig i majoritàriament en les capes més fondes, on la concentració de sulfur d'hidrogen fou més elevada. Les submostres on es va detectar aquest darrer domini van ser: SC2-7m, SuC2,5-4m, AC2-7m, WC0-7m, SV5-10m, SuV8-10m), AV0, AV8-11m i WV0-9m (figura IV-5).

Figura IV-5. Amplificacions dels gens dels 16S ARNr, amb encebadors específics per al domini *Bacteria* (carrils 2-10) i *Archaea* (12-20), de les mostres de primavera (S) de l'estanyol d'en Cisó (C) (negatiu). Carrils: 1 i 11, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, control positiu de bacteris (*E. coli* CGSC 5073); 12, control positiu d'*Archaeas* (*H. mediterranei* ATCC 33500); 3 i 13, SC0m; 4 i 14, SC1m; 5 i 15, SC2m; 6 i 16, SC3m; 7 i 17, SC4m; 8 i 18, SC5m; 9 i 19, SC6m; 10 i 20, SC7m



IV.3.4 16S ADN-RFLP

Una vegada amplificats per PCR els gens dels 16S ARNr dels dominis *Archaea* i *Bacteria* i digerits amb els diferents enzims de restricció, els patrons dels 16S ADN-RFLP van ser resolts com s'indica en l'apartat II.3.6.2.3. Els patrons del domini *Archaea* no es van poder visualitzar i, per tant, no es van poder analitzar perquè la quantitat final de producte obtingut per PCR fou insuficient per a fer-ho. Els resultats obtinguts per al domini *Bacteria* en ambdós estanyols, el nombre de fragments de restricció i els patrons dels 16S ADN-RFLP bacterians, es detallen en les taules IV-1 i IV-2 i en les figures IV-6, IV-7 i IV-8, respectivament.

A l'estanyol d'en Cisó, el nombre total de fragments de restricció bacterians es mantingué constant en fondària en la mostra d'hivern i gairebé invariable en la de la tardor. En canvi, el nombre més alt de fragments totals fou trobat a la part anòxica del llac en la mostra d'estiu (SuC3m) i a la part més superficial de l'estanyol a la primavera (SC0m) (Taula IV-1). Per sota d'aquesta capa superficial de la primavera, i llevat de la submostra adjacent al sediment (SC7m), el nombre total de fragments trobats en totes les fondàries (S1-6m) fou semblant. A l'estiu, en canvi, aquest nombre disminuïa en fondària a la part oxigènica de l'estanyol, mentre que a la part anòxica s'incrementava una altra vegada per assolir els valors més elevats en aquest mostreig. L'anàlisi comparativa dels patrons de restricció obtinguts amb els tres enzims de restricció en totes les estacions de l'any va posar de manifest una diferenciació entre les

submostres oxigèniques (SC0-1m, SuC0-2,5m i AC0-2m), on la llum era present, i les anoxigèniques (SC2-7m, SuC2,5-5m i AC3-7m) (figura IV-6), on era present el sulfur d'hidrogen. En funció de l'enzim emprat, a més, es van detectar petites diferències entre els patrons de restricció obtinguts en les diferents submostres anoxigèniques (SC7m al digerir amb els tres enzims; AC3-7m en digerir amb *HinfI* i *AluI*) (Figures IV-6 i IV-7B). Igualment, també foren observades algunes diferències entre les submostres més superficials i la resta de submostres oxigèniques (S0m en digerir amb *HinfI*, *RsaI* i *AluI*). També es va poder determinar que alguns dels patrons de restricció de les submostres situades en la interfase d'oxigen-sulfur d'hidrogen presentaven similituds a ambdues parts de l'estanyol, l'oxigènica i l'anoxigènica (SuC2,5m en digerir amb *HinfI* i *RsaI*). En canvi, seguint la distribució uniforme dels diferents paràmetres fisicoquímics, l'anàlisi dels patrons de les diferents submostres del període de barreja mostrava perfils idèntics en tota la columna d'aigua (figures IV-5 i IV-8B). Cal destacar que els RFLP obtinguts a partir de diferents rèpliques d'una mateixa submostra eren idèntics, tant si aquesta havia estat filtrada com centrifugada (figura IV-8B).

A l'estanyol del Vilar, el nombre total de fragments de restricció bacterians més elevat fou trobat a l'hivern i es mantenia gairebé constant en fondària (taula IV-2). A la tardor, aquest nombre fou inferior al d'hivern i també es mantingué força homogeni en fondària. A la primavera i l'estiu, en canvi, es van observar diferències entre les dues parts de l'estanyol, l'oxigènica i l'anoxigènica, quant al nombre total de fragments de restricció trobat en cadascuna. A la primavera, el nombre total de fragments fou més elevat en les submostres de la part oxigènica (SV0-5m) de l'estanyol que en les de la part anoxigènica (SV6-10m). En canvi, la distribució del nombre total de fragments a l'estiu fou inversa a la trobada a la primavera, és a dir, aquest fou més petit a la part oxigènica (SuV0-5m) que a la part anoxigènica (SuV6-10m). En aquest estanyol es van poder detectar variacions entre els patrons de restricció dels 16S ADN-RFLP analitzats en funció de la presència o absència d'oxigen i de llum (figura IV-6). Així doncs, els patrons obtinguts en la zona fòtica oxigènica (SV0-5m, SuV0-5m i AV0-5) eren diferents dels obtinguts en la zona afòtica anoxigènica (SV6-10m i SuV6-10m) i en la zona afòtica oxigènica i anoxigènica (AV6-11m). A més, en funció de l'enzim emprat es van detectar també petites diferències entre els patrons de restricció obtinguts en les diferents submostres anoxigèniques (SV10m en digerir amb *RsaI* i *AluI*; SV6-10m en digerir amb *RsaI* i *AluI*) (figura IV-6). Igualment, s'observaren diferències entre les diferents submostres de la part oxigènica (SV0-1m en digerir amb *HinfI* i *AluI*). Els patrons de les submostres localitzades en la interfase d'oxigen-sulfur d'hidrogen, i en funció de l'enzim emprat i l'època de l'any analitzada, presentaven característiques intermèdies a ambdues parts de l'estanyol, i tenien una major versemblança amb les submostres de la part anoxigènica de l'estanyol en alguns casos (SuV6m i SV5m en digerir amb *HinfI* i *RsaI*, respectivament) i en d'altres un grau més alt de similitud amb les submostres de la part oxigènica

(SuV6m en digerir amb *RsaI*). En el període de barreja, i seguint la distribució uniforme dels diferents paràmetres fisicoquímics, els patrons van ser gairebé iguals en tota la columna d'aigua (figura IV-6).

Si comparem els dos estanyols, el nombre total de fragments de restricció obtinguts a l'estanyol del Vilar fou més gran que al d'en Cisó. A més a més, en ambdós estanyols es van poder detectar fragments de restricció específics de fondària i fragments presents en totes les fondàries per un mateix dia de mostreig (figura IV.6).

IV.3.5 Anàlisi de dades

L'anàlisi global de les dades es va dur a terme tenint en compte els valors acumulats de similitud de tots els fragments obtinguts amb els enzims *RsaI*, *AluI* i *HinfI*, tal com s'indica en l'apartat II.3.7. En les diferents representacions, dendrogrames (figures IV-9 i IV-10) i mapes MDS (figura IV-11), es veu com l'agrupament de les mostres és determinat pel dia de mostreig, i s'obtenen quatre grups principals en ambdós estanyols. S'ha de remarcar que la submostra de 5 m de fondària del Cisó a l'estiu, la SuC5m, no fou inclosa en l'anàlisi. Com a conseqüència dels problemes que es van tenir a l'hora d'amplificar els gens bacterians dels 16S ARNr per PCR, la submostra SuC5m només es va poder digerir amb un enzim de restricció i per aquest motiu el nombre total de fragments obtinguts fou molt inferior al de la resta (taula IV-1).

L'anàlisi dels patrons de restricció pel mètode UPGMA ens va permetre obtenir els dendrogrames de similitud dels 16S rDNA-RFLP bacterians de les comunitats presents en ambdós estanyols (figures IV-9 i IV-10). A l'estanyol d'en Cisó, a la primavera i la tardor es podien diferenciar les submostres on hi havia oxigen i llum (SC0-1m i AC0-2m) d'aquelles en què aquests paràmetres no eren detectats (SC2-7m i AC3-7m) (figura IV-9). A la primavera, a més, les submostres hipolímniques on es va detectar una davallada de la temperatura, els pics de proteïna i pigments i una concentració de sulfur d'hidrogen important (SC2-3m) van quedar lleugerament separades de la resta de submostres d'aquesta part de l'estanyol. En aquesta època de l'any es van detectar també diferències entre les capes anoxigèniques, sobretot entre les superiors (SC2-6m) i les de la part més fonda de l'estanyol (SC7m). A la tardor, en canvi, la submostra hipolímnica (AC3m) que es va separar de la resta fou la fondària on s'hi trobaven la temperatura més alta, la concentració de sulfur d'hidrogen superior i els pics de proteïna i pigments. Els resultats obtinguts a l'estiu foren complexos i difícils d'interpretar. No obstant això, s'observà una separació entre les submostres de la zona fòtica (SuC0-2,5m) i les de la zona afòtica (SuC3-7m). A diferència de la resta

d'estacions, les submostres d'hivern no es van separar en subgrups, tot i haver-hi llum en dues de les vuit submostres (WC0-1m).

Taula IV-1. Nombre de fragments dels 16S ADNr bacterians per anàlisi de restricció amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AclI* a l'estanyol d'en Cisó

Mostra	Codi	Fondària	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AclI</i>	Total
Primavera	S	SC0m	13	13	12	38
		SC1m	7	14	12	33
		SC2m	9	9	14	32
		SC3m	10	9	14	33
		SC4m	10	9	15	34
		SC5m	10	9	15	34
		SC6m	10	9	15	34
		SC7m	8	6	5	19
Estiu	Su	SuC0m	10	10	15	35
		SuC1m	9	8	14	31
		SuC1,25m	9	8	14	31
		SuC1,5m	9	8	15	31
		SuC2m	9	8	12	29
		SuC2,5m	10	9	8	27
		SuC3m	14	11	12	39
		SuC4m	14	11	11	36
		SuC5m	ND	ND	11	11
Tardor	A	AC0m	8	13	14	35
		AC1m	8	13	14	35
		AC2m	8	13	14	35
		AC3m	11	12	12	35
		AC4m	11	11	13	35
		AC5m	11	11	13	35
		AC6m	10	10	13	33
		AC7m	10	10	12	32
Hivern	W	WC0m	14	9	11	34
		WC1m	14	9	11	34
		WC2m	14	9	11	34
		WC3m	14	9	11	34
		WC4m	14	9	11	34
		WC5m	14	9	11	34
		WC6m	14	9	11	34

ND: no determinat

Taula IV-2. Nombre de fragments dels 16S ADNr bacterians per anàlisi de restricció amb els enzims *RsaI*, *HinII* i *AluI* a l'estanyol del Vilar

Mostra	Codi	Fondària	<i>RsaI</i>	<i>HinII</i>	<i>AluI</i>	Total
Primavera	S	SV0m	15	12	14	41
		SV1m	15	12	14	41
		SV4m	14	13	14	41
		SV5m	14	14	14	42
		SV6m	15	10	14	39
		SV8m	11	10	11	32
		SV10m	15	10	13	38
Estiu	Su	SuV0m	10	10	11	31
		SuV1m	10	10	11	31
		SuV4m	10	10	11	31
		SuV5m	10	10	11	31
		SuV6m	10	14	18	42
		SuV6,5m	11	16	14	41
		SuV7m	11	16	13	40
		SuV7,5m	11	16	13	40
		SuV8m	12	16	12	40
		SuV10m	12	17	12	41
Tardor	A	AV0m	11	12	17	40
		AV1m	11	12	17	40
		AV5m	11	12	16	39
		AV6m	11	11	16	38
		AV8m	10	14	16	40
		AV9m	12	14	16	42
		AV10m	12	14	16	40
Hivern	W	WV0m	11	14	19	44
		WV1m	11	14	19	44
		WV2m	11	14	18	43
		WV3m	11	14	18	43
		WV4m	12	14	18	44
		WV7m	13	14	18	45
		WV9m	13	14	16	43

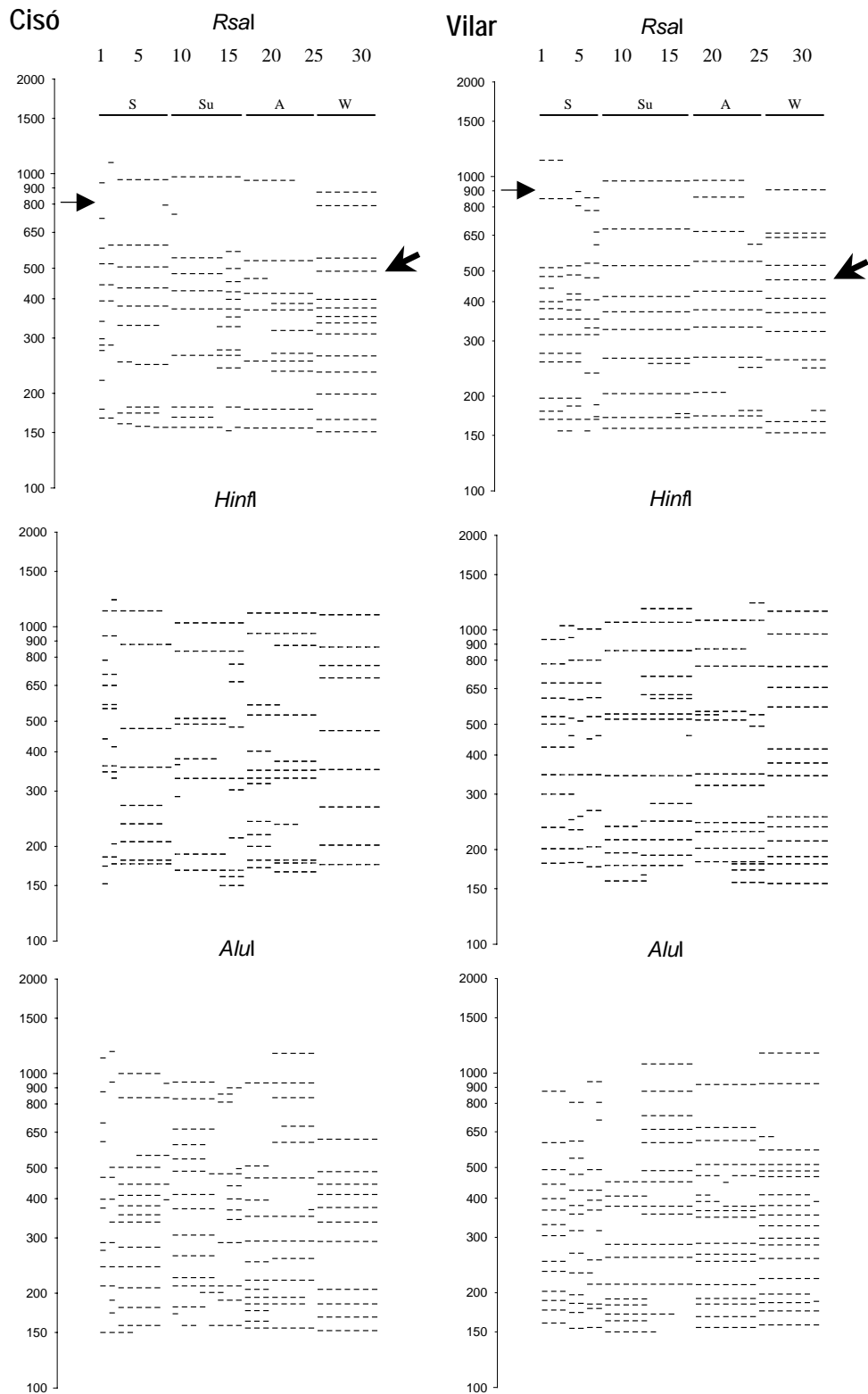


Figura IV-6. Distribució esquemàtica dels patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians de primavera (S), estiu (Su), tardor (A) i hivern (W) després de realitzar digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AluI* als estanyols d'en Cisó (carrils: 1, S0m; 2, S1m; 3, S2m; 4, S3m; 5, S4m; 6, S5m; 7, S6m; 8, S7m; 9, Su0m; 10, Su1m; 11, Su1,25m; 12, Su1,5m; 13, Su2m; 14, Su2,5m; 15, Su3m; 16, Su4m; 17, A0m; 18, A1m; 19, A2m; 20, A3m; 21, A4m; 22, A5m; 23, A6m; 24, A7m; 25, W0m; 26, W1m; 27, W2m; 28, W3m; 29, W4m; 30, W5m; 31, W6m; 32, W7m) i el Vilar (carrils: 1, S0m; 2, S1m; 3, S4m; 4, S5m; 5, S6m; 6, S8m; 7, S10m; 8, Su0m; 9, Su1m; 10, Su4m; 11, Su5m; 12, Su6m; 13, Su6,5m; 14, Su7m; 15, Su7,5m; 16, Su8m; 17, Su10m; 18, A0m; 19, A1m; 20, A5m; 21, A6m; 22, A8m; 23, A9m; 24, A10m; 25, A11m; 26, W0m; 27, W1m; 28, W2m; 29, W3m; 30, W4m; 31, W7m; 32, W9m). Hi ha alguns fragments comuns a totes les profunditats d'una mateixa mostra (fletxa gruixuda) i d'altres d'específics (fletxa prima)

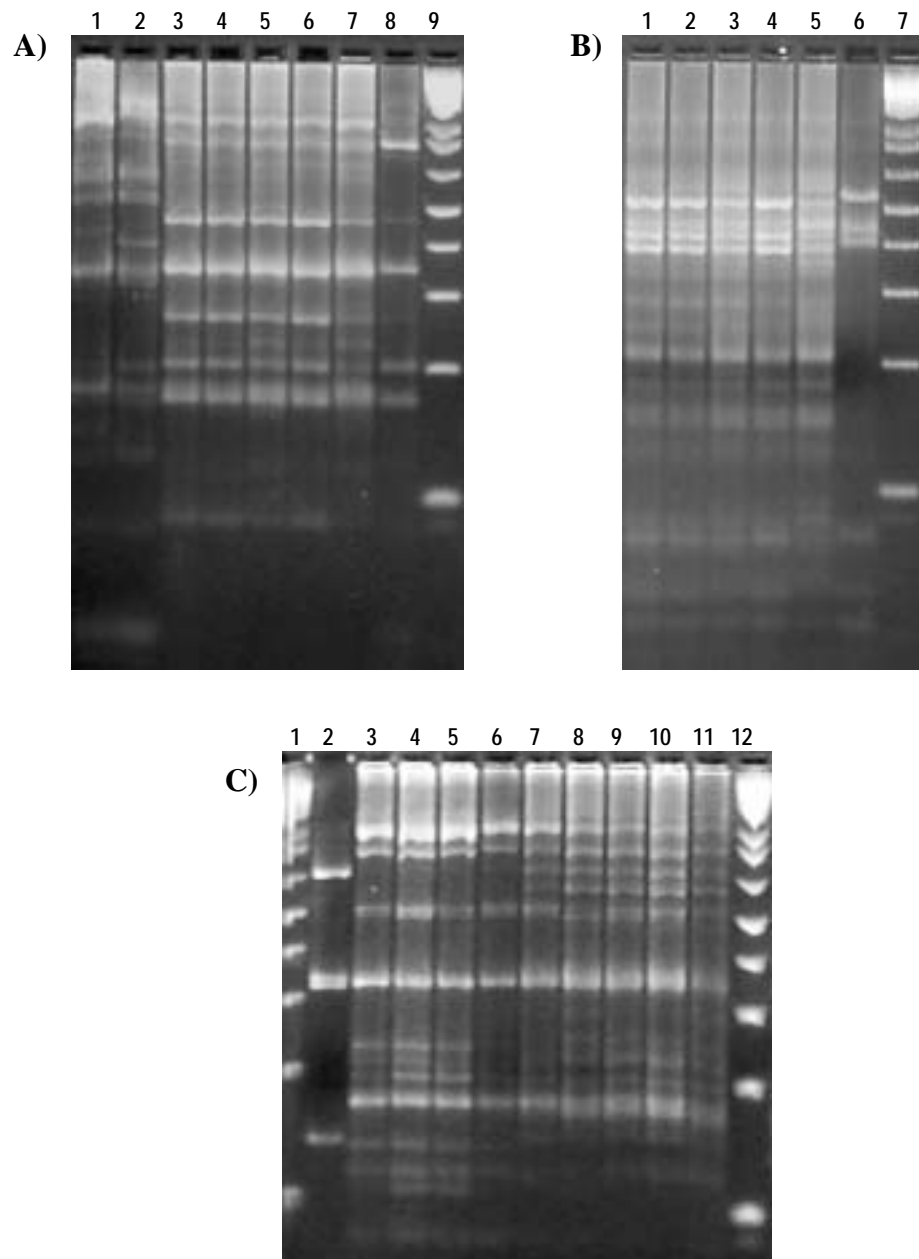


Figura IV-7. Patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians de primavera (S) i estiu (Su) després de realitzar digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AluI* als estanyols d'en Cisó (C) i el Vilar (V). A) Digestions de totes les capes amb *HinfI*. Carrils: 1, SC0m; 2, SC1m; 3, SC2m; 4, SC3m; 5, SC4m; 6, SC5m; 7, SC6m; 8, SC7m; 9, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen). B) Digestions de les capes anoxigèniques amb *AluI*. Carrils: 1, SC2m; 2, SC3m; 3, SC4m; 4, SC5m; 5, SC6m; 6, SC7m; 7, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus. C) Digestions de totes les capes amb *HinfI*. Carrils: 1 i 12 marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus; 2, control positiu de bacteris (*E. coli* CGSC 5073); 3, SuV0m; 4, SuV1m; 5, SuV4m; 6, SuV5m; 7, SuV6m; 8, SuV6,5m; 9, SuV7m; 10, SuV7,5m; 11, SuV8m

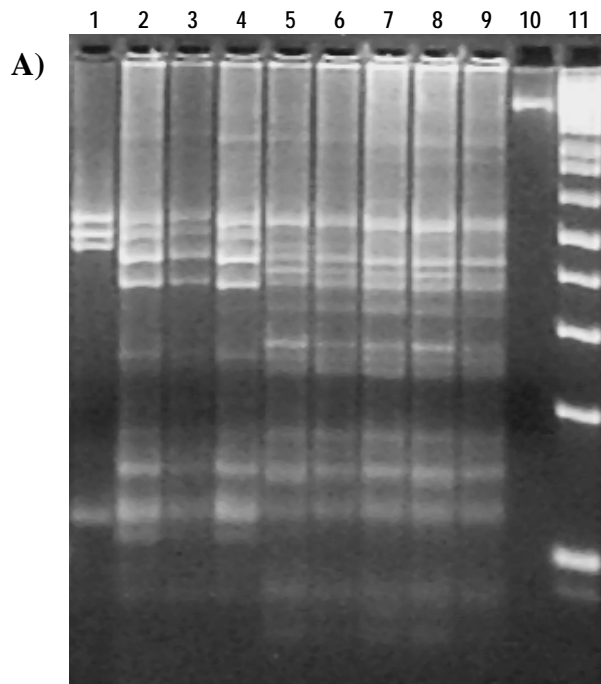
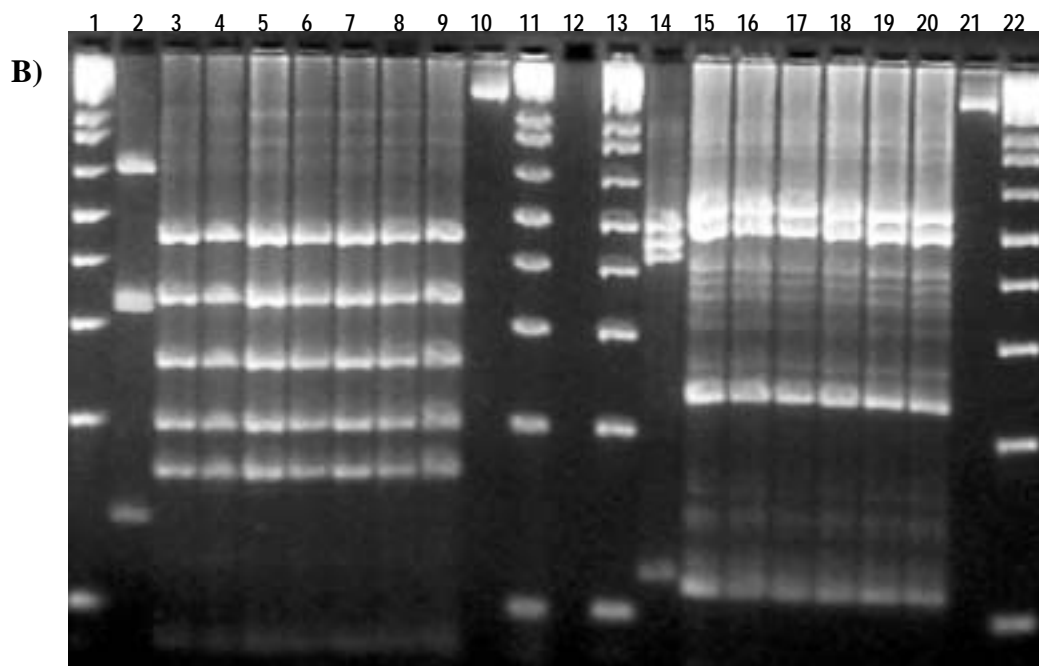


Figura IV-8. Patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians de tardor (A) i hivern (W) després de realitzar digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinI* i *AluI* a l'estanyol d'en Cisó. A) Digestions amb *RsaI*. Carrils: 1, control positiu d'eubacteris (*E. coli* CGSC 5073); 2, A0m; 3, A1m; 4, A2m; 5, A3m; 6, A4m; 7, A5m; 8, A6m; 9, A7m; 10, control negatiu de la digestió; 11, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen). B) Digestions amb *HinI* (carrils 2-9) i *RsaI* (carrils 14-20). Carrils: 1, 11, 13 i 22 marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus; 2 i 14, controls positius de bacteris (*E. coli* CGSC 5073); 3 i 15, W0m; 4 i 16, W1m; 5 i 17, W2m; 6 i 18, W3m; 7 i 19, W5m; 8 i 20, W6m; 9, aigua filtrada amb filtres de 0,22 μm ; 10 i 21, controls negatius de les digestions



A l'estanyol del Vilar, les submostres de la primavera on hi havia oxigen i llum i la temperatura era elevada (SV0-4m) es podien diferenciar d'aquelles en què la llum i l'oxigen eren gairebé o totalment inexistent i la temperatura era inferior (SV5-10m). A més, les submostres on es van detectar traces d'oxigen i els pics de proteïnes i pigments (SV5-6m) van quedar separades de la resta de submostres anoxigèniques. A l'estiu, en canvi, es van separar les submostres epilimniques (SuV0-5m) de les hipolimniques (SuV6-10m). Una d'aquestes submostres hipolimniques (SuV6m) es diferencià de la resta, i es va caracteritzar per la presència dels pics de proteïna i pigments, temperatura superior, poca llum i la presència d'una concentració de sulfur d'hidrogen inferior. En aquest cas, la mostra que presentava una distribució més complexa fou la de la tardor. Cal destacar, d'una banda, que les submostres més properes al sediment de l'estanyol (A10-11m) es van diferenciar de la resta, caracteritzant-se pel fet de tenir una temperatura i un pH inferiors i una concentració de sulfur d'hidrogen, conductivitat i Bchl *c*, *d* i *e* superiors. D'altra banda, de la resta de submostres es van poder diferenciar dos subgrups, les més superficials (AV0-6m) i les que es trobaven en la interfase d'oxigen-sulfur d'hidrogen (AV8-9m). A l'hivern, les submostres es van separar en diferents grups segons la presència de llum incident alta (WV0-1m), la presència de llum incident baixa i temperatura constant (WV2-3m), l'absència de llum i on la temperatura disminuïa (WV4-7m) i on la temperatura era més baixa i la conductivitat i la concentració d'oxigen s'incrementaven (WC9m).

Quan es va dur a terme l'anàlisi dels mapes obtinguts amb el mètode MDS (figura IV-11), a l'estanyol d'en Cisó s'hi observà una diferenciació clara entre les submostres més superficials de la tardor (AC0-2m), on la llum i l'oxigen són presents, de les més fondes (AC3-7m), on les condicions són anoxigèniques i majoritàriament no es detecta llum. A la primavera, en canvi, aquesta distribució no fou tan clara, ja que la submostra (SC1m) on hi havia oxigen i poca quantitat de llum quedava molt més propera a la resta de submostres anoxigèniques (SC2-7m) que la de 0 metres de fondària (SC0m). A més, la submostra adjacent al sediment de l'estanyol (SC7m) quedava completament separada de la resta de les submostres anoxigèniques (SC2-6m). A l'estiu, en canvi, s'observà una distribució molt heterogènia de les diferents submostres, la qual cosa impedia establir una relació clara entre aquestes i els diferents paràmetres fisicoquímics mesurats en aquesta època de l'any. A l'hivern, totes les submostres s'agrupaven juntes perquè tenien els patrons de RFLP idèntics (figura IV-11A). A l'estanyol del Vilar, i excepte a l'hivern, es van poder detectar diferències entre les submostres de la part oxigènica (SV0-6m, SuV0-5m i AV0-9m) i les de la part interfàsica-anoxigènica (SV8-10m, SuV6-10m i AV10-11m). En aquest estanyol, l'agrupació de les diferents submostres a l'hivern depengué de si la llum incident que hi arribava es trobava en grans quantitats (WV0-1m) o no (WV2-9m) (figura IV-11B).

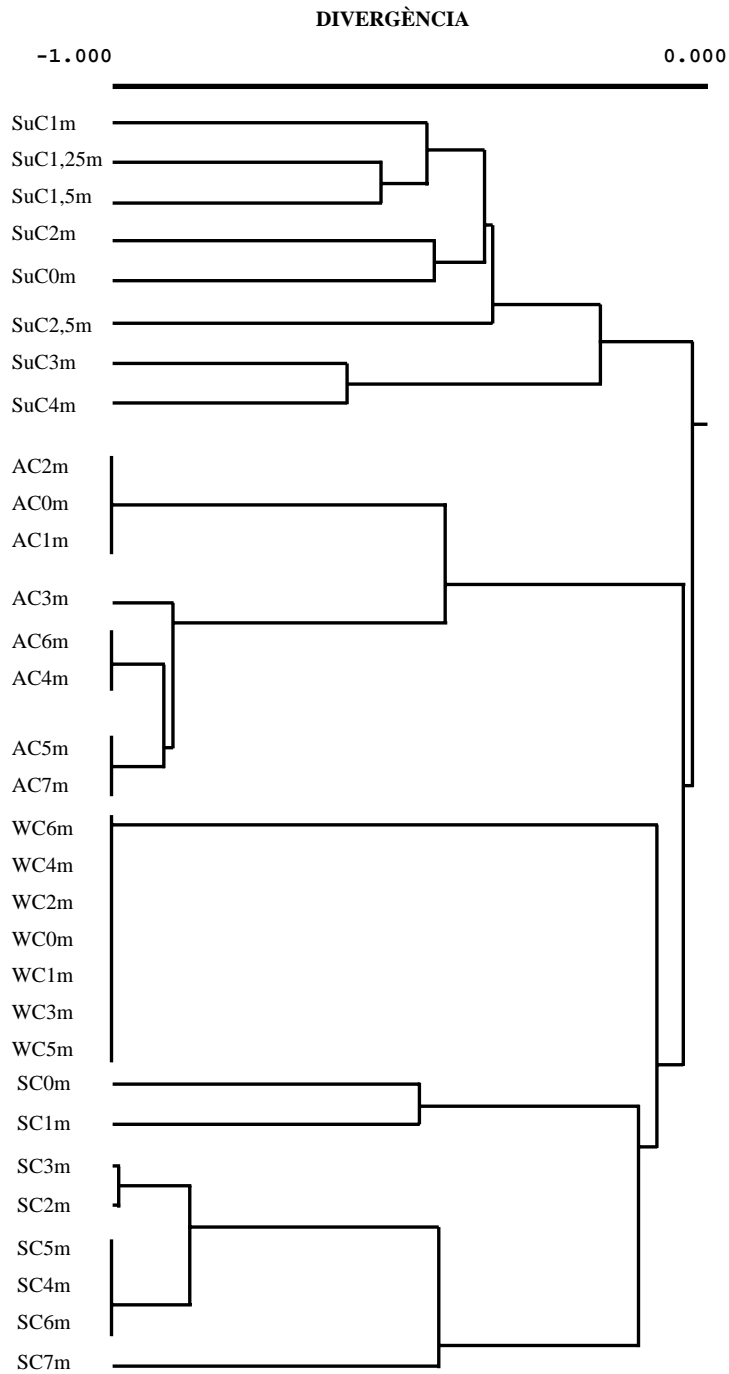


Figura IV-9. Dendrograma de dissimilitud dels 16S ADNr-RFLP de les comunitats bacterianes presents a l'estanyol d'en Cisó per anàlisi de la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AluI* amb el mètode UPGMA. L'anàlisi de grups està basada en les distàncies euclidianes quadrades com a mesura de la dissimilitud genètica utilitzant el mètode d'unió per mitjanes o *average linkage method*

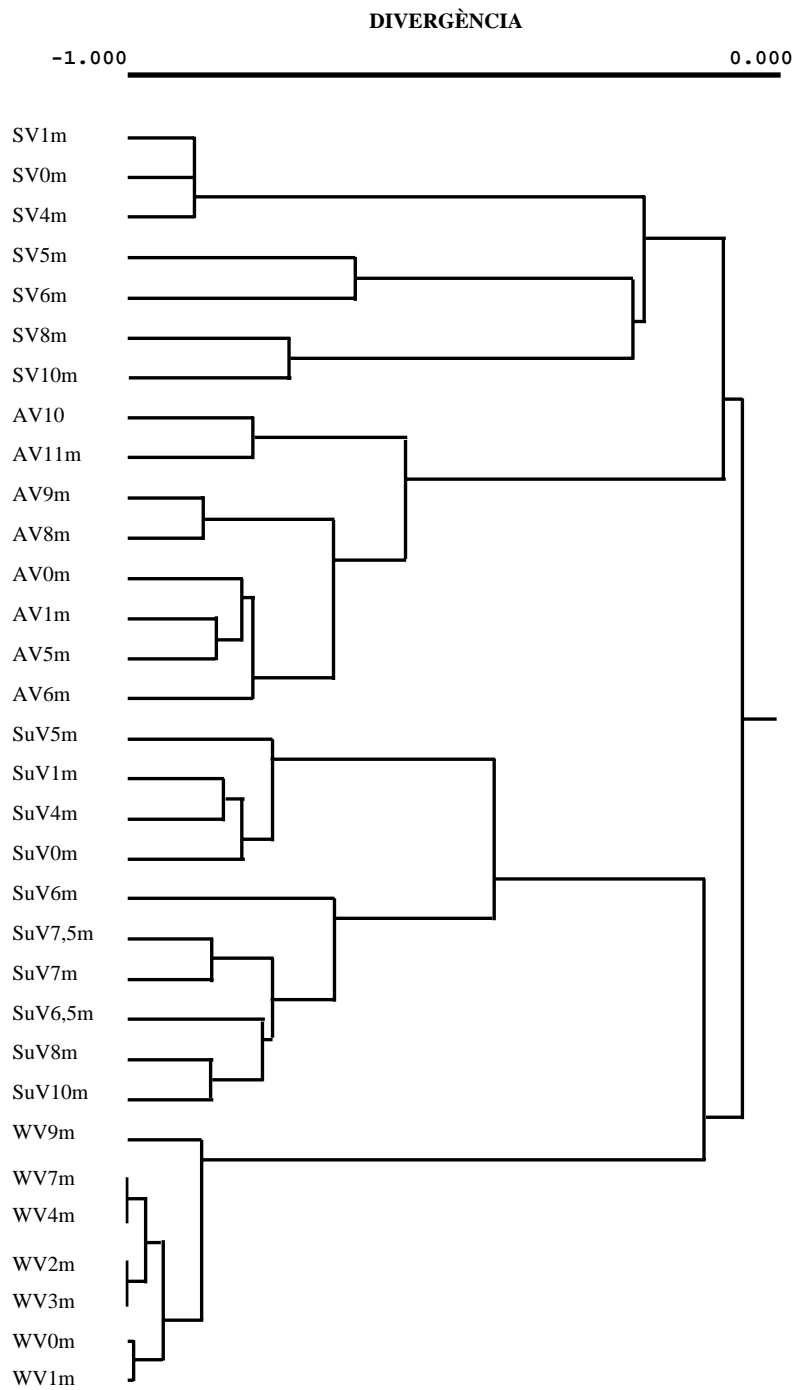


Figura IV-10. Dendrograma de dissimilitud dels 16S ADN-RFLP de les comunitats bacterianes presents a l'estanyol del Vilar per anàlisi de la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AluI* amb el mètode UPGMA. L'anàlisi de grups està basada en les distàncies euclidianes quadrades com a mesura de la dissimilitud genètica utilitzant el mètode d'unió per mitjanes o *average linkage method*

En comparar les diferents mostres estacionals de l'estanyol d'en Cisó en els mapes MDS (figura IV-11A), on els punts són més propers com més similars són les mostres entre si, podem concloure que la mostra de la primavera tenia un grau de similitud superior amb les mostres d'estiu i hivern que amb la de la tardor. Cal destacar també que els valors de similitud més baixos s'observaren entre les mostres d'estiu i hivern. A l'estanyol del Vilar els agrupaments estacionals dins de les diferents mostres van ser molt més pròxims entre si, a diferència del que s'observa en el d'en Cisó. Els graus de similitud més baixos es van donar entre la mostra de la primavera amb la d'estiu i hivern, mentre que les mostres més semblants entre si foren les d'estiu i hivern.

La comparació entre el nombre total de fragments de restricció obtinguts en les diferents estacions de l'any a l'estanyol del Vilar mostrà diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) després de ser analitzades amb la prova de Kruskal-Wallis. A l'estanyol d'en Cisó, en canvi, aquestes diferències no foren significatives. Finalment, l'anàlisi per t de Student de la mitjana de fragments obtinguts en cadascuna de les fondàries determinà que en ambdós estanyols hi havia una disminució significativa ($p < 0,001$) d'aquesta mitjana a fondàries iguals o superiors a 7 m. A més, l'anàlisi de la mitjana del nombre de fragments obtinguts en ambdós estanyols per t de Student demostrà també que aquesta era estadísticament diferent ($p < 0,001$).

IV.4 Discussió

Durant molts anys, l'aplicació de mètodes cultivodependents a permès estudiar l'estructura de les comunitats bacterianes presents als ambients naturals. Els estanyols d'en Cisó i el Vilar no en van ser una excepció i, basant-se en els resultats obtinguts amb tècniques convencionals de microbiologia, es van determinar variacions en la composició de les comunitats bacterianes de tipus estacional (Abellà, 1980; Esteve *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1980; Gasol *et al.*, 1990; Mir *et al.*, 1991; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993). Actualment, l'ús de tècniques no cultivodependents combinades amb les tècniques clàssiques ha permès ampliar els coneixements de multitud d'ecosistemes complexos. Amb la finalitat de completar els coneixements en ambdós estanyols, el d'en Cisó i el del Vilar, ens vam proposar fer un seguiment estacional dels paràmetres fisicoquímics que s'hi estableixen en fondària, obtenir els RFLP a partir de l'amplificació dels gens bacterians dels 16S ARNr per PCR i de la subsegüent digestió amb enzims de restricció i, finalment, relacionar els canvis dels RFLP amb les fluctuacions dels diferents paràmetres mesurats.

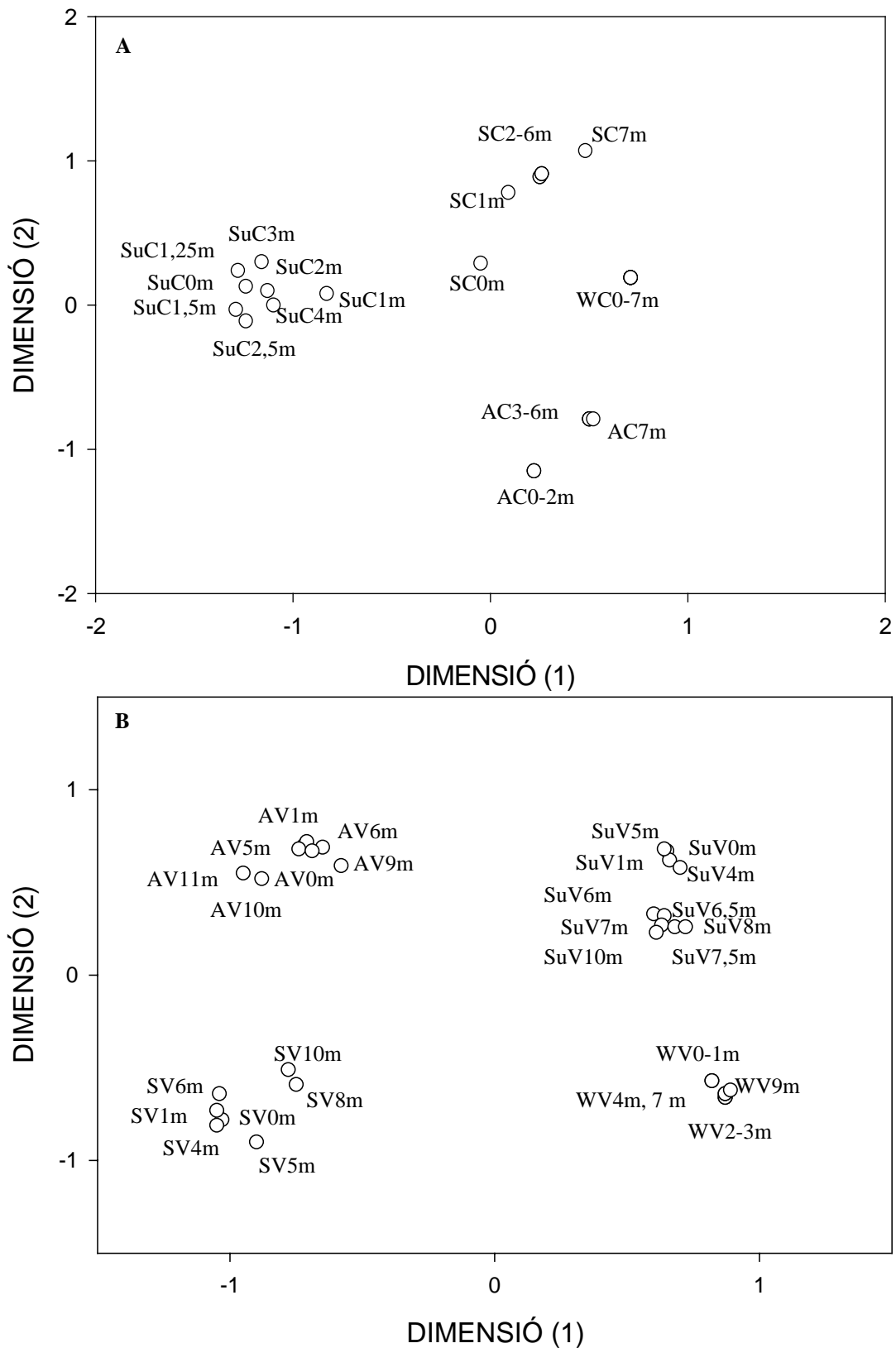


Figura IV-11. Mapes MDS on es reflecteixen els canvis de les comunitats bacterianes als estanyols d'en Cisó (C) i el Vilar (V), obtinguts per la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AluI*. Els números de fora el símbol (o) es corresponen amb les diferents submostres

La presència d'una capa densa i mineralitzada d'aigua al fons de l'estanyol del Vilar indicava la seva naturalesa meromíctica, i la distribució en fondària de la conductivitat a l'estanyol d'en Cisó mostrava la seva naturalesa holomíctica (Guerrero *et al.*, 1987). La distribució vertical d'alguns dels paràmetres fisicoquímics com són la llum, la temperatura i l'oxigen es mantenia en un rang de valors similar als prèviament descrits (Pedrós-Alió i Guerrero, 1993), mentre que la concentració de sulfur d'hidrogen fou més baixa que la descrita en treballs anteriors (Gasol, 1988; Guerrero i Abellà, 1978; Mir, 1997), cosa que mostra que hi ha hagut variacions als dos estanyols estudiats. Entre aquestes variacions hi trobem els enfonsaments produïts els anys 1982 (Mas, 1982), 1984, 1986 (García-Gil *et al.*, 1985) i 1992 (García-Cantizano, 1992) i els canvis poblacionals (Massana *et al.*, 1993), com l'aparició d'elevades concentracions a l'estiu de bacteris fototròfics anoxigènics com *Chromatium* i d'organismes fototròfics com *Cryptomonas*, els quals determinen, respectivament, que el consum i el grau d'oxidació del sulfur d'hidrogen siguin molt més elevats (Brugada i Montesinos, 1986; Gasol, 1988).

L'amplificació per PCR dels gens dels 16S ARNr ens va permetre detectar el domini *Bacteria* en totes les mostres i submostres dels dos estanyols, mentre que la detecció del domini *Archaea* en ambdós estanyols depengué de l'època de l'any i/o de les fondàries analitzades. Així doncs, mentre que el domini *Archaea* només es detectava a la part anoxigènica en totes les estacions de l'any a l'estanyol d'en Cisó, al Vilar es detectava a la part oxigènica (en tota la columna d'aigua a l'hivern i a 0 m a la tardor) i a la part anoxigènica total o parcial (a la primavera, estiu i tardor). La presència d'*Archaeas* a l'estanyol del Vilar, en les zones aeròbia i anaeròbia, posava de manifest la possible versatilitat fisiològica d'aquest grup que s'ha descrit en treballs anteriors (Cytryn *et al.*, 2000; Jungers *et al.*, 1997; Massana *et al.*, 2000; Ovreås *et al.*, 1997). Els nostres resultats concorden, quant a la presència o absència de poblacions d'*Archaeas*, amb estudis previs realitzats en aquests sistemes estratificats (Casamayor *et al.*, 2001b). En aquests estudis, es demostra la presència d'*Archaeas* del tipus metanògens i *Thermoplasma* en la part anoxigènica de l'estanyol d'en Cisó i la presència d'una població planctònica del tipus *Crenarchaeota* a l'estanyol del Vilar. La poca quantitat de 16S ADNr d'*Archaeas* obtinguda per PCR podria indicar que hi ha molt pocs membres d'aquest domini als estanyols estudiats, encara que no es poden descartar altres efectes derivats de l'estructura de l'ADN diana i/o de la seqüència dels encebadors (Martínez-Murcia *et al.*, 1995).

El nombre total de fragments de restricció obtinguts a partir dels 16S ADNr bacterians en les diferents estacions de l'any a l'estanyol d'en Cisó (32,1-34,4) era molt similar i no presentava diferències estadísticament significatives. Més elevat que l'anterior, aquest nombre va ser també molt semblant entre les diferents estacions de l'any al Vilar (36,8-43,7), però en aquest cas mostraven diferències estadísticament significatives. Si es compara la mitjana del nombre total de fragments obtinguts al llarg de

l'any en ambdós estanyols, s'hi troba una diferència ($33,19 \pm 3,5$ en el d'en Cisó i $39,6 \pm 4,05$ al Vilar) estadísticament significativa deguda, probablement, al fet que l'origen limnològic i les condicions biòtiques i abiòtiques que s'hi estableixen són diferents (Gasol *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1987; Murray *et al.*, 1996). Així doncs, com ja s'ha descrit en estudis anteriors (Jorgensen *et al.*, 1982), mentre que el sulfur d'hidrogen no es detecta en les capes superficials de l'estanyol del Vilar perquè pot ser oxidat a la interfase d'oxigen-sulfur d'hidrogen, al Cisó es troba en tota la columna d'aigua durant el període de barreja. Ambdós estanyols estan compostos, a més a més, per diferents poblacions bacterianes, tal com es demostra en treballs anteriors, i són els membres dels grups dels proteobacteris α , β i γ les poblacions dominants a l'estanyol d'en Cisó i el grup *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* i els cianobacteris els dominants al Vilar (Casamayor *et al.*, 2000, 2002). El nombre total de fragments de restricció detectats en fondària i en les diferents estacions en ambdós estanyols era variable. Malgrat això, s'observà en la mostra d'estiu, a l'estanyol del Vilar, que el nombre de fragments de restricció incrementava en fondària i passava de 31 en la part aeròbica de l'estanyol (SuV0-5m) a 41 en la part anaeròbica (SuV6-11m), fet no observat tan clarament en el Cisó. L'obtenció d'un nombre total de fragments de restricció inferior a la part superficial de l'estanyol, entre d'altres, podria derivar-se de les diferències quant a la concentració d'oxigen i sulfur d'hidrogen en ambdues parts de l'estanyol. No obstant això, tampoc no podem descartar que hi hagi migracions verticals d'alguns organismes fototròfics per a evitar la mort, depredació o ser danyats com a conseqüència de l'elevada irradiació solar incident, tal com s'ha descrit prèviament en tapisos microbians (García-Pichel *et al.*, 1994; Krekeler *et al.*, 1998) o en ambients aquàtics (Guyoneaud *et al.*, 2001).

En les estacions de l'any on la distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics no és constant en fondària, les diferències intramostra entre els patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians es van observar majoritàriament entre les parts oxigènica i anoxigènica en ambdós estanyols, tal com es descriu en d'altres llacs estratificats mitjançant l'ús de DGGE (Konopka *et al.*, 1999) i TGGE (Bosshard *et al.*, 2000a-b). Addicionalment, la detecció de fragments comuns a totes les fondàries en aquestes estacions de l'any ens podria indicar que alguns dels ribotips poden estar adaptats a condicions ambientals molt diferents mitjançant la migració vertical al llarg de tota la columna d'aigua o l'ús de vies metabòliques diferents i/o alternatives a les utilitzades habitualment (Gasol *et al.*, 1990; Glöckner *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 1987; Gordon i Gionannoni, 1996; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993; Soutourina *et al.*, 2001). Aquest fet podria ser l'explicació, a més a més, que tots els pigments analitzats siguin detectats al llarg del perfil vertical de l'estanyol, encara que a diferents percentatges en funció de la concentració d'aquests ribotips en la fondària analitzada (Guerrero *et al.*, 1980; Pedrós-Alió *et al.*, 1983, 1984). Tal com es podia esperar, i seguint la distribució vertical uniforme de la majoria dels paràmetres fisicoquímics, durant el període de

barreja els patrons de restricció al llarg de tota la columna d'aigua no variaven o ho feien molt poc, cosa que ens indicaria la presència només d'uns quants ribotips dominants durant aquest període. A causa de l'elevat grau de conservació dels gens del 16S ARNr, no podem descartar que diferents bacteris tinguin els mateixos llocs de restricció i, per tant, presentin els mateixos patrons de restricció (Urakawa *et al.*, 1997, 1998). Cal destacar també que els RFLP obtinguts a partir de diferents rèpliques d'una mateixa submostra eren idèntics, tant si aquesta havia estat filtrada com centrifugada. Aquest fet ens permet afirmar, així, que la metodologia utilitzada no afectava el grau de recuperació dels bacteris dominants en ambdós sistemes i que, per tant, els resultats obtinguts amb aquesta tècnica són fiables independentment del mètode de recuperació cel·lular utilitzat.

A l'estanyol d'en Cisó, quan comparàvem visualment els patrons dels 16S ADN-RFLP bacterians obtinguts en les diferents mostres estacionals, vèiem que les mostres de la primavera i les d'hivern s'assemblaven entre si. Concretament, els patrons de la mostra d'hivern presentaven un grau de similitud superior per a les submostres de la part anaeròbica de la primavera que per a les submostres de la part aeròbica (figura IV-6). Aquest fet podria ser degut al creixement de noves poblacions heterotròfiques del domini *Bacteria* en l'epilímnion del Cisó a la primavera, tal com s'ha descrit anteriorment (Casamayor *et al.*, 2000). A l'estanyol del Vilar, en canvi, el creixement de noves poblacions fototròfiques oxigèniques i heterotròfiques en les parts metalímniques i hipolímniques a la primavera determinen que aquesta similitud sigui gairebé inapreciable (Casamayor *et al.*, 2000).

Els patrons de restricció es van comparar emprant el coeficient de Jaccard i construïnt els dendrogrames i mapes MDS pertinents a partir de les matrius de similitud (figures IV-9 i IV-10). Amb els tres enzims, els resultats mostraven una distribució estacional de les mostres. A l'estanyol del Vilar s'ha confirmat aquesta estacionalitat amb l'anàlisi estadística, ja que les diferències obtingudes són significatives. En el d'en Cisó, en canvi, aquesta distribució estacional no s'ha posat de manifest. A diferència d'altres estudis on es veu que l'estratificació vertical és el principal factor estructurador (Acinas *et al.*, 1997; Gasol, 1988), en aquests ecosistemes la fluctuació estacional és el component principal a partir del qual es deriva l'estructura de les poblacions, tal com s'ha descrit en tapisos microbians (MacGregor *et al.*, 2001; Ramírez-Moreno *et al.*, 2002) i a l'estany de Banyoles (Gasol, 1988). A més, cal destacar també que les mostres dels dos estanyols, una vegada agrupades per estacions de l'any, mostren una sèrie de subagrupacions en funció de la fondària. Així doncs, encara que estacional, podem veure que la distribució de les mostres en ambdós estanyols té un cert component fisiològic o de fondària. Malgrat aquesta observació, estadísticament no es pot afirmar, ja que les diferències són significatives només a partir de 7 metres de fondària. Tal com s'ha descrit, això podria ser degut al fet que la variació en

fondària passa a ser un eix d'estructuració quan el grau d'estabilitat tèrmica als estanyols augmenta (Gasol, 1988; Àvila *et al.*, 1984).

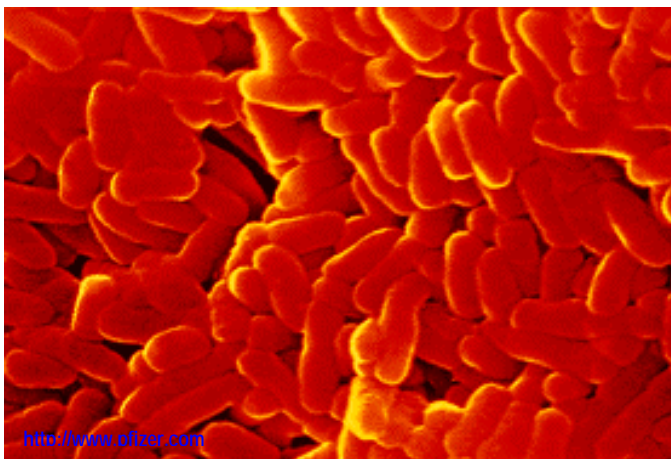
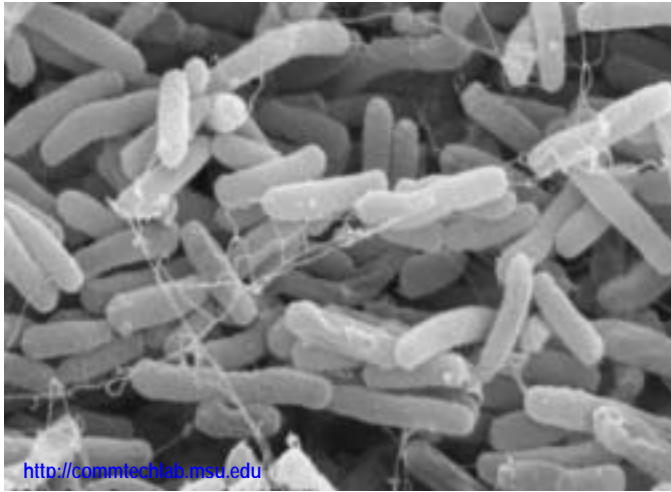
IV.5 Conclusions

Les conclusions principals que s'han extret després de fer un seguiment anual als estanyols d'en Cisó i el Vilar són les següents:

1. Els paràmetres fisicoquímics presents al llarg de la columna d'aigua en ambdós estanyols estudiats, el d'en Cisó i el del Vilar, es distribueixen en fondària de forma similar als descrits en d'altres treballs. No obstant això, la concentració de sulfur d'hidrogen en ambdós sistemes lacustres és més petita.
2. El protocol utilitzat per extreure ADN ens proporciona el material de partida amb un grau de puresa suficient per a poder amplificar els gens procariòtics dels 16S ARNr per PCR. El domini *Bacteria* es detecta en totes les mostres i submostres dels dos estanyols, mentre que la detecció del domini *Archaea* en ambdós estanyols depengué de l'època de l'any i/o de la fondària analitzades. Així doncs, mentre que el domini *Archaea* només es detecta en la part anoxigènica de l'estanyol d'en Cisó, al Vilar es detecta en la part oxigènica i en la part anoxigènica (totalment o parcialment).
3. L'anàlisi dels 16S ADNr-RFLP bacterians obtinguts a partir de les mateixes mostres mitjançant centrifugació o filtració demostra que els patrons són idèntics, pla qual cosa permet assegurar que la metodologia emprada en aquest estudi no afecta els resultats obtinguts amb aquesta tècnica.
4. La variació del nombre total de fragments de restricció obtinguts a partir dels 16S ADNr bacterians en les diferents estacions de l'any a l'estanyol d'en Cisó (32,1-34,4) és molt petita i no mostra diferències estadísticament significatives. Al Vilar, en canvi, la diferència observada és superior (36,8-43,7) i estadísticament significativa ($p < 0,05$). A més, si comparem la mitjana anual del nombre total de fragments obtinguts en ambdós estanyols ($33,19 \pm 3,5$ en el d'en Cisó i $39,6 \pm 4,05$ al Vilar) s'hi troba una diferència estadísticament significativa ($p < 0,001$).
5. La detecció de fragments de restricció específics en determinades fondàries d'un mateix dia de mostreig ens indica que algunes poblacions es poden trobar en fondàries concretes, mentre que

l'observació de fragments de restricció presents en totes aquestes fondàries implica una distribució homogènia d'altres poblacions al llarg de tot el perfil vertical dels estanyols estudiats.

6. La comparació dels 16S ADNr-RFLP bacterians obtinguts a partir de les diferents mostres i submostres amb els mètodes UPGMA i MDS, indica una distribució estacional de les poblacions bacterianes presents. En ambdós estanyols, la distribució estacional és la més acusada. No obstant això, es detecta també un cert component estructurador de tipus fisiològic al llarg del període d'estudi en funció de la presència o absència de llum i oxigen, entre d'altres.



V. Experiment teoricopràctic

V.1 Introducció

V.2 Objectius

V.3 Resultats

V.3.1 Anàlisi teòrica

V.3.1.1 Estimacions teòriques

V.3.1.2 16S ADNr-RFLP

V.3.2 Anàlisi experimental

V.3.2.1 16S ADNr-RFLP de cultius bacterians purs

V.3.2.2 16S ADNr-RFLP de mescles bacterianes

V.4 Discussió

V.5 Conclusions

V.1 Introducció

La PCR ha esdevingut una de les tècniques més emprades pels investigadors en el camp de la biologia en la darrera dècada. En l'àmbit de la microbiologia, i concretament en estudis d'ecologia microbiana, la PCR és actualment una eina bàsica i imprescindible de treball, ja que moltes de les tècniques moleculars emprades en aquest tipus d'estudis l'apliquen en alguna de les seves etapes.

L'aplicació de la PCR permet detectar la presència de tàxons específics mitjançant l'amplificació d'un determinat fragment d'un gen, i n'és un exemple l'ús de llocs conservats dintre del 16S ADNr on s'uneixen els encebadors per a amplificar els gens ribosomals. L'amplificació per PCR dels gens ribosomals dels 16S ARNr i la subsegüent digestió amb enzims de restricció d'alta freqüència de tall (RFLP) permeten analitzar poblacions bacterianes complexes i, a més a més, detectar variacions en els seus patrons de restricció quan es donen canvis en l'estructura de l'ecosistema estudiat. Com a conseqüència, l'anàlisi dels RFLP ha demostrat ser de gran utilitat i importància en estudis d'ecologia microbiana on s'analitzen variacions espaciotemporals de les poblacions microbianes (Martínez-Murcia *et al.*, 1995, Ramírez-Moreno *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1998; Acinas *et al.*, 1997).

El rendiment de la PCR, però, tal com s'ha descrit en la introducció general (capítol I), està limitat per molts factors. Entre aquests trobem l'amplificació preferent de les seqüències més abundants, la formació de productes quimèrics, el nombre d'operons dels gens que s'han d'analitzar, el tamany del genoma, la baixa eficiència d'amplificació deguda a l'alt contingut de GC de l'ADN diana, la temperatura d'unió dels encebadors, l'homologia dels encebadors amb la seqüència diana, el nombre de cicles de la PCR, l'accessibilitat de la zona que s'ha d'amplificar, l'heterogeneïtat dels operons dintre d'una mateixa espècie o entre espècies diferents, etc. (Chandler *et al.*, 1997a; Chang *et al.*, 2000; Farrelly *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1998; Innis i Gelfand, 1990; Ishii i Fukui 2001; Kidd i Ruano, 1995; Reysenbach *et al.*, 1992; Schmalenberger *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1996; Wilson, 1997; Wintzingerode *et al.*, 1997). Així doncs, i com que la quantitat de producte obtingut per PCR depèn de tots els factors esmentats anteriorment, és possible que es desestimïn o se sobrevalorin determinades espècies bacterianes presents en una mescla complexa.

En aquest estudi, s'ha desenvolupat una aproximació teoricopràctica per a esbrinar com la presència de mal aparellament entre els encebadors i les seqüències diana d'aquests i el diferent nombre d'operons d'ADNr influencien els patrons de restricció dels gens que codifiquen pels 16S ARNr en

poblacions microbianes mixtes. Amb aquest propòsit, es van seleccionar i combinar quatre soques bacterianes a diferents proporcions, de les quals es coneixien el nombre d'operons dels gens dels 16S ARNr i el grau d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana. Les quatre soques tipus emprades van ser *Escherichia coli* K-12 (set operons d'ADNr i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors), *Salmonella typhimurium* LT2 (set operons d'ADNr i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors), *Bacillus cereus* ATCC 10876 (dotze operons d'ADNr i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors) i *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (tres operons d'ADNr i un 84,2% d'homologia per a ambdós encebadors).

V.2 Objectius

Els objectius que ens vam marcar amb l'anàlisi teòrica i molecular de les diferents mescles bacterianes, constituïdes per combinacions de les quatre soques esmentades anteriorment, foren els següents:

1. Determinar si els patrons teòrics, obtinguts per predicció a partir de les bases de dades, es corresponen amb els patrons experimentals per anàlisi dels 16S ADNr-RFLP.
2. Analitzar teòricament com el nombre de cicles de la PCR, el nombre de còpies dels operons de l'ADNr per cèl·lula, el nombre inicial de cèl·lules, entre d'altres, afecten la quantitat de producte obtingut per PCR en mescles de bacteris i, per tant, l'anàlisi final dels 16S ADNr-RFLP.
3. Estudiar l'efecte produït sobre els patrons de restricció dels gens que codifiquen pels 16S ARNr en poblacions bacterianes mixtes per la presència de mals aparellaments entre els encebadors i les seves seqüències diana i el diferent nombre d'operons d'ADNr.
4. Determinar els límits inferiors de detecció dels diferents bacteris per anàlisi dels 16S ADNr-RFLP.

V.3 Resultats

V.3.1 Anàlisi teòrica

La PCR consta bàsicament de tres etapes: la desnaturalització tèrmica de l'ADN diana, la unió d'encebadors sintètics a l'ADN diana i l'extensió dels encebadors units amb l'enzim ADN polimerasa. Aquestes tres etapes es repeteixen un nombre determinat de vegades, i la quantitat de producte es duplica en cadascuna de les repeticions. El factor d'amplificació (F_E) és determinat per l'equació:

$$F_E = n(1 + E)^x$$

on n és la quantitat inicial d'ADN diana, E és l'eficiència d'amplificació i x el nombre de cicles de la PCR (Dennis Lo, 1998). Si considerem que l'eficiència d'extracció de l'ADN d'una població bacteriana és del 100%, en l'amplificació per PCR d'un *locus* senzill n serà igual al nombre de cèl·lules que s'han utilitzat per a obtenir l'ADN diana. A més a més, si suposem que l'eficiència d'amplificació també és del 100% ($E=1$), el factor d'amplificació serà determinat per la següent equació:

$$F_E = n2^x$$

on n és la quantitat inicial d'ADN diana o, el que és igual, el nombre inicial de cèl·lules. Emprant la segona equació, i si s'amplifiquen dues poblacions bacterianes diferents per un determinat *locus* i es parteix d'un nombre idèntic de cèl·lules per a cadascuna d'aquestes poblacions, les variacions finals del factor d'amplificació es poden atribuir a variacions en el nombre de còpies per cèl·lula del *locus* amplificat. Així doncs, l'anàlisi de mescles de poblacions bacterianes que tenen diferent nombre d'operons per l'ADNr pot reflectir variacions degudes a la quantitat inicial d'ADN diana.

D'altra banda, l'alta sensibilitat de la PCR determina que petites variacions entre les seqüències diana de poblacions bacterianes diferents donin com a resultat eficiències d'amplificació (E) molt dispars (Raeymaekers, 1998) i, per tant, quantitats de producte diferents. No obstant això, no podem descartar que l'eficiència d'amplificació de la PCR, a més a més, sigui influenciada per d'altres factors com són les condicions i el material utilitzat en la PCR. Per exemple, una seqüència d'ADN diana amplificada sota

condicions on la E és igual a 1 (en cada cicle F_E és igual a 2, el màxim valor teòric possible) generarà, després de 35 cicles, una quantitat de producte 6,1 vegades més gran que en altres condicions on la E sigui 0,9 (F_E igual a 1,9), i 40,2 vegades més gran que en altres condicions on la E sigui 0,8 (F_E igual a 1,8). Així doncs, veiem que el grau de complementarietat entre els encebadors i l'ADN diana és un paràmetre crític que influencia l'eficiència quan s'amplifica per un *locus* homòleg de poblacions bacterianes diferents (Ishii i Fukui, 2001). En realitat, encara que les reaccions de PCR toleren un grau elevat de mal aparellament, com més gran és aquest, menor és l'eficiència d'amplificació (Dennis Lo, 1998). Per aquest motiu, l'ús d'encebadors heteròlegs, originàriament dissenyats a partir d'una seqüència i per amplificar seqüències relacionades, pot ser una font d'error a causa de la presència de mal aparellament a les regions on s'han d'unir els encebadors (Kidd i Ruano, 1995). A més, quan la temperatura d'unió dels encebadors es troba per sobre de la T_d , temperatura a la qual la meitat dels encebadors estan units a la seqüència diana i calculada a partir de l'equació que es descriu a continuació, provoca una davallada de l'eficiència de la PCR:

$$T_d = 4(G + C) + 2(A + T)$$

on A, C, G i T són el número d'aquestes bases en els encebadors (Kidd i Ruano, 1995).

V.3.1.1 Estimacions teòriques

En la taula V-1 es mostren els factors d'amplificació esperats teòricament si s'amplifica un fragment dels gens dels 16S ARNr de poblacions bacterianes diferents amb un nombre diferent d'operons durant 35 cicles de PCR, sempre que partim del mateix nombre de cèl·lules de cadascuna de les poblacions.

En aquest estudi, els encebadors són complementaris a l'ADNr en un 100% en tots els casos llevat de l'encebador revers quan s'uneix als operons d'ADNr de *R. sphaeroides* 2.4.1. En aquest darrer cas, només setze dels dinou nucleòtids de l'encebador són complementaris, cosa que dona com a resultat una baixada de la T_d de 54 a 44 °C. S'ha considerat la màxima eficiència de E ($E=1$) quan la T_d de l'encebador unit sigui de 54 °C. Per als encebadors que no presenten un 100% d'homologia, E és igual a $T_d / 54$. Així doncs, en el cas de *R. sphaeroides* 2.4.1 el mal aparellament de l'encebador revers produeix una disminució de l'eficiència de la PCR d'1 a 0,81.

Soca	Nombre de cicles de PCR	Nombre inicial de cèl·lules	Còpies d'operons d'ADNr per cèl·lula	$n2^x$
A	35	1	1	$3,44 \times 10^{10}$
B	35	1	3	$10,30 \times 10^{10}$
C	35	1	7	$24,05 \times 10^{10}$
D	35	1	12	$41,23 \times 10^{10}$

Taula V-1. Nombre teòric de còpies d'ADNr de poblacions bacterianes diferents, i amb diferent nombre d'operons d'ADNr per cèl·lula, realitzant 35 cicles de PCR i partint del mateix nombre inicial de cèl·lules. n , nombre inicial de cèl·lules; x , nombre de cicles de PCR

La taula V-2 mostra els factors d'amplificació teòrics esperats quan s'amplifica a partir del mateix nombre de cèl·lules, i sota les condicions descrites anteriorment, el *loci* dels gens dels 16S ARNr de les quatre soques seleccionades per realitzar l'estudi.

Soca	Nombre de cicles de PCR	Còpies d'operons d'ADNr per cèl·lula	Eficiència de la PCR	F_E	$n F_E^x$ per cèl·lula	Ràtio vs. <i>E. coli</i>
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	35	3	0,81	1,81	$3,0 \times 10^9$	0,01
<i>E. coli</i> K-12	35	7	1	2	$2,4 \times 10^{11}$	1
<i>S. typhimurium</i> LT2	35	7	1	2	$2,4 \times 10^{11}$	1
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	35	12	1	2	$4,1 \times 10^{11}$	1,72

Taula V-2. Factors d'amplificació teòrics de les diferents soques utilitzades en l'estudi. n , còpies dels operons d'ADNr. x , nombre de cicles de PCR

Els resultats que es mostren en la taula V-2, per a *R. sphaeroides* 2.4.1, indiquen que el mal aparellament de l'encebador revers i el nombre baix d'operons d'ADNr determinen que el seu factor d'amplificació respecte del d'*E. coli* K-12 sigui molt més baix, essent la proporció de només 0,01. Per tant, en l'amplificació d'ADNr que prové d'una mescla on hi ha *R. sphaeroides* 2.4.1 i *E. coli* K-12, l'ADNr d'*E. coli* K-12 serà amplificat preferentment amb una proporció 99/1. En canvi, si comparem soques amb un nombre idèntic d'operons i amb un 100% d'homologia per als dos encebadors, com és el cas de les mescles fetes amb *S. typhimurium* LT2 i *E. coli* K-12, el factor d'amplificació és igual per a ambdues

soques, i amplifica la mateixa quantitat d'ADNr a partir de cadascuna de les soques sempre que les quantitats inicials d'ADN motlle no siguin diferents. Finalment, *B. cereus* ATCC 10876, tot i tenir un 100% d'homologia per a ambdós encebadors, el factor d'amplificació és 1,7 vegades superior al d'*E. coli* K-12 a causa del nombre més alt d'operons que presenta.

V.3.1.2 16S ADNr-RFLP

La taula V-3 mostra el tamany dels fragments de restricció esperats a nivell teòric, en base a l'anàlisi de les seqüències disponibles en la base de dades del NCBI, quan els ADNr obtinguts per la PCR es digereixen amb els enzims de restricció *AluI* i *HinI*. Els patrons de restricció predits a nivell teòric per cadascuna de les soques tipus i les diferents mescles bacterianes es mostren en la figura V-1.

Soca	Tamany teòric dels RFLP	
	<i>AluI</i>	<i>HinI</i>
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	755, 259, 222, 200	929, 309, 173, 25
<i>E. coli</i> K-12	374, 361, 211, 207, 86, 79, 75, 68, 42	656, 329, 317, 137, 36, 15, 13
<i>S. typhimurium</i> LT2	572, 374, 207, 165, 75, 68, 42	656, 332, 317, 137, 33, 15, 13
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	598, 224, 186, 174, 172, 75, 58, 21	976, 341, 166, 25

Taula V-3. Tamany teòric dels fragments de restricció de les diferents soques tipus utilitzades en l'estudi

V.3.2 Anàlisi experimental

Per a comprovar si els patrons de restricció predits a partir de les bases de dades es corresponien amb els obtinguts experimentalment, les quatre soques tipus d'origen bacterià descrites en l'apartat II.1.1 (taula II-1) es van fer créixer a les condicions indicades (apartat II.1.2). Una vegada calculada la concentració cel·lular de les soques, tal com es detalla en l'apartat II.3.5.2.2, les suspensions cel·lulars es van diluir amb PBS 1X fins a $1,55 \times 10^8$ cèl·lules per ml i es van fer mescles bacterianes a les proporcions indicades en l'annex 6. A més, i a partir de cadascuna de les soques tipus a $1,55 \times 10^8$ cèl·lules per ml, es va fer una mescla al 25% (50 µl de cadascuna de les soques tipus) i una on hi havia la mateixa quantitat d'operons de cadascuna de les soques (40 µl d'*E. coli* K-12, 40 µl de *S. typhimurium* LT2, 93,4 µl de *R. sphaeroides* 2.4.1 i 23,4 µl de *B. cereus* ATCC 10876).

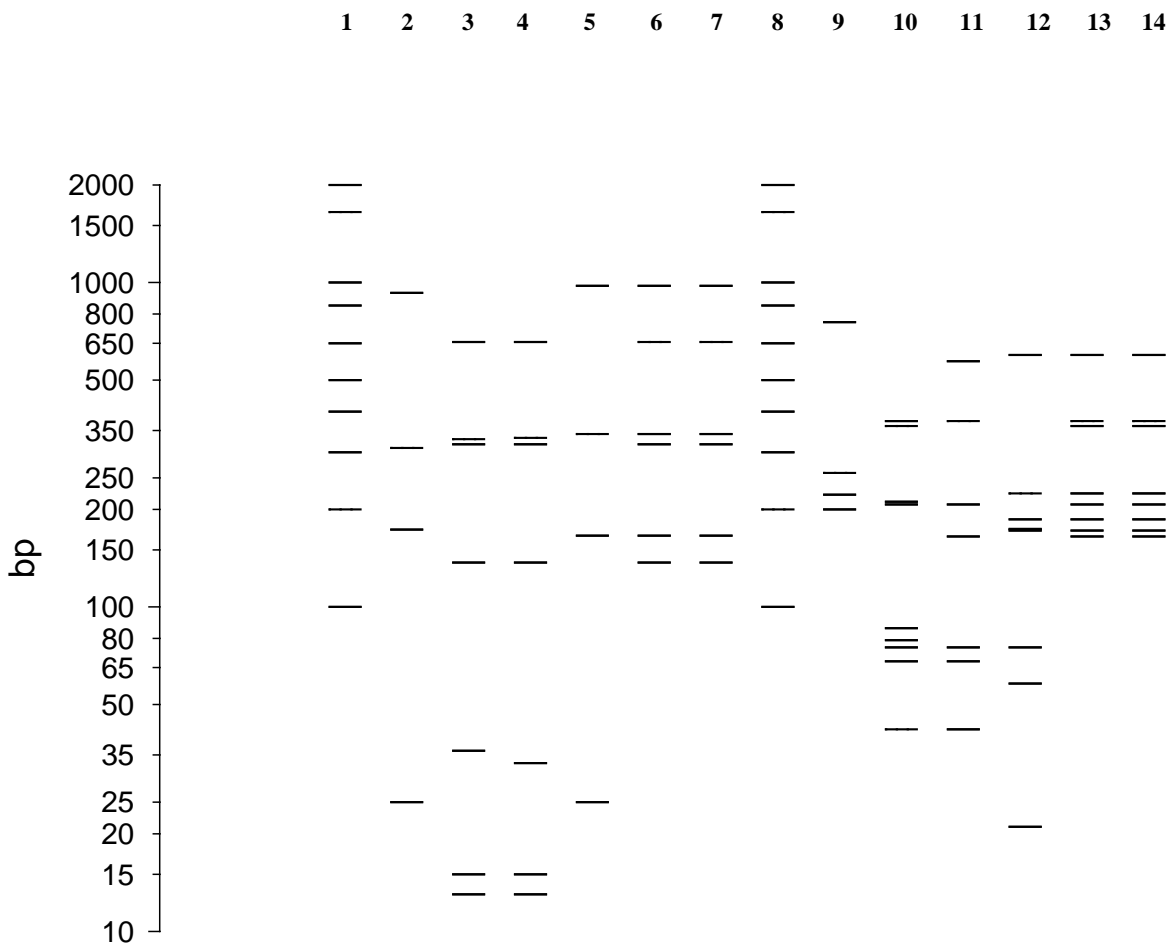


Figura V-1. Patrons teòrics dels 16S ADNr-RFLP de *R. sphaeroides* 2.4.1 (R), *E. coli* K-12 (E), *S. typhimurium* LT2 (S), *B. cereus* ATCC 10876 (B) i de mescles d'aquestes quatre soques després de digerir amb *Hinf*I (carrils 2-7) i *Alu*I (carrils 9-14). Marcador de pes molecular 1 kb plus DNA ladder (MW) (Invitrogen). Carrils: 1 i 8, MW; 2 i 9, R; 3 i 10, E; 4 i 11, S; 5 i 12, B; 6 i 13, mescles de R+E+S+B al 25% per a cadascuna de les soques; 7 i 14, mescles de R+E+S+B amb idèntic nombre inicial d'operons per a cadascuna de les soques

V.3.2.1 16S ADNr-RFLP de cultius bacterians purs

Experimentalment, es va demostrar que els 16S ADNr-RFLP obtinguts a partir de cadascuna de les soques tipus utilitzades en l'estudi (figures V-2, V-3, V-4 i V-5) coincidien amb els patrons de restricció esperats teòricament (figura V-1).

V.3.2.2 16S ADN-RFLP de mescles bacterianes

En l'amplificació per PCR dels ADNr de les mescles d'*E. coli* K-12 i *R. sphaeroides* 2.4.1, descrites en l'annex 6, l'anàlisi posterior dels RFLP va permetre detectar el patró de restricció d'*E. coli* K-12 quan aquest bacteri només representava un 2% del total de la mescla. En canvi, el patró corresponent a *R. sphaeroides* 2.4.1 no es detectava fins que aquest bacteri representava almenys el 70% (figura V-2). Es van obtenir resultats idèntics quan es va analitzar la mescla de *S. typhimurium* LT2 i *R. sphaeroides* 2.4.1. Així doncs, *S. typhimurium* LT2 era majoritari quan representava el 2% del total de la mescla, mentre que *R. sphaeroides* 2.4.1 no es detectava fins que era almenys del 70%. D'altra banda, quan *R. sphaeroides* 2.4.1 es mesclava amb *B. cereus* ATCC 10876, el primer no es detectava fins que era del 90% del total de la mescla i el segon semblava que era majoritari quan era tan sols el 2% del total (figura V-2). Si la mescla estava constituïda per *B. cereus* ATCC 10876 i *S. typhimurium* LT2 o *B. cereus* ATCC 10876 i *E. coli* K-12 (figura V-3), en ambdós casos els bacteris podien ser detectats a partir de ser el 2% del total de la mescla. Finalment, i en la mescla d'*E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2, el primer es començava a detectar a partir de ser el 5% del total de la mescla, mentre que *S. typhimurium* LT2 havia de ser almenys el 30% d'aquesta (figura V-4).

L'anàlisi de les mescles fetes al 25% i amb el mateix nombre inicial d'operons per cadascun dels quatre bacteris objecte d'estudi ens va aportar els resultats que es mostren en la figura V-5A. *R. sphaeroides* 2.4.1 no es detectava amb cap dels dos enzims utilitzats, ja que no obteníem cap fragment específic per a aquest bacteri (fragment de 309 pb amb *Hinf*I o fragments de 755, 259, 200 pb amb *Alu*I). D'altra banda, la presència de fragments específics, de 976 i 166 i de 598 i 172 pb per digestió amb *Hinf*I i *Alu*I, respectivament, era indicatiu de la presència de *B. cereus* ATCC 10876. En canvi, la presència de *S. typhimurium* LT2 o d'*E. coli* K-12 en la mescla només es va poder discriminar quan es va utilitzar l'enzim *Alu*I, ja que amb l'altre enzim, *Hinf*I, els dos enterobacteris tenien els patrons de restricció idèntics (figura V-5B). Així doncs, la presència d'un fragment de 361 pb i de dos fragments de 572 i 165 pb en digerir amb l'enzim *Alu*I permetia discriminar la presència d'*E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2, respectivament.

Els límits inferiors de detecció o la presència de fragments específics en les diferents mescles analitzades corresponents als diferents bacteris es mostren a la taula V-4.

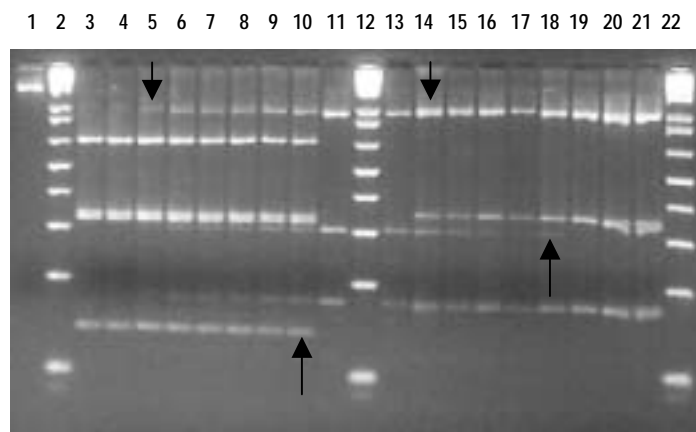


Figura V-2. Patrons experimentals dels 16S ADNr-RFLP de les mesclades d'*E. coli* K -12 (E), *R. sphaeroides* 2.4.1 (R) i de *B. cereus* ATCC 10876 (B) després de digerir amb *Hinf*I. Marcador de pes molecular 1 kb plus DNA ladder (MW) (Invitrogen). Carrils: 1, control negatiu de la digestió; 2 i 12 i 22, MW; 3, 100% E + 0% R; 4, 50% E + 50% R; 5, 30% E + 70% R; 6, 10% E + 90% R; 7, 7% E + 93% R; 8, 5% E + 95% R; 9, 3% E + 97% R; 10, 2% E + 98% R; 11, 0% R + 100% R; 13, 100% R + 0% B; 14, 98% R + 2% B; 15, 97% R + 3% B; 16, 95% R + 5% B; 17, 93% R + 7% B; 18, 90% R + 10% B; 19, 70% R + 30% B; 20, 50% R + 50% B; 21, 0% R + 100% B. Les fletxes senyalen el límit inferior de detecció dels diferents bacteris en les diferents mesclades

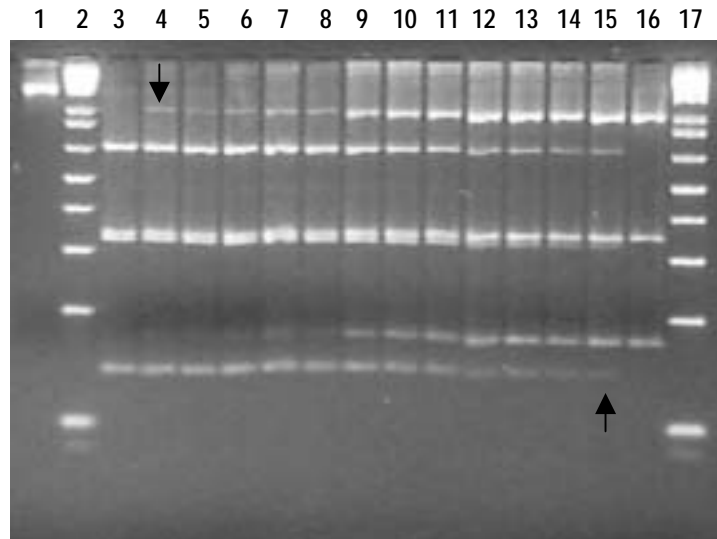


Figura V-3. Patrons experimentals dels 16S ADNr-RFLP de les mesclades d'*E. coli* K -12 (E) i *B. cereus* ATCC 10876 (B) després de digerir amb *Hinf*I. Marcador de pes molecular 1 kb plus DNA ladder (MW) (Invitrogen). Carrils: 1, control negatiu de la digestió; 2 i 17, MW; 3, 100% E + 0% B; 4, 98% E + 2% B; 5, 97% E + 3% B; 6, 95% E + 5% B; 7, 93% E + 7% B; 8, 90% E + 10% B; 9, 70% E + 30% B; 10, 50% E + 50% B; 11, 30% E + 70% B; 12, 10% E + 90% B; 13, 7% E + 93% B; 14, 5% E + 95% B; 15, 2% E + 98% B; 16, 0% E + 100% B. Les fletxes senyalen el límit inferior de detecció dels diferents bacteris en les diferents mesclades

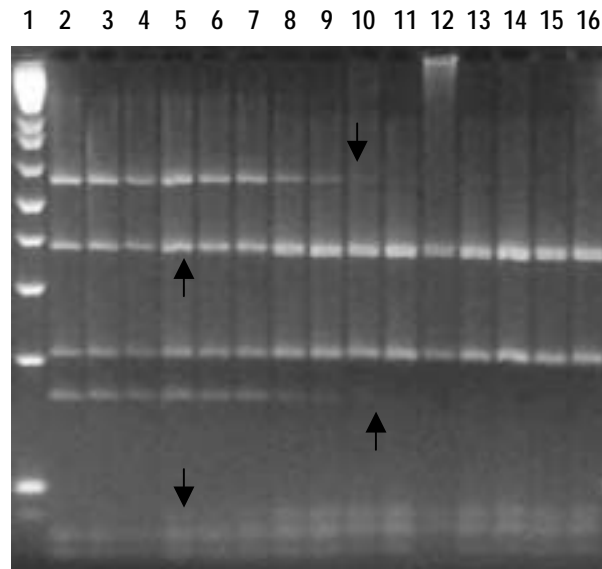


Figura V-4. Patrons experimentals dels 16S ADNr-RFLP de les mescles de *S. typhimurium* (S) i d'*E. coli* K-12 (E) després de digerir amb *AluI*. Marcador de pes molecular 1 kb plus DNA ladder (MW) (Invitrogen). Carrils: 1, MW; 2, 100% S + 0% E; 3, 98% S + 2% E; 4, 97% S + 3% E; 5, 95% S + 5% E; 6, 93% S + 7% E; 7, 90% S + 10% E; 8, 70% S + 30% E; 9, 50% S + 50% E; 10, 30% S + 70% E; 11, 10% S + 90% E; 12, 7% S + 93% E; 13, 5% S + 95% E; 14, 3% S + 97% E; 15, 2% S + 98% E; 16, 0% S + 100% E. Les fletxes senyalen el límit inferior de detecció dels diferents bacteris

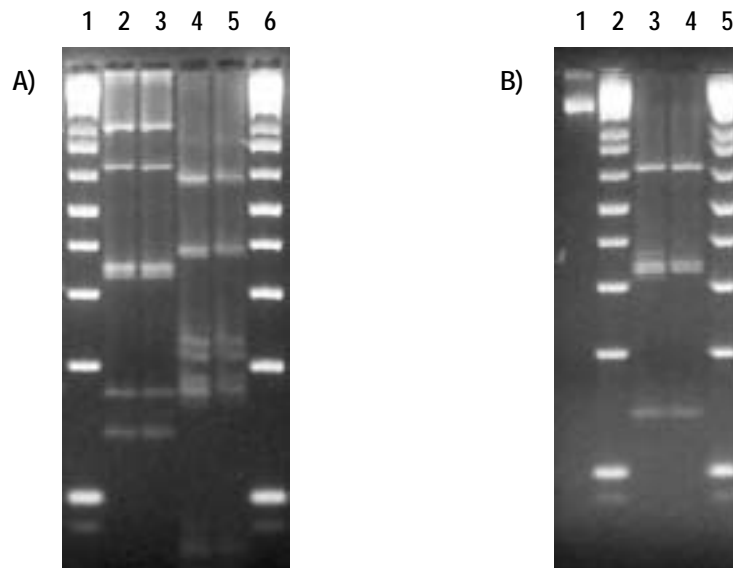


Figura V-5. Patrons experimentals dels 16S ADNr-RFLP de les mescles de *R. sphaeroides* 2.4.1 (R), *E. coli* K-12 (E), *S. typhimurium* LT2 (S) i *B. cereus* ATCC 10876 (B) després de digerir: A) *HinI* (carrils 2 i 3) i *AluI* (carrils 4 i 5) i B) *HinI* (carrils 3 i 4). Marcador de pes molecular 1 kb plus DNA ladder (MW) (Invitrogen). Carrils: A) 1 i 6, MW; 2 i 4, mescles de R+E+S+B al 25% per a cadascuna de les soques; 3 i 5, mescles de R+E+S+B amb el mateix nombre inicial d'operons per a cadascuna de les soques. B) 1, control negatiu; 2 i 5, MW; 3, E; 4, S

Mescla	Límit de detecció (%)			
	<i>E. coli</i> K12	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>S. typhimurium</i> LT2
E/R	2, ++	70, +	-	-
E/B	2, +	-	2, +	-
R/B	-	90, +	2, ++	-
S/E	5, +	-	-	30, +
S/R	-	70, ++	-	2, ++
S/B	-	-	2, ++	2, ++
S/R/B/E (25%)	? ^a , D ^b	ND ^{a,b}	D ^{a,b}	? ^a , D ^b
S/R/B/E (igual nombre d'operons)	? ^a , D ^b	ND ^{a,b}	D ^{a,b}	? ^a , D ^b

Taula V-4. Límit inferior de detecció de *R. sphaeroides* 2.4.1 (R), *E. coli* K-12 (E), *S. typhimurium* LT2 (S), *B. cereus* ATCC 10876 (B) en les diferents mescles. D, detectat; ND, no detectats; ?, no distingible entre fragments d'E i S; ++, producte intens (no disminueix la intensitat del producte de la PCR en disminuir la proporció del bacteri dintre de la mescla) +, disminueix la intensitat del producte de la PCR en disminuir la proporció del bacteri dintre de la mescla; ^a, digestió amb *Hinf*I; ^b, digestió amb *Alu*I

V.4 Discussió

L'aplicació de tècniques moleculars en ecologia microbiana, principalment durant la darrera dècada, ha proporcionat informació no cultivodependent de l'estructura de comunitats bacterianes. L'anàlisi dels RFLP obtinguts a partir d'ADN genòmic amplificat per PCR ha demostrat ser útil per a estudiar dinàmiques poblacionals en diferents ambients naturals, sobretot en canvis poblacionals derivats de canvis en els seus factors biòtics i abiòtics (Martínez-Murcia *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1997). A pesar de no tenir informació sobre la identitat dels bacteris i que no ens proporciona informació quantitativa, l'aplicació d'aquesta tècnica ens permet detectar canvis espaciotemporals (Acinas *et al.*, 1997). No obstant això, com passa en moltes altres tècniques, l'anàlisi dels RFLP pot estar influenciada per molts factors, entre els quals alguns de relacionats amb la mateixa PCR.

Els resultats obtinguts per anàlisi dels RFLP dels 16S ADNr depenen absolutament de l'etapa d'amplificació de la PCR, la qual a la vegada depèn totalment de la quantitat d'ADN diana i de molts altres factors esmentats en la introducció d'aquest capítol. Així doncs, qualsevol variació en algun dels factors esmentats anteriorment provocarà canvis en els RFLP. En aquest estudi s'ha estimat teòricament i pràcticament la influència de dos factors, el nombre de còpies dels gens i l'homologia entre els encebadors i la seva seqüència diana, en els 16S ADNr-RFLP de poblacions bacterianes mixtes, incloent-hi les mescles a diferents proporcions dels bacteris *E. coli* K-12, *S. typhimurium* LT2, *R. sphaeroides* 2.4.1 i *B. cereus* ATCC 10876 descrites en l'annex 6.

Els resultats teòrics ens van permetre estimar les diferències entre les eficiències de la PCR dels 16S ADNr-RFLP dels quatre bacteris inclosos en l'estudi depenent del nombre de còpies dels gens i l'homologia que presentaven amb els encebadors. Els resultats mostraven que l'eficiència de la PCR estava molt influenciada per ambdós factors. Així doncs, s'esperaven eficiències més grans per a *B. cereus* ATCC 10876, resultats similars per a *E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2 i més baixes per a *R. sphaeroides* 2.4.1. Un cop analitzades les mescles experimentalment, els resultats demostraven que *R. sphaeroides* 2.4.1 era detectat com a població minoritària fins i tot quan aquest representava un 98% del total de la mescla, probablement, pel seu baix nombre d'operons (3) i per la baixa homologia dels encebadors per a l'ADN diana. En canvi, el nombre més alt d'operons de *B. cereus* ATCC 10876 feia que es detectés preferentment quan es mesclava amb qualsevol dels altres bacteris inclosos en l'estudi, la qual cosa demostra la importància crítica del nombre d'operons per poder detectar qualsevol bacteri. Finalment, l'anàlisi de la mescla dels dos enterobacteris, *E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2, demostrava que l'eficiència de la PCR era diferent per a ambdós bacteris, tot i que els dos enterobacteris tenen el mateix nombre d'operons i que l'homologia dels encebadors per a l'ADN diana era del 100%. Com s'ha descrit per polimorfisme de conformació de l'ADNcs (SSCP), les amplificacions amb encebadors universals poden generar més d'un producte de PCR quan s'amplifica ADN de soques bacterianes que presenten heterogeneïtats entre els diferents operons (Schmalenberger *et al.*, 2001). Quan aquesta heterogeneïtat afecta als llocs d'unió dels encebadors, la presència de mals aparellaments pot reduir la quantitat de producte de PCR i, per tant, la seva detecció. Com que els encebadors estan dissenyats a partir de les seqüències d'*E. coli*, no es poden descartar lleugeres desviacions quant a quantitat de producte a favor d'*E. coli* K-12 a causa del mal aparellament dels encebadors en alguns dels set operons de *S. typhimurium* LT2. Aquest fet explicaria que en la mescla d'*E. coli* K-12 i *S. typhimurium* LT2 el primer es detecti quan només representa un 5% i el segon quan és del 30%. També, cal destacar que l'ADN genòmic d'algunes espècies bacterianes presenta segments fora de la regió d'unió dels encebadors que afecten els primers

passos de la PCR, com són l'accessibilitat dels encebadors per les seves seqüències diana i l'el·longació (Hansen *et al.*, 1998).

D'altra banda, els resultats obtinguts quan es mesclaven els quatre bacteris, al 25% de cadascun, mostraven el baix poder discriminatori de la tècnica per a diferenciar seqüències de bacteris molt relacionats. Per exemple, *S. typhimurim* LT2 i *E. coli* K-12, dos enterobacteris molt propers filogenèticament, presentaven seqüències molt similars i, per tant, RFLP similars. Per aquesta raó, cal assumir que la diversitat microbiana de bacteris molt relacionats filogenèticament és molt difícil de detectar amb aquest tipus d'anàlisi, sobretot si s'empra un sol enzim de restricció. Aquesta limitació obliga a obtenir els RFLP amb dos o més enzims de restricció per a augmentar el poder discriminatori de bacteris relacionats filogenèticament i, per tant, obtenir fragments específics per a cadascun d'ells (Urakawa *et al.*, 1997, 1998). A més a més, es poden infravalorar els bacteris que presenten un nombre més baix d'operons i un mal aparellament dels encebadors més alt. Un exemple: *R. sphaeroides* 2.4.1, amb un nombre més baix d'operons, només es detectava si constituïa el 70% de les mescles de dos bacteris, la qual cosa explicaria per què no es detectava en les mescles al 25% de cadascuna de les quatre soques bacterianes objecte d'estudi. A més, *R. sphaeroides* 2.4.1 no fou detectat en les mescles on hi havia el mateix nombre inicial d'operons per a cadascun dels quatre bacteris. Aquest fet demostrava la gran importància que té el grau d'homologia entre els encebadors emprats en la PCR i les seves seqüències diana per a obtenir una quantitat suficient de producte amplificat que ens permeti detectar determinades poblacions en mescles bacterianes complexes.

Els resultats obtinguts durant la realització d'aquest estudi han demostrat clarament que l'anàlisi dels RFLP dels gens dels 16S ARNr, prèviament amplificats per PCR i digerits amb enzims de restricció, està altament influenciada pel nombre d'operons d'ADNr i el mal aparellament entre els encebadors i les seves seqüències diana. Així doncs, en els estudis d'ecologia microbiana on s'aplica aquesta tècnica cal tenir ben present que les comunitats microbianes en els ambients naturals estan formades per una gran diversitat de taxons, els quals tenen diferent nombre de gens en el seu genoma i diferent grau de divergència amb els encebadors universals emprats. Aquest fet determina que l'anàlisi dels resultats obtinguts i la seva interpretació siguin molt complexes. Per exemple, si les comunitats microbianes dels ambients naturals estan molt relacionades entre si filogenèticament aquestes presenten homologies més grans en les seves seqüències i, per tant, més baixa probabilitat de mal aparellament amb els encebadors emprats (Ishi i Fukui, 2001). A més, en el treball recent de Schmalenberger i col·laboradors (2001) es demostra que les heterogeneïtats intraespècie dels operons poden contribuir significativament a obtenir perfils genètics complexos, la qual cosa indica que l'ús d'encebadors universals no és mai del 100%

d'homologia en l'àmbit de domini. D'altra banda, s'ha demostrat que els bacteris que primer creixen en un ecosistema són aquells que presenten un nombre més alt d'operons d'ADNr, essent aquesta estratègia ecològica un factor determinant de l'estructura genètica obtinguda (Klappenbach *et al.*, 2000). Així doncs, un nombre alt d'operons d'ADNr permet una eficiència de detecció més gran, i un grau d'homologia més baix entre els encebadors i les seves seqüències diana implica una disminució d'aquesta. Totes aquestes observacions no impliquen una manca d'utilitat dels 16S ADNr-RFLP, però sí que reforcen la idea de la necessitat d'utilitzar altres tècniques combinades amb les moleculars per aconseguir minimitzar els errors o limitacions de les tècniques per separat.

V.5 Conclusions

Les conclusions principals que s'han extret de l'estudi teoricopràctic realitzat són les següents:

1. A partir de fórmules descrites anteriorment, l'estimació teòrica duta a terme ens determina que el factor d'amplificació de la PCR i, per tant, la detecció dels 16S ADNr-RFLP dels quatre bacteris emprats depèn del nombre de còpies dels gens dels 16S ARNr i del grau d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana, localitzades en les regions conservades d'aquests gens. Els factors d'amplificació teòrics més grans s'obtenen per a *B. cereus* ATCC 10876 (dotze operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors), les més petites per a *R. sphaeroides* 2.4.1 (tres operons i un 84,2% d'homologia per a ambdós encebadors), i les intermèdies i similars s'obtenen per a *E. coli* K-12 (set operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors) i *S. typhimurium* LT2 (set operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors).
2. Un cop analitzats experimentalment els 16S ADNr-RFLP de les soques bacterianes emprades durant l'estudi, els resultats obtinguts corroboren les prediccions dutes a terme en l'àmbit teòric.
3. El percentatge mínim de cadascun dels bacteris presents en les mescles indicades o límit inferior de detecció per anàlisi dels RFLP són: mescla d'*E. coli* K-12 i *R. sphaeroides* 2.4.1., 2% i 70%; mescla d'*E. coli* K-12 i *B. cereus* ATCC 10876, 2% per a ambdós; mescla de *R. sphaeroides* 2.4.1. i *B. cereus* ATCC 10876, 90% i 2%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *E. coli* K-12, 30% i 5%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *R. sphaeroides* 2.4.1., 2% i 70%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *B. cereus* ATCC 10876, 2% per a ambdós.

4. Igual que la predicció teòrica, els resultats experimentals demostren que els RFLP dels gens dels 16S ARNr amplificats per PCR estan altament influenciats pel nombre d'operons d'ADNr i pel mal aparellament entre els encebadors i les seves seqüències diana, i ambdós factors contribueixen significativament a l'hora d'obtenir els perfils genètics de les soques bacterianes analitzades. Un nombre alt d'operons d'ADNr permet una eficiència de detecció molt gran, i un grau d'homologia menor entre els encebadors i les seves seqüències diana implica una disminució d'aquesta. Així doncs, els bacteris que presenten un nombre més baix d'operons i un major mal aparellament dels encebadors poden estar infravalorats.

5. Els resultats experimentals obtinguts quan s'analitzen les diferents mescles bacterianes mostren el baix poder discriminatori de la tècnica a l'hora de diferenciar bacteris molt relacionats filogenèticament. Per aquesta raó, cal emprar dos o més enzims de restricció per obtenir RFLP específics i discriminatoris.



VI . Llac Gran d'Estanya

VI.1 Introducció

VI.2 Objectius

VI.3 Resultats

VI.3.1 Caracterització microscòpica

VI.3.2 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics

VI.3.3 Extracció d'ADN

VI.3.4 PCR-RFLP

VI.3.5 PCR-DGGE

VI.3.6 Anàlisi de dades

VI.3.7 FISH

VI.4 Discussió

VI.5 Conclusions

VI.1 Introducció

El llac Gran d'Estanya, situat a la província d'Osca, és un llac monomíctic caracteritzat per presentar un període de barreja vertical durant la primavera-hivern i un període d'estratificació la resta de l'any (Àvila *et al.*, 1984). Durant el període d'estratificació, les variacions de temperatura existents entre la part superficial del llac i la part més profunda fan que es puguin distingir dues zones al llarg de tot el perfil, l'epilímnion i l'hipolímnion, les quals estan separades per una termoclina (Gaju, 1987; Mir, 1997). Igual que altres llacs càrstics estudiats a la regió mediterrània de la península Ibèrica, el llac Gran d'Estanya es caracteritza per tenir masses molt denses de poblacions de bacteris fototròfics anoxigènics del sofre en el període d'estratificació de les quals s'ha descrit la seva ecologia i fisiologia (Esteve *et al.*, 1983; Gaju, 1987; García-Cantizano, 1992; Guerrero *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1983).

En el període d'estratificació, el llac Gran d'Estanya presenta habitualment les estratificacions tèrmica i química a la mateixa fondària, entre 10 i 13 m (Gaju, 1987; Mir, 1997). La temperatura i la conductivitat mitjanes de l'epilímnion varien entre 14-17,5 °C i 1,7-2 mS cm⁻¹, respectivament, mentre que a l'hipolímnion la temperatura decreix fins a 7,5-8,5 °C i la conductivitat fins a 1,45-1,55 mS cm⁻¹. La concentració d'oxigen disminueix en fondària i es troba normalment entre 5-11 mg l⁻¹ a l'epilímnion i inferior a 5 mg l⁻¹ a l'hipolímnion (Gaju, 1987). Normalment anòxic, a l'hipolímnion es detecta la màxima concentració de sulfur d'hidrogen, la qual pot arribar a concentracions de 0,3-0,6 mM. El pH, en canvi, es manté entre 7-8,5 en tota la columna d'aigua (Mir, 1997).

En aquest període, les màximes concentracions de Chl *a* i de Bchl *a* es detecten entre 10 i 13 m, on la intensitat de llum és d'1-10% respecte del total que arriba a la superfície del llac. No obstant això, la concentració de Bchl *a*, derivada majoritàriament de la presència en massa de les poblacions de bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre, és de 20-30 vegades superior a la de Chl *a* (Mir, 1997). L'alt grau de desenvolupament d'aquestes poblacions és determinat per les condicions de creixement òptimes que s'hi donen en aquest període, la qual cosa afavoreix el creixement ràpid d'aquest tipus de bacteris, concentració dels quals és d'aproximadament 10⁵-10⁶ cèl·lules per mil·lilitre (Gaju *et al.*, 1992; García-Cantizano, 1992). El nombre de bacteris sulfatoreductors és molt petit en tota la columna d'aigua i augmenta lleugerament en fondària a mesura que ens anem aproximant al sediment (Mir, 1997).

Durant el període de barreja, el llac Gran d'Estanya presenta homogeneïtat al llarg de tot el perfil vertical. Els valors de temperatura, conductivitat i pH són de 5-6 °C, 1,5 mS cm⁻¹ i 7-7,5, respectivament. La concentració d'oxigen en fondària sol ser inferior a 10 mg l⁻¹ just abans de la barreja i superior a 10 mg l⁻¹ la resta del període. L'absència de sulfur d'hidrogen, en canvi, no afavoreix el creixement de les poblacions fototròfiques anoxigèniques i, en conseqüència, la detecció de Bchl *a* (Gaju, 1987).

Des que Àvila i col·laboradors (1984) dugueren a terme la descripció batimètrica del llac Gran d'Estanya, en aquest sistema estratificat s'han realitzat una sèrie de treballs que han estat dirigits principalment a l'estudi de les poblacions bacterianes fototròfiques (Gaju, 1987; García-Cantizano, 1992; Guerrero *et al.*, 1987; Mir, 1997). Entre aquests, cal destacar els estudis enfocats a l'anàlisi de les relacions interespecífiques com la competència (Guerrero *et al.*, 1987) i, sobretot, la predació (Esteve *et al.*, 1983; Gaju *et al.* 1992; Guerrero *et al.*, 1986). L'ús de la microscòpia d'epifluorescència i electrònica de rastreig ha servit per a demostrar que els bacteris fototròfics anoxigènics del sofre, i en concret del gènere *Chromatium*, són afectats per l'acció d'organismes depredadors, majoritàriament localitzats sota la fondària on es desenvolupen aquests bacteris fototròfics. A més, s'ha vist que els percentatges de predació i el nombre d'epibionts per cèl·lula varien en funció de l'època de l'any estudiada: és menor a l'inici del període d'estratificació i molt més elevat en l'estratificació tardana i just abans d'iniciar-se el període de barreja (Gaju, 1987).

Realitzats per García-Cantizano l'any 1992, els estudis de producció primària al llac Gran d'Estanya han demostrat, entre d'altres coses, que la síntesi de matèria orgànica per fotosíntesi oxigènica és més important per sobre de la quimioclina. En canvi, i superant la de la part oxigènica del llac, la zona més activa quant a la incorporació de carboni inorgànic per part dels microorganismes és la interfase oxigen-sulfur d'hidrogen. En aquesta zona, els màxims de fixació per fotosíntesi oxigènica (11%), fotosíntesi anoxigènica (42%) i en la foscor (21%) coincideixen en la mateixa fondària, i és en aquesta fondària on es desenvolupen els bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre.

L'anàlisi de components principals de les variables fisicoquímiques i biològiques obtingudes al llac Gran d'Estanya ha demostrat que els principals factors estructuradors de la comunitat, en funció del grau d'estabilitat de la columna (lligat a la morfologia i a l'entorn del llac) i del grau d'anòxia (que en part depèn de l'anterior), són l'estacionalitat i la fondària (Àvila *et al.* 1984; Mir, 1997). Com més estable i protegit sigui un llac, més probabilitat hi haurà que la fondària, en lloc de ser-ho la variació estacional, sigui el principal factor estructurador (Gasol, 1988). Aquest fet determina que la distribució en fondària de les diferents

variables en el període d'estratificació faci que les submostres epilímiques es separin de les hipolímiques (Mir, 1997).

VI.2 Objectius

Al llarg dels anys, l'aplicació de tècniques de microbiologia clàssiques ha permès estudiar en el llac Gran d'Estanya l'evolució espaciotemporal i la diversitat de les poblacions microbianes, el grau d'interrelació entre les diferents poblacions i la funció que hi desenvolupen (Esteve *et al.*, 1983; Gaju *et al.*, 1992; García-Cantizano, 1992; Guerrero *et al.*, 1986; Mir, 1997). A diferència de treballs anteriors i per primera vegada en aquest ecosistema, en la realització d'aquest estudi s'han aplicat de forma combinada tècniques de biologia molecular basades en l'anàlisi dels àcids nucleics (ADN i ARN) de la comunitat i tècniques convencionals que ens han de permetre ampliar, complementar i aprofundir els coneixements adquirits en treballs anteriors, i complir així els diferents objectius marcats:

1. Determinar els paràmetres biòtics i abiòtics que s'estableixen en la columna d'aigua del llac Gran d'Estanya durant els períodes de barreja i estratificació i estudiar les poblacions microbianes dominants per microscòpia.
2. Detectar variacions espaciotemporals, qualitativament i quantitativament, de les poblacions microbianes dominants presents al llac Gran d'Estanya en ambdós períodes mitjançant l'aplicació de tres tècniques moleculars (RFLP, DGGE i FISH).

VI.3 Resultats

VI.3.1 Caracterització microscòpica

En ambdós períodes, estratificació (Su) (20/09/01) i barreja (W) (19/02/02), les mostres extretes i fixades al llac Gran d'Estanya es van caracteritzar microscòpicament, tal com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (II.3.5.2.1). Els grups microbians dominants en fondària observats en aquest ecosistema estratificat planctònic i el seu grau d'abundància relativa es detallen en la figura VI-1 i en les taules VI-1 i VI-2.

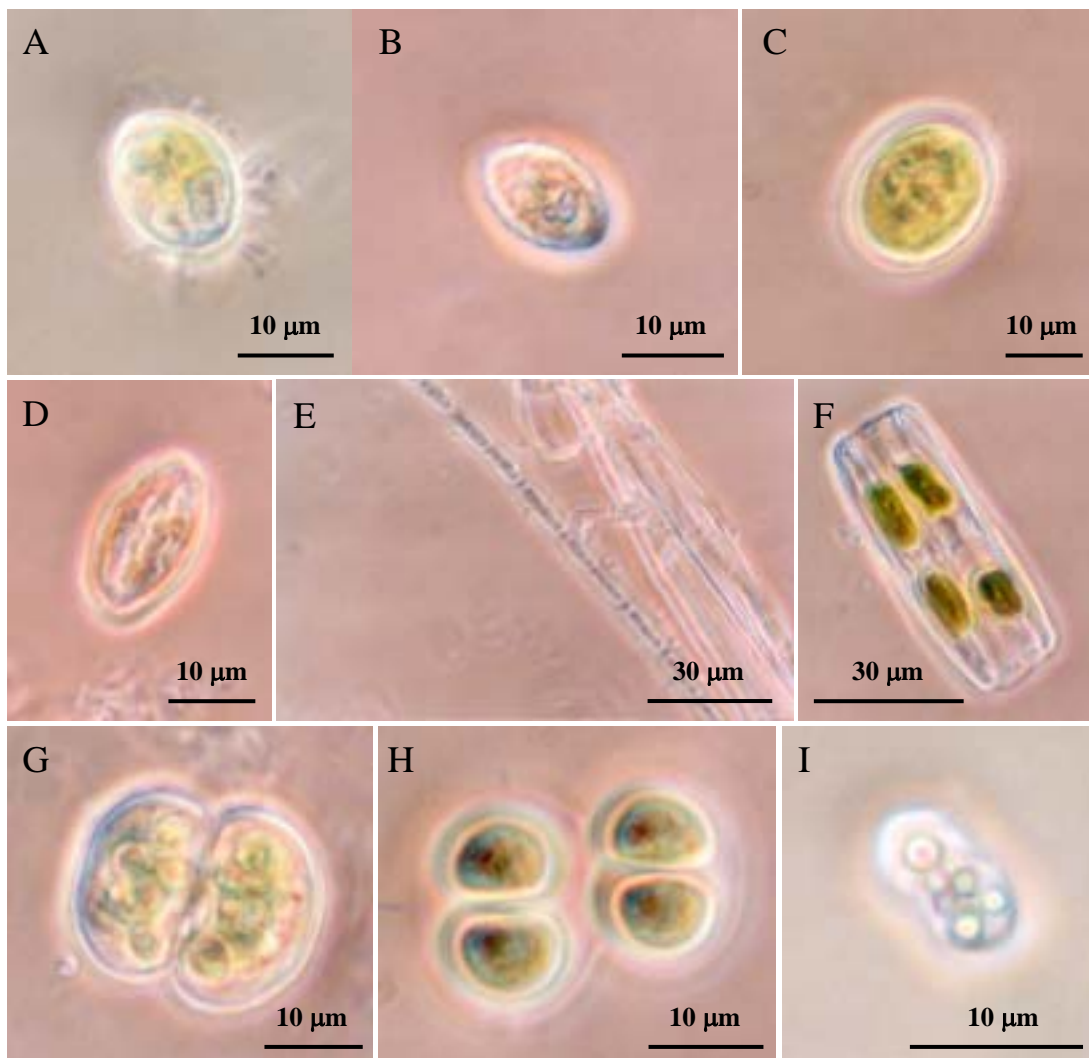


Figura VI-1. Imatges de microscòpia òptica de diferents grups microbians dominants que es troben al llac Gran d'Estanya

Taula VI-1. Descripció fenotípica i distribució en fondària dels diferents grups microbians caracteritzats per microscòpia al llac Gran d'Estanya en el període d'estratificació. (+) observat; (++) present a baixa concentració; (+++) abundant; (++++) molt abundant; (-) absent

Grup	Morfologia	Dimensions (μm)	Distribució en fondària						
			0 m	5 m	7 m	8 m	9 m	10 m	12 m
A	Ovoide	11 X 16	++++	++	+	+	-	-	-
B	Ovoide	9 X 15	++	-	-	-	-	-	-
C	Ovoide	15 X 20	++++	++	+	+	+	+	-
D	Ovoide	11 X 20	+	+	+	++	-	-	-
E	Filament	3,5 X 14	+	+	+	+	+	+	+
F (<i>Navicula-like</i>)	Rectangle	23 X 52	-	-	-	+	-	-	-
G	Lobular	12 X 19	++	++	+	+	-	-	-
H	Lobular	7 X 10	+	+	+	++	+	+	-
I (<i>PSB-like</i> ^a)	Bacil·lar	2,5 X 5	-	-	-	++	++++	++++	++
J (Altres procariotes ^b)	Bacil·lar	1 X 1-4	+	+	+	++++	++++	++++	++++
K (Altres procariotes ^b)	Bacil·lar	1 X 4-8	-	-	-	+	++	++	++++
L (Altres procariotes ^b)	Coccoide	1 X 1	+	+	+	+++	+++	+++	++++

^aBacteris vermells del sofre (*Purple Sulfur Bacteria* o *PSB*); ^bProcariotes no distingibles morfològicament

Taula VI-2. Descripció fenotípica i distribució en fondària dels diferents grups microbians caracteritzats per microscòpia al llac Gran d'Estanya en el període de barreja. (+) observat; (++) present a baixa concentració; (+++) abundant; (++++) molt abundant; (-) absent

Grup	Morfologia	Dimensions (μm)	Distribució en fondària					
			2 m	7 m	10 m	14 m	16 m	16,5 m
C	Ovoide	15 X 20	++	++	++	+	+	+
H	Lobular	7 X 10	++	++	++	+	+	+
I (<i>PSB-like</i> ^a)	Bacil·lar	2,5 X 5	-	-	-	+	+	+
J (Altres procariotes ^b)	Bacil·lar	1 X 1-4	++	++	++	++	++	+++
L (Altres procariotes ^b)	Coccoide	1 X 1	+	+	+	+	++	++
M (Altres procariotes ^b)	Coccoide	2 X 2	+	+	+	++	+	+

^aBacteris vermells del sofre (*Purple Sulfur Bacteria* o *PSB*); ^bProcariotes no distingibles morfològicament

La majoria de grups microbians dominants van ser diferenciats entre si en funció de la seva morfologia i coloració. Els agrupaments obtinguts van ser els següents: grup A (organismes ovoides de color verd, dimensions d'11 X 16 μm), grup B (organismes ovoides de color marró, dimensions de 9 X 15 μm), grup C (organismes ovoides de color verd, dimensions de 15 X 20 μm), grup D (organismes ovoides de color marró-roig, dimensions d'11 X 20 μm), grup E (organismes filamentosos incolor, septes d'una mida de 3,5 X 14 μm), grup F (diatomea pennada translúcida, dimensions de 23 X 52 μm , *Navicula-like*), grup G (organismes lobulars de color verd, dimensions de 12 X 19 μm), grup H (organismes lobulars de color verd, dimensions de 7 X 10 μm) i grup I (bacteris bacil·lars de color rosa i amb glòbuls de sofre intracel·lulars, dimensions de 2,5 X 5 μm , *PSB-like*). La resta, en canvi, es van diferenciar en funció de la seva forma (bacil·lar o coccoide) i dimensió (grups J, K, L i M).

En la taula VI-1 podem observar que la distribució dels diferents grups dominants durant el període d'estratificació seguia diferents pautes. Alguns grups es trobaven distribuïts uniformement al llarg de la columna d'aigua (grups C, E, H, J i L) i d'altres eren específics de fondària (grups B i F). La resta dels grups es trobaven localitzats en diferents fondàries on la presència o bé de llum i oxigen (grups A, D i G) o bé del pic de Bchl *a* i de baixes o nul·les quantitats de llum i d'oxigen (grups I i K) foren característiques, tal com es detalla en el punt següent (VI.3.2).

Analitzant les observacions realitzades també es va comprovar que molts dels grups caracteritzats durant el període d'estratificació (grups A, B, D, E, F, G i K) no eren presents en la columna d'aigua durant el període de barreja, i els que s'hi trobaven es distribuïen en totes les fondàries del llac (grups C, H i J) (taula VI-2). Com a excepció, les *PSB-like* (grup I) només es van trobar en les capes més fondes i a molt baixa concentració.

VI.3.2 Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics

La distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics (concentració d'oxigen dissolt, concentració de sulfur d'hidrogen, temperatura, llum, conductivitat, concentració de pigments i proteïnes) durant el període d'estratificació i de barreja al llac Gran d'Estanya es mostra en la figura VI-2.

En el període de barreja, els valors de temperatura i conductivitat van ser de 4,5-7,1 °C i 1.200-1.525 $\mu\text{Mhos cm}^{-1}$, respectivament. Els valors de pH variaven entre 7,6 i 7,25. Mentre que la concentració d'oxigen fou decreixent en fondària des de valors d'11,3 a 0 m fins a 4,9 mg O₂ l⁻¹ a 16 m, el sulfur

d'hidrogen fou detectat a concentracions de 0,27 mM prop del sediment del fons del llac, a 16,5 m. Les concentracions de pigments i proteïnes detectades al llarg de la columna d'aigua van ser baixes i la seva distribució va ser homogènia. En canvi, cal ressaltar que aquests valors van ser més alts a 16,5 m.

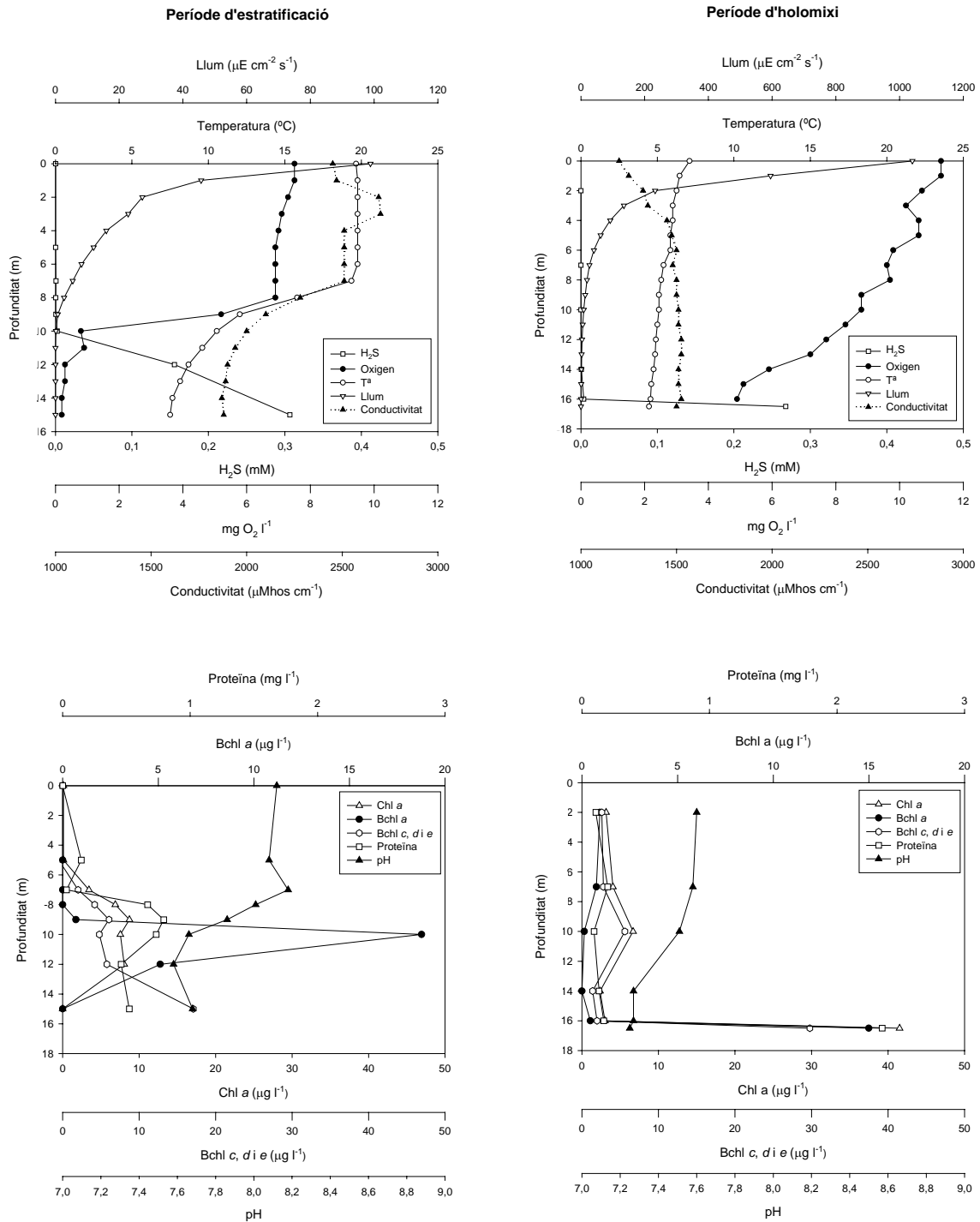


Figura VI-2. Distribució vertical dels paràmetres fisicoquímics al llac Gran d'Estanya en els períodes d'estratificació i barreja (holomixi)

En el període d'estratificació l'hipolímnion esdevé anòxic a causa de la presència de concentracions de sulfur d'hidrogen de fins a 0,3-0,4 mM. La termoclina, on la temperatura disminuïa en fondària 2,54 °C per metre, fou localitzada entre 7-11 m. Els valors de temperatura, conductivitat i concentració d'oxigen a l'epilímnion van ser de 19,35-19,65 °C, 2.450-2.700 $\mu\text{Mhos cm}^{-1}$ i 6,9-7,6 mg O₂ l⁻¹, respectivament, mentre que a l'hipolímnion van ser de 7,5-9,6 °C, 1.870-1.940 $\mu\text{Mhos cm}^{-1}$ i 0,2-0,9 mg O₂ l⁻¹. Els valors de pH variaven entre 7,58 i 8,18. El màxim de Chl *a* detectat va ser de 8,72 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 9 m, el de Bchl *a* 18,77 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 10 m i el de Bchl *c, d* i *e* 17,08 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 15 m. El valor màxim de proteïnes va ser de 0,8 mg l⁻¹ a 9 m. El sulfur d'hidrogen i l'oxigen presentaven perfils inversos i el mínim de concentració es trobava entre 10-11 m de fondària.

VI.3.3 Extracció d'ADN

L'ADN genòmic de les soques tipus emprades com a patrons i de les mostres del llac es va detectar en forma d'una banda de 23 kb (figura VI-3). En el període d'estratificació, els extractes crus obtinguts a partir de les fondàries més properes al sediment presentaven l'ADN genòmic més brut i fragmentat. En aquests casos, i per a evitar la presència de possibles inhibidors de la PCR, els extractes crus es van diluir fins a 10⁻².

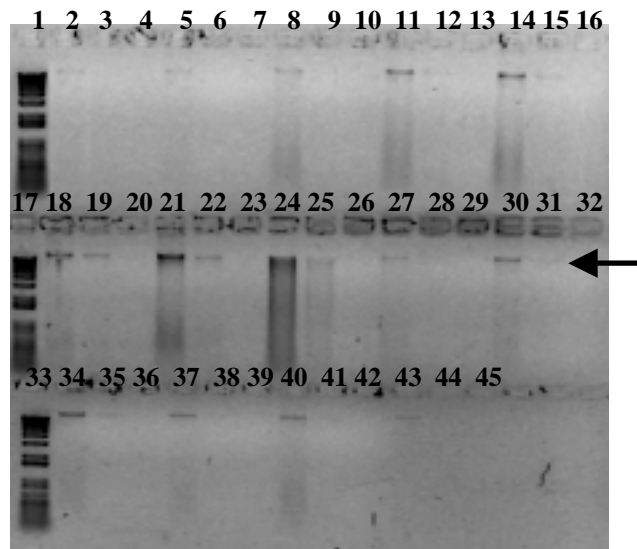


Figura VI-3. Extraccions d'ADN total del llac Gran d'Estanya en els períodes d'estratificació (Su) i barreja (W), visualitzades en un gel d'electroforesi (negatiu). Carrils: 1, 17 i 33 marcadors de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2-4 (2, sense diluir; 3, dilució 1/10; 4, dilució 1/100), Su0m; 5-7, Su5m; 8-10, Su7m; 11-13, Su8m; 14-16, Su9m; 18-20, Su10m; 21-23, Su12m; 24-26, Su15m; 27-29, W2m; 30-32, W7m; 34-36, W10m; 37-39, W14m; 40-42, W16m; 43-45, W16,5m. La fletxa senyala les bandes d'ADN total obtingudes d'aproximadament 23 kb

VI.3.4 PCR-RFLP

L'amplificació dels gens procariòtics dels 16S ARNr per PCR ens va permetre detectar els dos dominis, *Bacteria* i *Archaea*, en els dos períodes assajats. No obstant això, mentre que el domini *Bacteria* es va detectar en totes les fondàries, el domini *Archaea* estava present majoritàriament en la part més fonda del llac on la concentració de sulfur d'hidrogen fou més alta (figura VI-4). Les submostres on es va detectar aquest darrer domini eren: Su5m, Su7m, Su10m, Su12m, W2m, W7m, W14m, W16m i W16,5m. Igual que succeïa en d'altres sistemes estratificats estudiats en aquest treball, cal remarcar que la quantitat de producte obtingut per PCR del domini *Archaea* fou petita per a ser posteriorment visualitzats i analitzats els RFLP d'aquest domini.

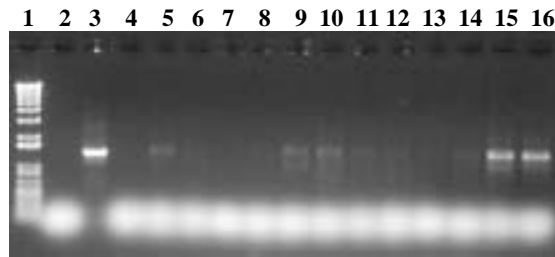


Figura VI-4. Amplificació dels gens dels 16S ARNr del domini *Archaea* en les diferents fondàries del llac Gran d'Estanya en els períodes d'estratificació (Su) i barreja (W). Carrils: 1, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, control negatiu; 3, control positiu d'*Archaeas* (*H. mediterranei* ATCC 33500); 4, Su0m; 5, Su5m; 6, Su7m; 7, Su8m; 8, Su9m; 9, Su10m; 10, Su12m; 11, W2m; 12, W7m; 13, W10m; 14, W14m; 15, W16m; 16, W16,5m

Una vegada amplificats els gens bacterians dels 16S ARNr presents al llac Gran d'Estanya, els productes de la PCR van ser digerits amb els enzims tetramèrics d'alta freqüència de tall *RsaI*, *HinfI* i *AluI*. El nombre de fragments de restricció obtinguts amb els tres enzims i els patrons dels 16S ADN-RFLP es mostra en la taula VI-3 i les figures VI-5 i VI-6. El nombre total de fragments de restricció més elevat fou trobat en la part superficial (Su0-7m) del període d'estratificació, mentre que els valors obtinguts en la resta de fondàries en aquest període (Su8-12m) i de totes les submostres a l'hivern (W2-16m) foren similars (taula VI-3). L'anàlisi dels patrons de restricció va posar de manifest en el període d'estratificació una diferenciació clara entre les submostres de la part superficial del llac (Su0-7m), on la temperatura era alta i constant en fondària, i la part més fonda (Su8-12m), on la temperatura fou més baixa i anava disminuint en fondària (figura VI-5). En el mateix període, i depenent de l'enzim emprat, es van poder detectar, a més, petites diferències entre els patrons de restricció obtinguts en les diferents fondàries de la part superficial

del llac (Su0-7m en digerir amb *RsaI*) i entre els obtinguts en la part més fonda (Su12m i Su10-12m en digerir amb *RsaI* i *HinfI*, respectivament). En canvi, l'anàlisi dels patrons de les diferents submostres del període de barreja mostrava diferències molt petites en tota la columna d'aigua (W2-16m) i diferències més marcades en la submostra adjacent al sediment del llac (W16,5m). Tot i les diferències detectades entre els patrons de restricció obtinguts, cal destacar la presència de fragments específics de fondària i també de comuns a totes les fondàries i dies de mostreig (figura VI-5). L'anàlisi comparativa dels patrons dels 16S ADNr-RFLP obtinguts en els dos períodes amb els enzims *AclI* i *RsaI* ens mostrava un fet curiós, i no observat tan clarament amb l'enzim *HinfI*, com era que els patrons de la columna d'aigua en el període de barreja eren molt semblants als obtinguts en la part més fonda en el període d'estratificació (figura VI-5). Per a comprovar que la similitud observada entre aquests patrons de restricció no era derivada de la tècnica emprada, es va aplicar una altra tècnica de caracterització genètica, la DGGE.

Taula VI-3. Nombre de fragments dels 16S ADNr bacterians per anàlisi de restricció amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AclI* al llac Gran d'Estanya

Període	Codi	Fondària	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>AclI</i>	Total
estratificació	Su	Su0m	11	9	13	33
		Su5m	10	9	13	32
		Su7m	8	9	13	30
		Su8m	10	7	6	23
		Su9m	10	7	6	23
		Su10m	10	9	6	25
		Su12m	11	9	6	26
barreja	W	W2m	10	8	9	27
		W7m	10	9	8	27
		W10m	10	9	8	27
		W14m	9	8	8	25
		W16m	9	9	8	26
		W16,5m	12	6	6	24

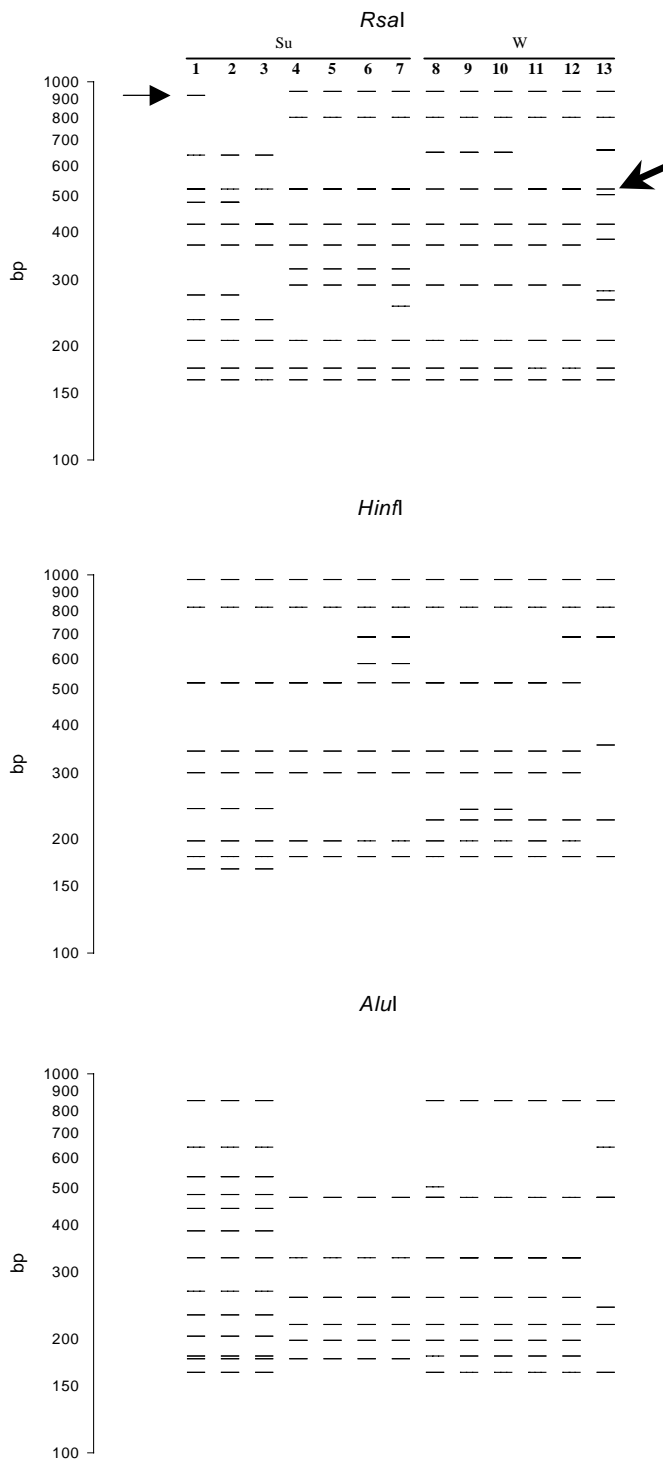


Figura VI-5. Distribució esquemàtica dels patrons dels 16S ADN-RFLP bacterians dels períodes d'estratificació (Su) i barreja (W) després de fer digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AluI* al llac Gran d'Estanya (carrils: 1, Su0m; 2, Su5m; 3, Su7m; 4, Su8m; 5, Su9m; 6, Su10m; 7, Su12m; 8, W2m; 9, W7m; 10, W10m; 11, W14m; 12, W16m; 13, W16,5m). Hi ha alguns fragments comuns a totes les profunditats d'una mateixa mostra (fletxa gruixuda) i d'altres d'específics (fletxa prima)

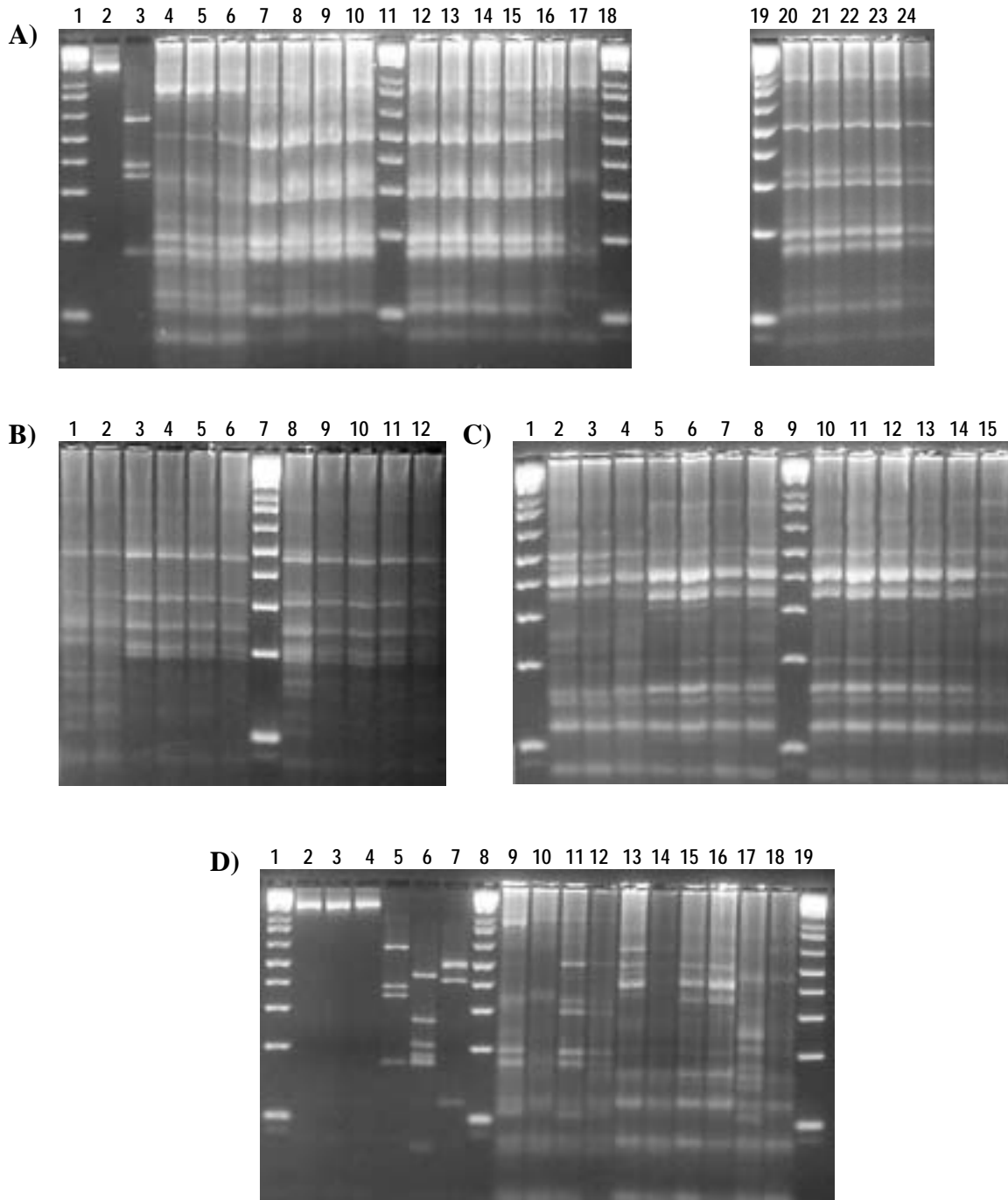


Figura VI-6. Patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians dels períodes d'estratificació (Su) i de barreja (W) després de realitzar digestions separades amb els enzims *RsaI*, *HinfI* i *AluI* al llac Gran d'Estanya. A) Digestions amb *HinfI*. Carrils: 1, 11, 18-19, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus (Invitrogen); 2, control negatiu de restricció; 3, *B. subtilis* ATCC 6633; 4, Su0m; 5, Su5m; 6, Su7m; 7, Su8m; 8, Su9m; 9, Su10m; 10, Su12m; 12 i 20, W2m; 13 i 21, W7m; 14 i 22, W10m; 15 i 23, W14m; 16 i 24, W16m; 17, W16,5m. B) Digestions amb *AluI*. Carrils: 1, Su5m; 2, Su7m; 3, Su8m; 4, Su9m; 5, Su10m; 6, Su12m; 7, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus; 8, W2m; 9, W7m; 10, W10m; 11, W14m; 12, W16m. C) Digestions amb *RsaI*. Carrils: 1 i 9, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus; 2, Su0m; 3, Su5m; 4, Su7m; 5, Su8m; 6, Su9m; 7, Su10m; 8, Su12m; 10, W2m; 11, W7m; 12, W10m; 13, W14m; 14, W16m; 15, W16,5m. D) Digestions amb *HinfI* (2, control negatiu de digestió; 5, *B. subtilis* ATCC 6633; 9, Su0m; 10, W16,5m; 11, Su10m; 12, W10m), *AluI* (3, control negatiu de digestió; 6, *B. subtilis* ATCC 6633; 13, Su0m; 14, W16,5m; 15, Su10m; 16, W10m) i *RsaI* (4, control negatiu de digestió; 7, *B. subtilis* ATCC 6633; 17, Su0m; 18, W16,5m). Carrils: 1, 8 i 19, marcador de pes molecular d'ADN 1 kb plus

VI.3.5 PCR-DGGE

Un cop amplificades per PCR amb els encebadors universals del domini *Bacteria* descrits en l'apartat II.3.6.3, les seqüències parcials dels 16S ADNr bacterians presents al llac Gran d'Estanya es van separar per DGGE (figura VI-7). Igual que succeïa per PCR-RFLP (VI.3.4), els patrons de DGGE obtinguts en la columna d'aigua durant el període de barreja mostraven una gran similitud amb els de la part més fonda del llac en el període d'estratificació (figura VI-7). Llevat de la submostra W16,5m, algunes de les bandes dominants (bandes 2, 3 i 14) observades en els patrons de DGGE eren presents en totes les fondàries i períodes analitzats. En aquests patrons, a més, van ser visualitzades bandes específiques de fondària (bandes 10, 15, 16, 17 i 21), bandes específiques del període de l'any estudiat (bandes 4, 8, 12, 13, 19 i 20) i bandes que es trobaven en ambdós períodes però no en totes les fondàries (bandes 1, 7 i 9). L'aplicació d'aquesta tècnica ens va permetre realitzar, a més a més, un estudi preliminar de la diversitat bacteriana mitjançant l'escissió i la seqüenciació de les bandes dominants en cadascuna de les parts del llac i dies de mostreig (figura VI-7).

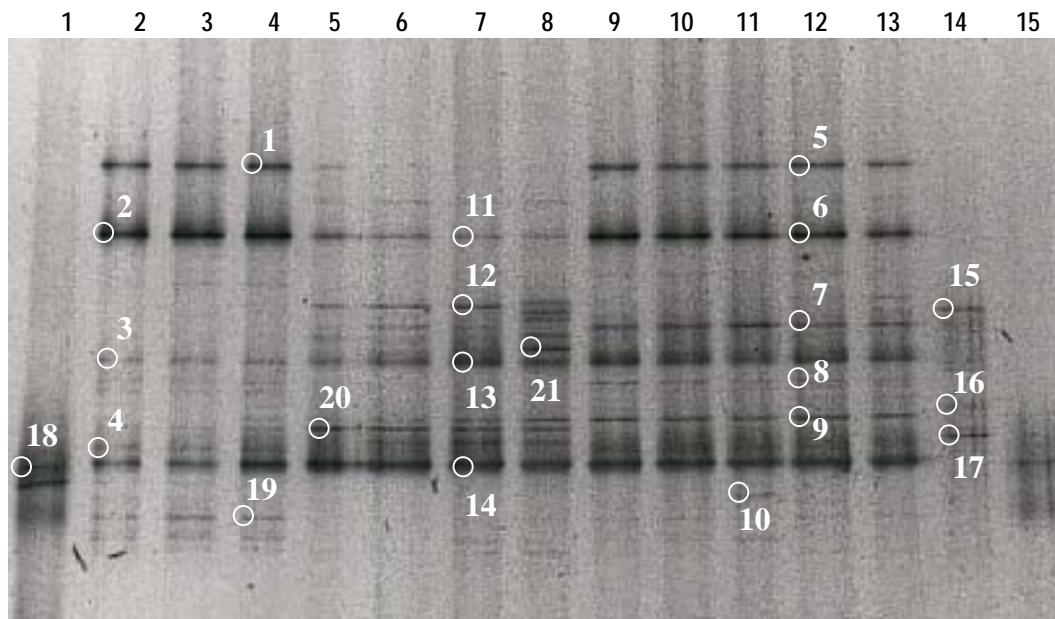


Figura VI-7. Patrons dels 16S ADNr bacterians dels períodes d'estratificació (Su) i barreja (W) obtinguts per PCR amb encebadors universals del domini *Bacteria* al llac Gran d'Estanya (negatiu). Carrils: 1, control positiu de bacteris (*E. coli* K-12 + *B. subtilis* ATCC 3366); 2, S0m; 3, S5m; 4, S7m; 5, S8m; 6, S9m; 7, S10m; 8, S12m; 9, W2m; 10, W7m; 11, W10m; 12, W14m; 13, W16m; 14, W16,5m; 15, control positiu de bacteris (*E. coli* GSC 5073). (o) bandes extretes del gel i reamplificades

Del total de 21 seqüències recuperades i seqüenciades a partir de les bandes escindides del gel de DGGE (figura VI-7), cinc es van descartar a causa de la seva naturalesa quimèrica i, per tant, ambigua (bandes 8, 11, 15, 16 i 20). Les 16 seqüències restants que sí es van poder analitzar es trobaven afiliades dintre de quatre dels filums del domini *Bacteria*: *Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), *Proteobacteria* (classes α i β) i *Chlorobi*. L'afiliació filogenètica de les seqüències obtingudes i el grau de similitud entre aquestes i d'altres seqüències de la base de dades del NCBI es mostren a la taula VI-4. Els valors de les similituds de les seqüències van ser en tots els casos superiors, com a mínim, al 93%. Entre les seqüències obtingudes a partir de bandes situades en la mateixa posició dintre del gel, es van detectar seqüències (les corresponents a les bandes 3 i 13) que presentaven una afiliació filogenètica diferent tot i estar presents en fondàries i dies de mostreig diferents, mentre que n'hi va haver dues (les corresponents a les bandes 1 i 5) que presentaven una afiliació filogenètica idèntica. Finalment, hi va haver seqüències (les corresponents a les bandes 3, 4, 9, 10 i 14) que, tot i haver estat obtingudes a partir de bandes situades en diferents posicions del gel, presentaven la mateixa afiliació filogenètica, les quals estan relacionades amb un grau de similitud d'entre 95-100% amb els cianobacteris.

Taula VI-4. Identificació dels 16S ADNr bacterians en mostres del llac Gran d'Estanya amplificades amb encebadors específics del domini *Bacteria* i separades per DGGE

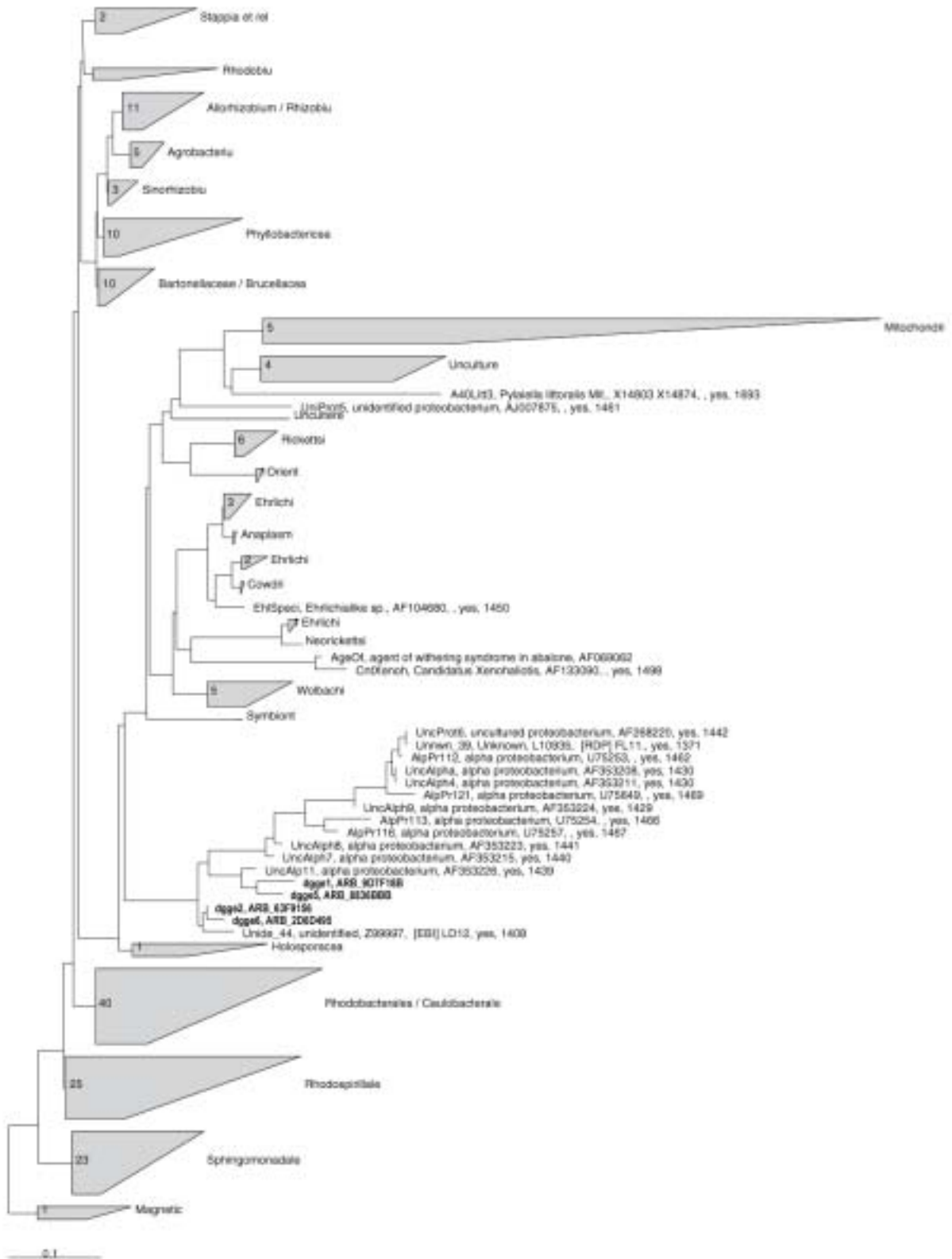
Banda	Organismes més propers			Grup filogenètic
	Similitud	Espècie	Número d'accés	
1 ^a	99,8	Bacteri no cultivable clon Artic96B-22	AF353229.1	α - <i>Proteobacteria</i>
2 ^a	99,8	Bacteri no cultivable	AF353226.1	α - <i>Proteobacteria</i>
3 ^a	95	<i>Synechococcus</i> sp. LBP1	AF330247.1	<i>Cyanobacteria</i>
4 ^a	96,6	<i>Synechococcus</i> sp. LBP1	AF330247.1	<i>Cyanobacteria</i>
5 ^b	93,9	Bacteri no cultivable clon Artic96B-22	AF353229.1	α - <i>Proteobacteria</i>
6 ^b	99,4	Bacteri no cultivable clon HTH6	AF418965.1	α - <i>Proteobacteria</i>
7 ^b , 13 ^a	99	<i>Cytophaga</i> no identificat	UCAJ7874	CFB
9 ^b , 10 ^b , 14 ^a	100	<i>Synechococcus</i> sp. LBP1	AF330247.1	<i>Cyanobacteria</i>
12 ^a	95	Bacteri no cultivable	UBA421121	CFB
17 ^b	95	<i>Nitrosospira</i> sp. no cultivable MERTZ_2CM_3	AF424054.1	β - <i>Proteobacteria</i>
19 ^a	97	Bacteri no cultivable clon BUG-161	UBA344200	<i>Bacteria</i> no classificat
21 ^a	93	Bacteri verd del sofre no cultivable	GSU458200	<i>Chlorobi</i>

^aSetembre, ^bFebrer, CFB, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*

Mitjançant l'estudi dels patrons de DGGE, i tenint en compte que només es va analitzar una part de les bandes dominants visualitzades i que d'aquestes algunes es van descartar per la seva ambigüitat, podem afirmar que la composició bacteriana variava espacialment i temporalment. En la part superficial (Su0-7m) del període d'estratificació es van detectar seqüències relacionades amb *α-Proteobacteria* (bandes 1 i 2), *Bacteria* no classificat (banda 19) i *Cyanobacteria* (bandes 3 i 4) (figura VI-7). En la resta de submostres d'aquest període (Su8-12m), en canvi, les seqüències estaven majoritàriament relacionades amb *Cyanobacteria* (banda 14), *Cytophaga* (bandes 12 i 13) i *Chlorobi* (banda 21). En el període de barreja, les seqüències estaven relacionades amb les *α-Proteobacteria* (bandes 5 i 6), *Cytophaga* (banda 7) i *Cyanobacteria* (bandes 9 i 10). En aquest període, els patrons de DGGE (figura VI-7) obtinguts en tota la columna d'aigua (W2-16m) eren molt semblants. No obstant això, petites diferències en fondària van ser observades i relacionades amb els cianobacteris (banda 10 a W10m). En la fondària adjacent al sediment, W16,5m, el menor nombre de bandes trobades en el patró ens indicava una davallada de la diversitat bacteriana en aquest punt de la columna d'aigua, i l'única seqüència determinada es relacionava amb *β-Proteobacteria* (banda 17). Qualitativament, la composició bacteriana entre ambdós períodes estudiats variava quant a la detectabilitat o no de les *β-Proteobacteria* i *Chlorobi*. Mentre que la *β-Proteobacteria* era detectada en el període de barreja, *Chlorobi* ho era en el període d'estratificació.

Les relacions filogenètiques de les seqüències parcials dels 16S ADNr obtingudes per DGGE es van obtenir per comparació amb les seqüències dipositades en la base de dades del NCBI mitjançant el programa d'alineament BLAST. Posteriorment, les seqüències parcials dels 16S ADNr es van afegir a una base de dades que té unes 25.000 seqüències homòlogues de l'estructura primària del 16S ARNr, emprant la funció d'alineament del programa ARB. Les seqüències alineades van ser incorporades a un arbre base mitjançant el mètode Parsimonia del programa ARB, utilitzant com a base de dades unes 1.800 seqüències. Els arbres filogenètics dels grups més representatius es mostren en les figures VI-8, VI-9, VI-10 i VI-11.

Figura VI-8. (pàgina següent) Arbre filogenètic d'*α-Proteobacteria* obtingut a partir de les seqüències parcials dels gens dels 16S ARNr amplificats amb encebadors del domini *Bacteria*. Escala = 0,1 mutacions per nucleòtid



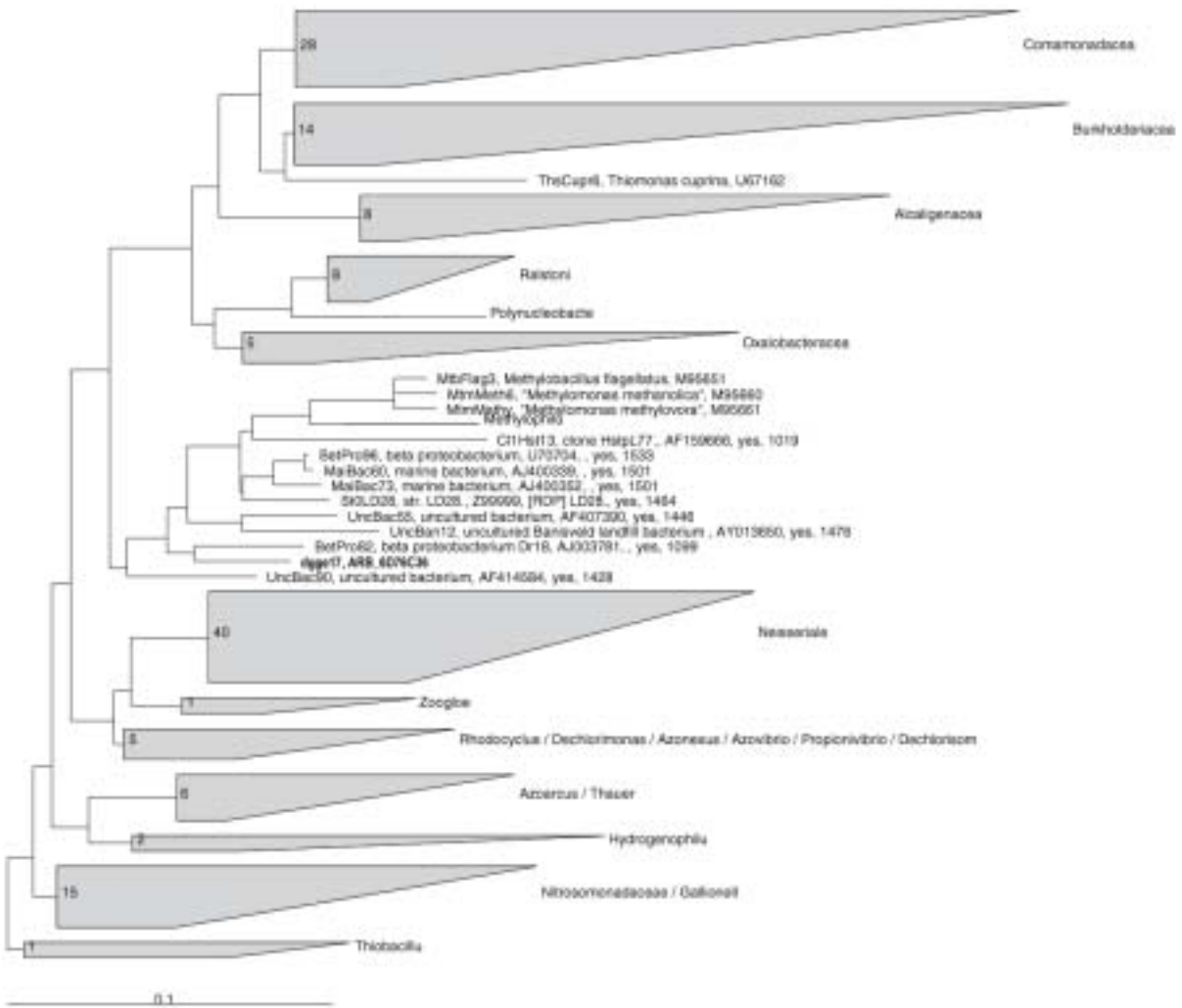


Figura VI-9. Arbre filogenètic de β -Proteobacteria obtingut a partir de les seqüències parcials dels gens dels 16S ARNr amplificats amb encebadors del domini *Bacteria*. Escala = 0,1 mutacions per nucleòtid

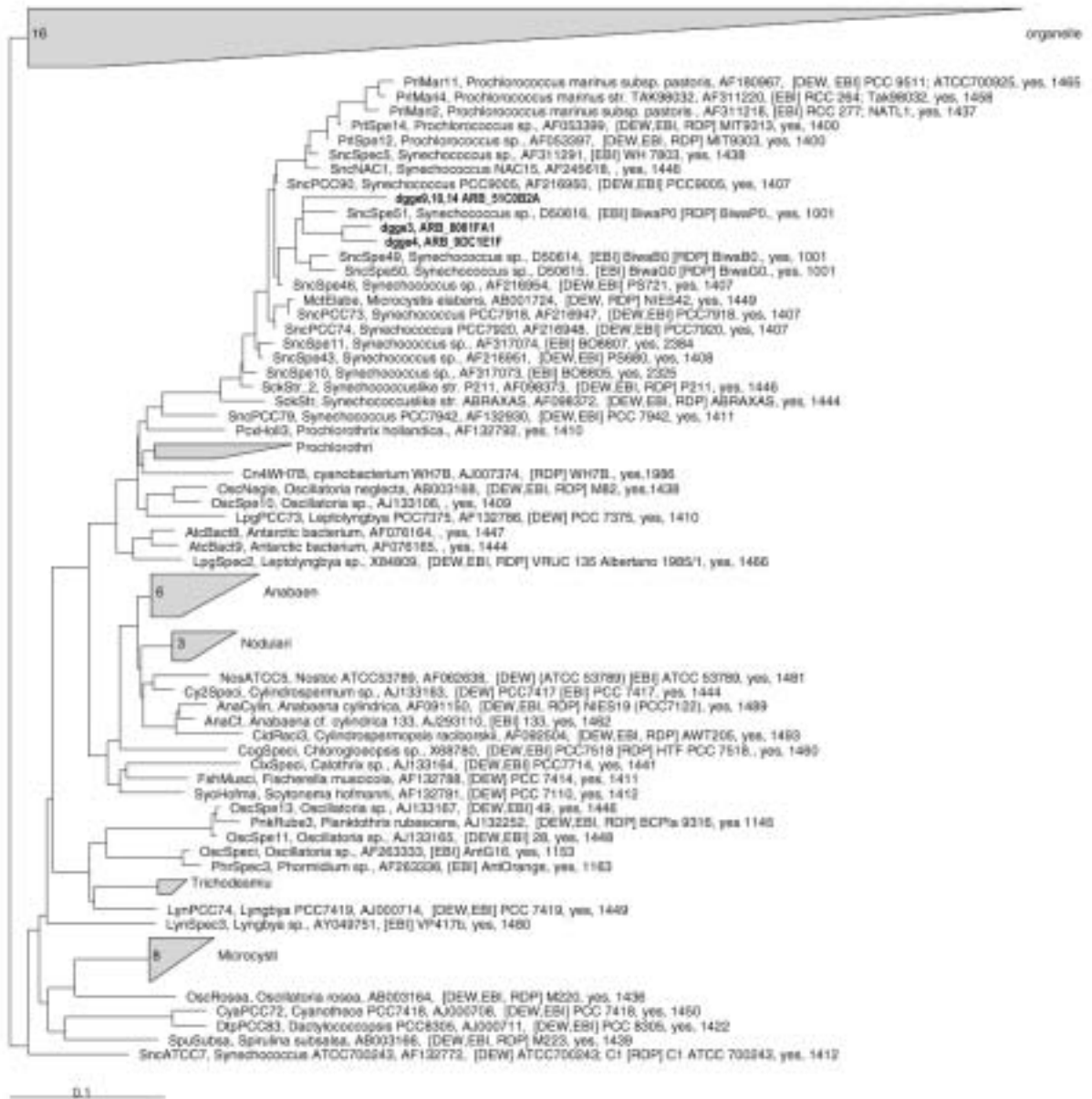


Figura VI-10. Arbre filogenètic de *Cyanobacteria* obtingut a partir de les seqüències parcials dels gens dels 16S ARNr amplificats amb encebadors del domini *Bacteria*. Escala = 0,1 mutacions per nucleòtid

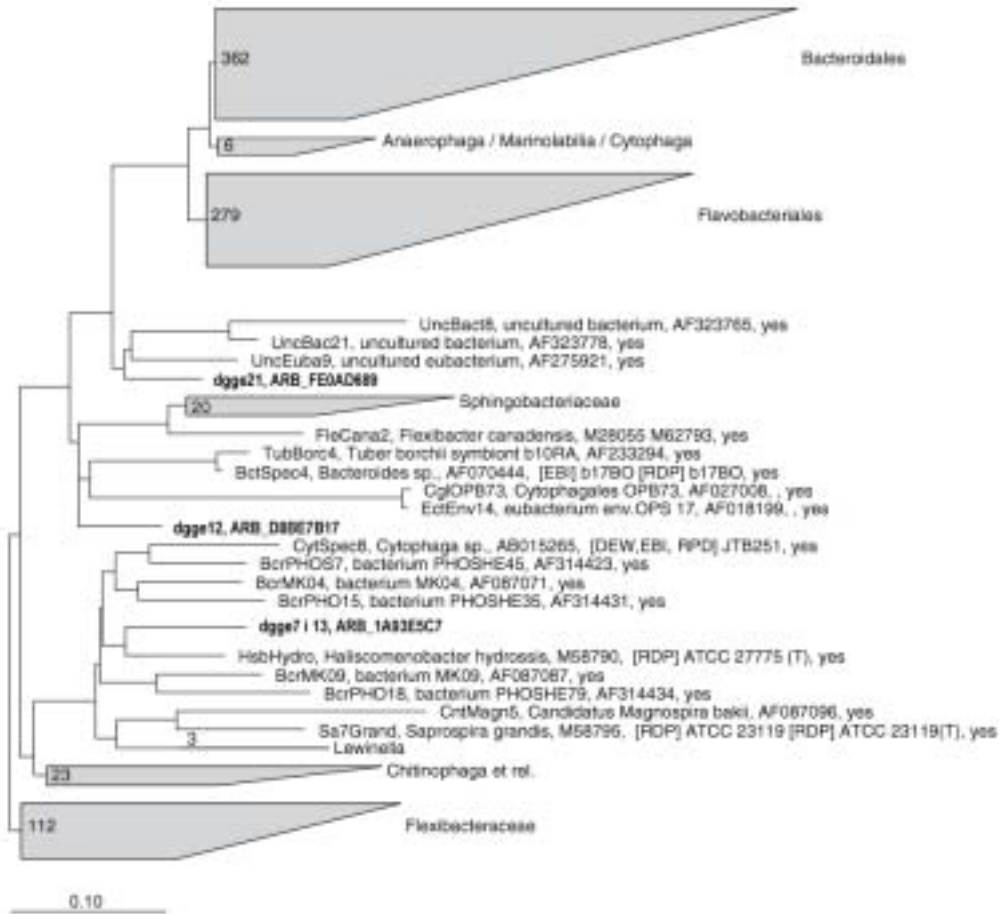


Figura VI-11. Arbre filogenètic de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* i *Chlorobi* (bacteri verd del sofre no cultivable) obtingut a partir de les seqüències parcials dels gens dels 16S ARNr amplificats amb encebadors del domini *Bacteria*. Escala = 0,1 mutacions per nucleòtid

VI.3.6 Anàlisi de dades

L'anàlisi dels resultats es va fer a partir dels valors de similitud obtinguts per la suma dels fragments de restricció, després de digerir els 16S ADNr amb els enzims *RsaI*, *AluI* i *HinfI*, i els valors de similitud dels patrons de bandes de DGGE, tal com s'indica en l'apartat II.3.7. La distribució de les mostres en els dendrogrames (figures VI-12 i VI-14) i els mapes MDS (figures VI-13 i VI-15) resultants, independentment de la tècnica molecular emprada inicialment, mostrava una gran versemblança.

El dendrograma de similitud dels 16S ADNr-RFLP bacterians ens diferenciava les submostres en dos grups força compactes (figura VI-12). En el primer grup, s'hi trobaven les submostres de la part superficial del període d'estratificació (Su0-7m) on la temperatura era elevada i constant. Dintre d'aquest grup fou evident la diferenciació entre les submostres que tenien els valors més elevats de llum incident, temperatura, oxigen i conductivitat (Su0-5m) de la que presentava valors inferiors (Su7m). En el segon, s'hi van agrupar les submostres de fondàries iguals o superiors a 8 m del període d'estratificació (Su8-12m) i totes les del període de barreja (W0-16,5m). Les submostres d'aquest segon grup (Su8-12m i W0-16m) van quedar, a la vegada, clarament diferenciades de la submostra adjacent al sediment del fons del llac, W16,5m, on la presència de sulfur d'hidrogen i dels pics màxims de proteïna i pigments van ser les característiques més destacades. La manca de llum i la baixa temperatura, juntament amb l'anòxia, van permetre separar entre si les submostres de la part més fonda del llac (Su10-12m) de la resta de submostres del mateix període (Su8-9m). Finalment, les submostres de la part superficial del llac a l'hivern (W2-10m) es van diferenciar d'aquelles (W14-16m) on la concentració d'oxigen era molt inferior i la llum incident inexistent.

L'anàlisi del mapa obtingut amb el mètode MDS dels 16S ADNr-RFLP bacterians mostrava dos grans grups tal com es pot observar en la figura VI-13. En el primer es localitzaven totes les submostres de la part superficial del període d'estratificació (Su0-7m), i en el segon grup, la resta de submostres de la part més fonda d'aquest període (S8-12 m) i la majoria de les submostres d'hivern (W0-16m). La submostra W16,5 m quedava completament separada de la resta de submostres d'ambdós períodes, encara que fou més semblant a les submostres de la part més fonda del període d'estratificació (Su8-12m) que a la resta de submostres d'aquest període (Su0-7m), tal com succeïa en el dendrograma (figura VI-12).

En el dendrograma de similitud dels 16S ADN_r-DGGE bacterians es diferenciava la submostra W16,5 m de la resta de submostres (figura VI-14). Les submostres de la part superficial (Su0-7m) del període d'estratificació eren en un grup separat del de la resta de submostres d'aquest període (Su8-12m) i les d'hivern (W0-16m). En aquest cas, les submostres de la part superficial estaven agrupades igual que en el dendrograma de similitud dels 16S ADN_r-RFLP. A diferència d'aquest, la distribució de les submostres de la part fonda (Su8-12m) del període d'estratificació i les d'hivern (W0-16m) presentava petites variacions. Entre aquestes, cal destacar que les submostres Su8m i Su12m se separaven de la resta de submostres (Su9-10m) que presentaven la major concentració de Bchl *a* i pigments. Igualment, les submostres d'hivern (W0-7m) on la llum incident i la concentració d'oxigen eren més elevades es diferenciaven de la submostra (W10m) on aquests paràmetres eren inferiors o inexistents.

La distribució de les submostres en el mapa (figura VI-15), basat en l'anàlisi dels 16S ADN_r-DGGE bacterians amb el mètode MDS, fou igual que l'observada en el dendrograma (figura VI-14), encara que mostrant un agrupament més distant de les mostres en el pla euclidià.

Duta a terme amb la prova de Kruskal-Wallis, l'anàlisi estadística comparativa del nombre total de fragments de restricció en les diferents fondàries i períodes de l'any no mostrà diferències significatives. En canvi, després de ser analitzades per la *t* de Student, la comparació de la mitjana del nombre de fragments de restricció obtinguts en cadascuna de les fondàries mostrà una disminució significativa ($p < 0,001$) d'aquesta a fondàries superiors a 7 m. D'altra banda, el nombre de bandes de DGGE obtingudes en ambdós períodes de l'any no fou estadísticament diferent quan va ser analitzat amb la prova de Friedman, mentre que les diferències en fondària sí que ho varen ser. Amb un interval de confiança del 99%, mostrà una diferència significativa d'entre 0,007 i 0,009 en el període d'estratificació i d'entre 0,18 i 0,21 en el període de barreja.

VI.3.7 FISH

De tota la columna d'aigua en el període d'estratificació, es van analitzar per FISH diferents fondàries de la part òxica (Su0m, Su7m i Su9m) i una de la part anòxica (Su12m). En el període de barreja l'anàlisi es va fer de tres fondàries diferents: W2m, W10m i W16m. El nombre de cèl·lules per ml, determinat per tinció amb DAPI, variava entre $1,11 \times 10^6$ i $1,14 \times 10^7$ (taula VI-5). La fracció de cèl·lules autofluorescents en tots els casos fou més gran que les cèl·lules visualitzades després d'hibridar amb la sonda Non338, les quals variaven entre 8,17% a 12 m en el període d'estratificació fins a 40,43% a 16 m en el període de barreja (taula VI-5). A més, cal ressaltar que la presència de partícules de naturalesa

inorgànica feia que el soroll de fons fos molt elevat i, per tant, que els recomptes fossin extremadament laboriosos. En la figura VI-16 es mostren algunes imatges on es veu l'autofluorescència natural de les mostres, el marcatge inespecífic dels bacteris amb DAPI i el marcatge específic de diferents grups bacterians amb algunes de les sondes detallades en l'annex 1.

Després de restar les cèl·lules visualitzades amb la sonda Non338 als percentatges d'hibridació obtinguts amb les sondes específiques, els percentatges obtinguts d'hibridació amb cadascuna de les sondes respecte als recomptes amb DAPI es detallen en la taula VI-6.

Al llac Gran d'Estanya es van detectar variacions tant en fondària com entre els dos períodes estudiats (taula VI-6). Els percentatges d'hibridació amb la sonda Eub338 van ser molt diferents en fondària en el període d'estratificació, essent els més alts els obtinguts a la part superficial del llac (Su0m) i en una de les fondàries (Su9m) on s'havia detectat per microscòpia una concentració molt elevada de membres del grup I (PSB-like) (taules VI-1 i VI-2). El domini *Archaea* fou detectat en la part més fonda del llac, entre 9-12 m. Tot i que *Desulfovibrio spp.* fou present a 12 m en aquest període, el grup de bacteris sulfatoreductors (δ -*Proteobacteria*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfofrigus*, i *Desulfovibrio spp.*) fou localitzat majoritàriament a 9 m (taula VI-6). Els percentatges més elevats d' α -, β - i γ -*Proteobacteria* van ser detectats també a 9 m de fondària en aquesta època de l'any, però, a diferència de la resta de grups del domini *Bacteria* analitzats, aquests van ser presents en totes les fondàries estudiades. En el període de barreja, en canvi, el percentatge d'hibridació del domini *Bacteria* disminuïa en fondària, mentre que el del domini *Archaea* augmentava de 2 a 10 m i no es detectava a 16 m. En aquest període de l'any, i de tots els bacteris sulfatoreductors analitzats, només es va detectar *Desulfovibrio spp.* a 16 m de fondària. Les α -, β - i γ -*Proteobacteria* es distribuïen homogèniament en fondària.

Si comparem els percentatges d'hibridació obtinguts pels dominis *Bacteria* i *Archaea* en ambdós períodes estudiats, veiem que aquests són superiors en el període d'estratificació, sobretot en la submostra Su9m (taula VI-6). Igualment, els percentatges de les α - i γ -*Proteobacteria* foren superiors en el període d'estratificació. En canvi, els percentatges més elevats de β -*Proteobacteria* van ser detectats en el període de barreja. Tot i que les α -, β - i γ -*Proteobacteria* van ser trobades en tots dos períodes de l'any, la distribució dels seus percentatges fou més homogènia en el període de barreja. Finalment, els bacteris sulfatoreductors van ser presents en la part més fonda del llac en tots dos períodes (Su9-12m i W10-16m), i els percentatges més elevats van ser els detectats en el període d'estratificació.

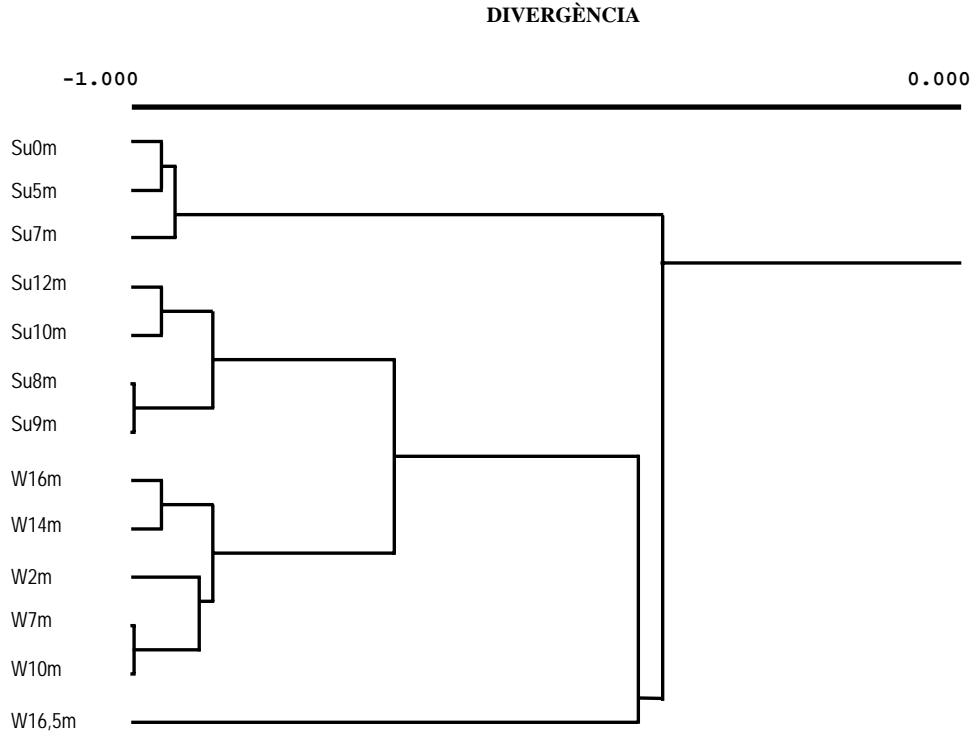


Figura VI-12. Dendrograma de dissimilitud dels 16S ADN-RFLP de les comunitats bacterianes presents al llac Gran d'Estanya per anàlisi de la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AluI* amb el mètode UPGMA. L'anàlisi d'agrupament està basada en les distàncies euclidianes quadrades com a mesura de la dissimilitud genètica utilitzant el mètode d'unió per mitjanes o *average linkage method*

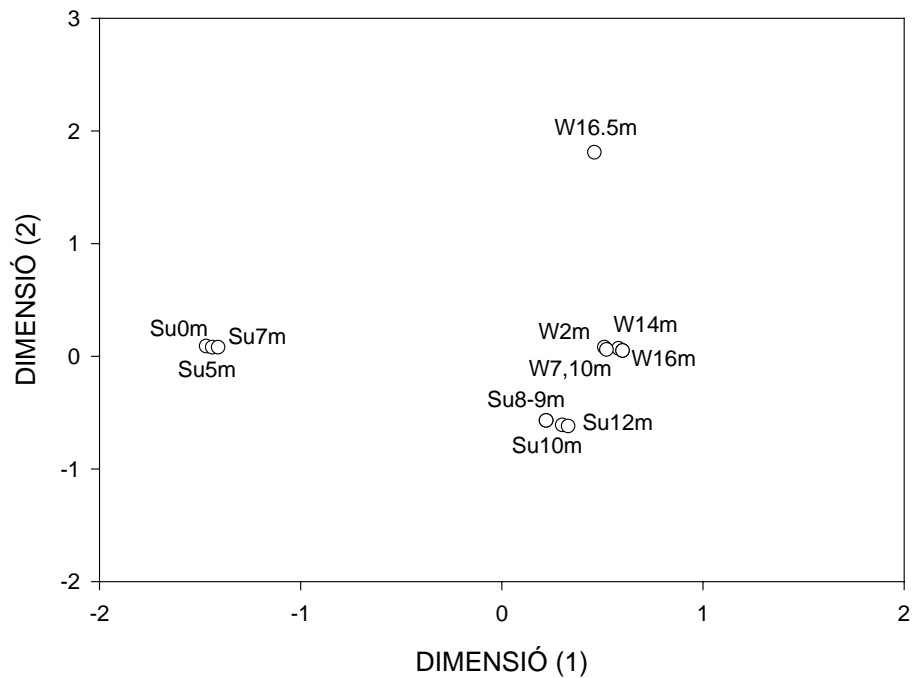


Figura VI-13. Mapa MDS on es reflecteixen els canvis de les comunitats bacterianes presents al llac Gran d'Estanya, obtingut per la suma dels fragments generats amb *RsaI*, *HinfI* i *AluI*. Els números de fora del símbol (o) es corresponen amb les diferents submostres

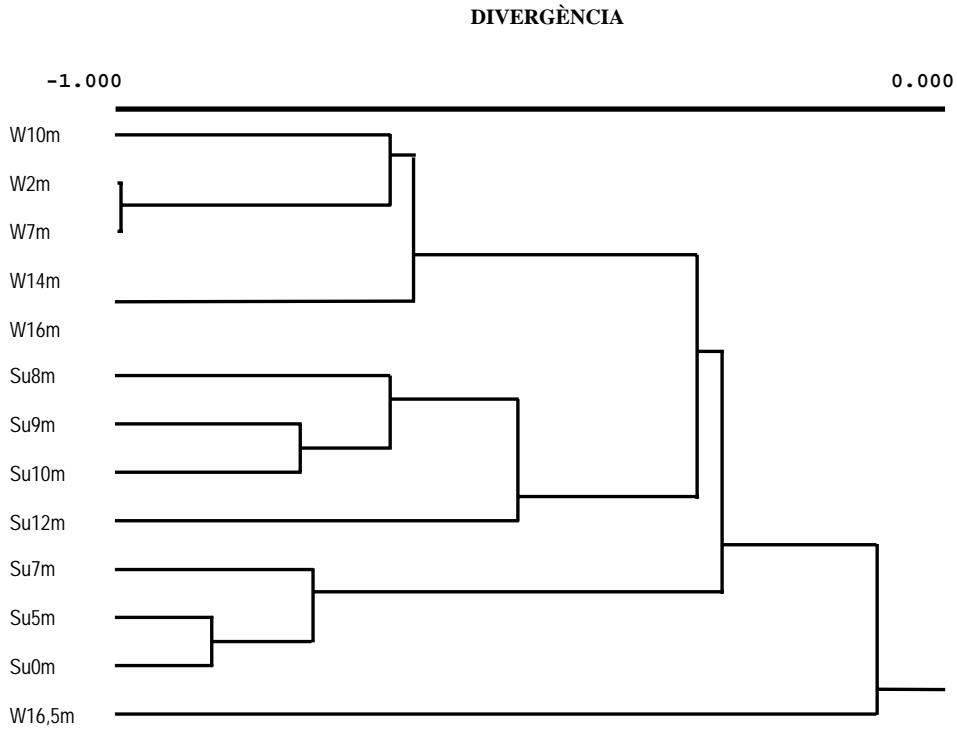


Figura VI-14. Dendrograma de dissimilitud dels 16S ADN-DGGE de les comunitats bacterianes presents al llac Gran d'Estanya. L'anàlisi de grups està basada en les distàncies euclidianes quadrades com a mesura de la dissimilitud genètica utilitzant el mètode d'unió per mitjanes o *average linkage method*

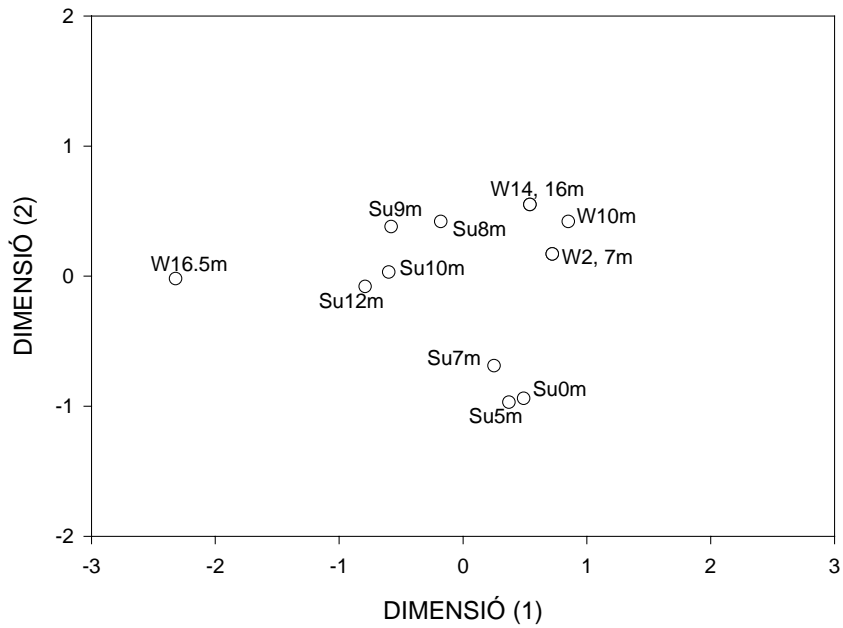


Figura VI-15. Mapa MDS on es reflecteixen els canvis de les comunitats bacterianes al llac Gran d'Estanya, obtingut per l'anàlisi de les bandes separades amb DGGE. Els números de fora del símbol (o) es corresponen amb les diferents submostres

Taula VI-5. Fracció de cèl·lules detectades per FISH en les mostres del llac Gran d'Estanya amb sondes universals i específiques de grup

Fondària (m)	Dia	Cèl·lules ^a totals (10 ⁶ ml ⁻¹) (mitjana ± DS)	Fracció (%) de cèl·lules detectades amb sondes universals i específiques de grup ^b				
			Auto ^b	Non338	Eub338	Arch915	Srb338
0	20.09.01	1,42 ± 0,1	8,73 ± 2,23	8,35 ± 3,10	18,60 ± 7,02	5,35 ± 0,05	8,18 ± 2,55
7	20.09.01	1,11 ± 0,07	42,91 ± 10,72	35,71 ± 17,21	38,68 ± 9,19	35,35 ± 13,37	35,94 ± 12,60
9	20.09.01	11,4 ± 0,6	50,65 ± 3,73	39,82 ± 13,54	55,09 ± 13,87	41,07 ± 16,23	37,36 ± 12,07
12	20.09.01	10,5 ± 0,8	15,48 ± 1,35	8,17 ± 0,80	9,53 ± 2,10	8,24 ± 0,55	8,14 ± 1,04
2	19.02.02	2,65 ± 0,3	44,63 ± 16,32	38,75 ± 14,76	50,42 ± 13,00	38,90 ± 7,58	38,68 ± 7,18
10	19.02.02	3,32 ± 0,5	45,66 ± 11,00	40,32 ± 16,69	49,87 ± 16,34	44,27 ± 18,86	37,09 ± 7,74
16	19.02.02	3,16 ± 0,9	47,54 ± 10,72	40,43 ± 6,20	47,94 ± 14,36	35,40 ± 11,37	37,27 ± 6,69

Fondària (m)	Dia	Cèl·lules ^a totals (10 ⁶ ml ⁻¹) (mitjana ± DS)	Fracció (%) de cèl·lules detectades amb sondes universals i específiques de grup ^b				
			Dsv698	Dss658	Alf968	Bet42a	Gam42a
0	20.09.01	1,42 ± 0,1	8,32 ± 0,15	8,15 ± 0,96	9,93 ± 3,55	10,94 ± 1,11	9,61 ± 1,13
7	20.09.01	1,11 ± 0,07	35,49 ± 1,56	32,82 ± 5,31	36,03 ± 1,40	36,68 ± 2,40	36,12 ± 1,73
9	20.09.01	11,4 ± 0,6	40,92 ± 4,10	42,54 ± 18,47	46,37 ± 9,74	42,92 ± 13,52	46,01 ± 17,82
12	20.09.01	10,5 ± 0,8	8,80 ± 0,09	8,11 ± 0,70	8,32 ± 0,14	8,70 ± 2,54	9,05 ± 0,60
2	19.02.02	2,65 ± 0,3	38,50 ± 3,05	32,18 ± 13,51	43,32 ± 4,31	43,28 ± 7,62	41,53 ± 7,71,
10	19.02.02	3,32 ± 0,5	39,7 ± 1,96	35,93 ± 18,76	44,27 ± 6,21	44,66 ± 12,14	43,77 ± 5,56
16	19.02.02	3,16 ± 0,9	40,69 ± 2,28	39,19 ± 11,62	41,83 ± 7,41	41,83 ± 9,20	41,76 ± 11,96

^aNombre total de cèl·lules detectades amb DAPI. ^bPercentatge de detecció respecte a DAPI i la seva desviació estàndard

Taula VI-6. Fracció real de cèl·lules detectades per FISH en les mostres del llac Gran d'Estanya amb sondes universals i específiques de grup

Fondària (m)	Dia	Fracció real (%) de cèl·lules detectades amb sondes universals i específiques de grup ^b							
		Eub338	Arch915	Srb385 ^c	Dsv698 ^d	Dss658 ^e	Alf968	Bet42a	Gam42a
0	20.09.01	10,25	0	0	0	0	1,58	2,59	1,26
7	20.09.01	2,96	0	0	0	0	0,32	0,96	0,40
9	20.09.01	15,27	1,26	0,23	1,10	2,73	6,55	3,10	6,19
12	20.09.01	1,37	0,08	0	0,64	0	0,15	0,54	0,88
2	19.02.02	11,68	0,15	0	0	0	4,58	4,53	2,78
10	19.02.02	9,55	1,02	0	0	0	3,95	4,34	3,46
16	19.02.02	7,51	0	0	0,26	0	1,40	1,13	1,34

^aNombre total de cèl·lules detectades amb DAPI. ^bPercentatge de detecció respecte a DAPI i la seva desviació estàndard. ^cDetecció de *δ-Proteobacteria*. ^dDetecció de *Desulfovibrio spp.* ^eDetecció de *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* i *Desulfofrigus*

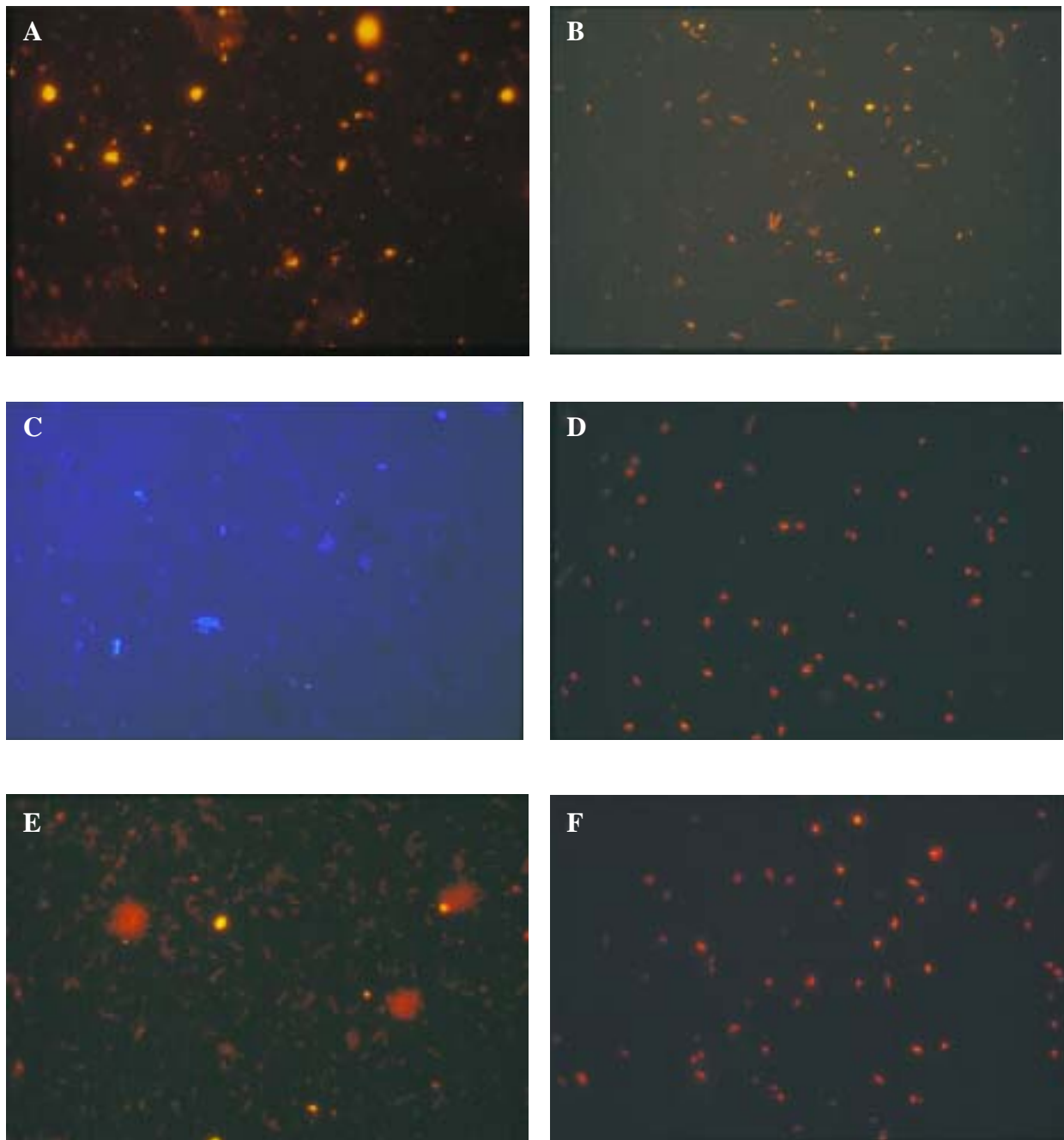


Figura VI-16. Hibridacions *in situ* en diferents mostres d'aigua procedents del llac Gran d'Estanya. A) Autofluorescència deguda a la presència de partícules de naturalesa inorgànica. B) Autofluorescència de bacteris fototròfics. C) Marcatge amb DAPI. D) Hibridació amb la sonda Eub338 marcada amb CY3. E) Hibridació amb la sonda Alf968 marcada amb CY3. F) Hibridació amb la sonda Srb385 marcada amb CY3

VI.4 Discussió

En aquest treball es van emprar mètodes clàssics i moleculars per a obviar les limitacions que presenten aquestes metodologies per separat. Durant els dos períodes d'estudi, estratificació i barreja, la distribució dels paràmetres fisicoquímics va demostrar que les condicions trobades en el llac Gran d'Estanya eren força semblants a les trobades en estudis anteriors (Gaju, 1987; Guerrero *et al.*, 1987; Mir, 1997).

Si es relaciona la distribució vertical dels grups microbians dominants, caracteritzats per microscòpia òptica, amb els diferents paràmetres fisicoquímics analitzats en el llac Gran d'Estanya, s'observa que la seva distribució queda determinada en funció de la presència o absència de llum i de les diferents concentracions d'oxigen i sulfur d'hidrogen trobades en fondària (figura VI-1; taules VI-1 i VI-2). Per exemple, els organismes del grup A es localitzen majoritàriament en la part superficial del llac on es detecta llum i oxigen. En el cas del grup I, els bacteris fototròfics anoxigènics del sofre (PSB) es troben localitzats on hi ha el pic màxim de Bchl *a* i on es detecta sulfur d'hidrogen.

Després d'analitzar macroscòpicament i microscòpicament cadascuna de les submostres, i per a dur a terme l'anàlisi molecular dels patrons dels 16S ADNr-RFLP, l'ADN genòmic de cadascuna de les submostres fou extret i els gens dels 16S ARNr foren amplificats amb els encebadors dels dominis *Bacteria* i *Archaea*. En ambdós períodes de l'any, el domini *Bacteria* es va trobar homogèniament distribuït en fondària, mentre que el domini *Archaea* fou absent en alguna de les fondàries analitzades. La distribució del domini *Archaea* en ambdues parts del llac, l'òxica i l'anòxica, ens podria indicar la gran versatilitat metabòlica d'aquest grup, fet que descriuen altres autors (Casamayor *et al.*, 2000, 2001; Cytryn *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2001).

Els patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians foren molt complexos, tal com s'ha descrit en d'altres ecosistemes aquàtics (Acinas *et al.* 1997; Casamayor *et al.*, 2000; Konopka *et al.*, 1999), i difícils d'analitzar. Malgrat aquesta complexitat, en el període d'estratificació es van detectar diferències entre els patrons de la part superficial del llac, on la temperatura i la intensitat de llum incident eren elevades, i els de la resta de submostres d'aquest període, on la Chl *a*, Bchl *a* i el sulfur d'hidrogen eren alts i la intensitat de llum incident era baixa o inexistent. En el període de barreja, en canvi, les diferències entre els patrons de restricció obtinguts en la part superficial del llac i la part més fonda van ser molt petites, les quals es relacionaren amb la presència o absència d'oxigen, sulfur d'hidrogen i llum. La presència de fragments

comuns (Konopka *et al.*, 1999) en aquests patrons es podria explicar per la gran capacitat d'adaptació, estructural i fisiològica, que determina que els bacteris que són sotmesos a diferents condicions ambientals puguin sobreviure i distribuir-se en una columna d'aigua de forma homogènia (Guyoneaud *et al.*, 2001; Soutourina *et al.*, 2001). Els fragments específics de fondària, en canvi, podrien ser deguts al fet que els organismes que tenen poca capacitat d'adaptació es desplacen a una fondària determinada buscant els gradients fisicoquímics més òptims per al seu desenvolupament. Així doncs, les diferències genètiques observades ens indiquen que hi ha variacions en fondària i d'àmbit estacional de les poblacions bacterianes presents en l'ecosistema estudiat, tal com s'ha descrit en alguns ambients aquàtics (Acinas *et al.*, 1997; Konopka *et al.*, 1999).

L'anàlisi comparativa dels patrons dels 16S ADNr-RFLP obtinguts en els dos períodes amb els enzims tetramèrics *AluI* i *RsaI* ens mostrava que els patrons de la columna d'aigua durant el període de barreja eren molt semblants als obtinguts a la part més fonda del llac en el període d'estratificació, fet que no va ser observat amb l'enzim *HinfI*. Per a comprovar i corroborar aquesta similitud entre els patrons d'ambdós períodes, s'aplicà una altra tècnica de caracterització genètica: la DGGE. A més, i una vegada obtinguts els patrons de DGGE, la comparació del nombre de bandes presents en els diferents patrons i l'extracció de les bandes dominants, seqüenciació i identificació van permetre realitzar un estudi preliminar de la diversitat bacteriana dominant de l'ecosistema. La diversitat obtinguda en la part anòxica i adjacent al sediment del llac a l'hivern fou la més baixa i l'única banda identificada es relacionava amb les β -*Proteobacteria*. En la part superficial del llac a l'estiu, en canvi, la diversitat bacteriana trobada fou més gran que l'anterior i dominada per *Cyanobacteria* i α -*Proteobacteria*. La diversitat bacteriana en tota la columna d'aigua a l'hivern fou dominada per α -*Proteobacteria*, *Cyanobacteria* i CFB, semblant a l'obtinguda en la part superficial (Su0-7m) a l'estiu. Finalment, si es compara amb totes les anteriors, la diversitat bacteriana més elevada va ser la trobada en la part més fonda del llac (Su8-12m) a l'estiu, la qual era dominada per CFB, α -*Proteobacteria* i *Chlorobi*, com ja s'ha descrit en altres sistemes estratificats (Guerrero *et al.*, 1987; Overmann *et al.*, 1999). La conclusió que podem extreure en funció dels resultats obtinguts per DGGE, tot i ser molt comuna la presència de β -*Proteobacteria* en les comunitats planctòniques de mostres lacustres (Alfreider *et al.*, 1996; Battin *et al.*, 2001; Hiorns *et al.*, 1995; Pernthaler *et al.*, 1998), és que aquest grup no semblava el dominant en el llac Gran d'Estanya.

A partir de l'anàlisi dels patrons dels 16S ADNr-RFLP i de DGGE pel mètode MDS, es van construir els mapes corresponents. En aquests es demostrava que les submostres de la part més fonda del període d'estratificació i les submostres de tota la columna d'aigua a l'hivern s'assemblaven molt entre

si, independentment de tenir paràmetres fisicoquímics molt diferents, i que es diferenciaven molt de les de la part superficial. Aquests resultats estan d'acord amb les observacions fetes al llac Gran d'Estanya (Mir, 1997) i entre diferents estacions de l'any a l'estanyol d'en Cisó per Casamayor (2000) i difereixen de les distribucions estacionals obtingudes prèviament en ecosistemes bentònics i planctònics estratificats (Díez *et al.*, 2001; Ramírez-Moreno *et al.*, 2003). A més, l'anàlisi pel mètode MDS dels patrons de DGGE sembla tenir un poder discriminatori més gran que l'anàlisi dels patrons dels 16S ADNr-RFLP, essent més clarament observables les diferències intramostra per DGGE.

Tal com s'havia descrit anteriorment en aquest llac (Gaju, 1987; Guerrero *et al.*, 1987), la detecció de la màxima concentració de Bchl *a* i la mateixa coloració rogenca de l'aigua de la part més fonda del llac analitzada en el període d'estratificació eren indicatives de la presència de bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre. Tot i ser dominants en aquest període i en les fondàries de 8 a 12 m, aquests γ -proteobacteris no foren detectats possiblement com a conseqüència del baix nombre de bandes estretes i seqüenciades a partir dels patrons de la DGGE, mentre que sí que va ser possible detectar d'altres bacteris fototròfics anoxigènics no majoritaris, com són els *Chlorobi* (bacteris verds del sofre). Com va descriure Overmann (1999), els patrons de DGGE obtinguts per a una mateixa mostra quan s'amplifiquen els gens dels 16S ARNr amb encebadors universals i específics de grup poden donar un nombre molt diferent de bandes: és més petit en el primer cas i es va incrementant en el segon. Com a conseqüència, la utilització d'encebadors específics del grup *Chromatiaceae* en futurs estudis al llac Gran d'Estanya sembla l'alternativa per detectar els membres d'aquest grup i, a més a més, reduir la freqüència de formació de quimeres i de bandes ambigües (Achenbach *et al.*, 2001; Gich *et al.*, 2001). L'anàlisi microscòpica de totes les submostres del període d'estratificació, en canvi, va permetre visualitzar aquests bacteris en forma de cèl·lules que acumulaven glòbuls de sofre intracel·lular a la part més fonda del llac. A diferència dels estudis previs realitzats en aquest ecosistema lacustre, l'anàlisi microscòpica de la columna d'aigua en el període de barreja va possibilitar la detecció d'aquests γ -proteobacteris a molt baixes concentracions a la part més fonda del llac analitzada, on la concentració d'oxigen era d'aproximadament 4-5 mg O₂ ml⁻¹. Com a conseqüència de les observacions realitzades, es demostra que aquests bacteris anoxigènics fototròfics poden tolerar condicions òxiques o bé mantenir-se molt poc actius metabòlicament quan les condicions no són les òptimes per al seu creixement (Bosshard *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2000).

Una vegada obtinguda, mitjançant l'anàlisi dels patrons dels 16S ADNr, la informació qualitativa de la composició bacteriana de les mostres del llac Gran d'Estanya en fondària, l'aplicació de la FISH ens va permetre obtenir informació quantitativa de les poblacions bacterianes presents en la columna d'aigua. No obstant això, aquesta informació fou limitada per la quantitat de soroll de fons trobat, com a conseqüència

de l'elevada proporció de cèl·lules autofluorescents perquè contenen Chl *a* i Bchl *a* (algues i cianobacteris en la part òxica; bacteris fototròfics en la part anòxica) i la presència de partícules de naturalesa inorgànica (Glöckner *et al.*, 1999; Tonolla *et al.*, 2000). Malgrat que es va intentar reduir l'autofluorescència d'aquestes poblacions fototròfiques i incrementar el senyal d'hibridació emprant metanol durant el procés d'hibridació (Tuschak *et al.*, 1999), l'increment poc significatiu del senyal i la manca de reducció de l'autofluorescència seguien fent molt complex i difícil el seu estudi. El percentatge de cèl·lules autofluorescents trobat en la columna d'aigua va ser molt més elevat que el descrit anteriorment en sediments i diferents ecosistemes aquàtics (1-15%) (Battin *et al.*, 2001; Glöckner *et al.*, 1999), però fou similar al 33% descrit en la termoclina del llac meromíctic Cadagno per la presència de *γ-Proteobacteria* (Tonolla *et al.*, 2000). La suma de les dues poblacions, cianobacteris i bacteris fototròfics anoxigènics, pot explicar l'elevat percentatge d'autofluorescència detectat durant el període d'estratificació, mentre que la presència de poblacions de cianobacteris i algues ho pot fer durant l'hivern. No obstant això, tot i la petita fracció de cèl·lules no autofluorescents que es va poder caracteritzar per la FISH al llac Gran d'Estanya, es van detectar variacions en fondària.

La comparació dels resultats obtinguts per FISH i DGGE mostra unes diferències molt marcades quant a la distribució en fondària dels bacteris sulfatoreductors i les α - i β - i *γ-Proteobacteria* en els períodes d'estratificació i barreja. Aquestes diferències es poden atribuir a dos factors, al baix nombre de bandes extretes i seqüenciades a partir dels patrons de DGGE, fet que ja s'ha descrit anteriorment, i a la diferència entre el nombre de bacteris totals i actius detectats, respectivament, per DGGE i FISH. A diferència dels resultats obtinguts per DGGE, l'ús de la FISH ha permès detectar β - i *γ-Proteobacteria* en totes les fondàries i dies de mostreig. A més, la FISH ha estat útil per a detectar el domini *Archaea* en la part més fonda del llac en el període d'estratificació i en tota la columna d'aigua en el de barreja, la qual cosa corrobora els resultats obtinguts prèviament per l'amplificació dels 16S ADNr d'aquest domini. La comparació dels patrons dels 16S ADNr-RFLP i els resultats quantitius obtinguts per hibridació amb sondes marcades fluorescentment mostrava diferències molt grans, degudes, probablement, una altra vegada al fet que la molècula diana analitzada per ambdues tècniques, RFLP i FISH, és molt diferent. Així doncs, mentre que els patrons de restricció eren força semblants entre si (Su0-7m; Su8-12m; W2-16m; W16,5m), els percentatges dels *Proteobacteria* i bacteris sulfatoreductors detectats per la FISH eren molt diferents. És a dir, tot i haver-hi diferències quantitatives, aquestes no es reflecteixen qualitativament.

La suma dels percentatges d'hibridació obtinguda amb les sondes específiques de grup marcades fluorescentment mostrava que la majoria dels bacteris detectats en l'ecosistema estudiat amb la sonda universal Eub338 eren detectats per la FISH. No obstant això, si es compara amb ecosistemes equivalents

d'aigua dolça (Bosshard *et al.*, 2000), la fracció de cèl·lules tenyida amb la sonda Eub338 respecte a la tenyida amb DAPI era molt baixa. Aquest fet podria ser degut a: la presència de moltes cèl·lules autofluorescents d'origen bacterià que no es van tenir en compte a l'hora de determinar el percentatge total dels bacteris; que cèl·lules tenyides amb la sonda Eub338 no foren considerades com a positives per l'elevat soroll de fons; la manca del lloc diana per a la sonda Eub338 en determinats bacteris planctònics aerobis com són els *Planctomycetales* (Zarda *et al.*, 1997); la presència de bacteris amb un baix contingut ribosomal (Pernthaler *et al.*, 2002), o la difícil penetració de les sondes en determinats grups bacterians (Amann *et al.*, 1995a-b). D'altra banda, l'aplicació de sondes poc específiques de grup, com la Gam42a (Nielsen *et al.*, 1999), pot determinar que l'abundància d'aquest grup sigui superior a la detectada i que, per tant, la suma dels percentatges d'hibridació de les sondes específiques de grup respecte al total de bacteris detectats sigui en alguns casos inferior al 100%, tal com s'observa a 0 i 7 m al període d'estratificació i a 16 m a l'hivern. A més, tot i ser descrita una gran diversitat d'*Archaeas* en llacs estratificats hipersalins i de muntanya (Casamayor *et al.*, 2001b; Cytryn *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 1998), tampoc no podem obviar que l'elevat percentatge d'*Archaeas* trobat en els dos períodes estudiats sigui degut a unions inespecífiques de la sonda Arch915 amb els bacteris planctònics del tipus CFB detectats prèviament per DGGE (Battin *et al.*, 2001; Dang i Lovell, 2002; Pernthaler *et al.*, 2002). Aquesta darrera hipòtesi concordaria amb els resultats obtinguts prèviament per PCR, on el domini *Archaea* fou detectat però a molt baixes concentracions.

Els resultats obtinguts en aquest treball han demostrat que al llac monomíctic d'Estanya hi ha variacions espaciotemporals de les poblacions bacterianes. Per microscòpia òptica, s'han detectat i localitzat variacions en fondària i estacionals dels grups microbians dominants. L'amplificació dels gens bacterians dels 16S ARNr per PCR i el posterior anàlisi comparativa dels patrons dels 16S ADN-RFLP i 16S ADN-DGGE han permès detectar canvis qualitius, majoritàriament, entre les poblacions que viuen a la part superficial i a la part més fonda del llac. L'escissió i la seqüenciació de les bandes dominants obtingudes per DGGE han determinat que les seqüències estan afiliades dintre de quatre dels filums del domini *Bacteria*: *Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Proteobacteria* (classes α i β) i *Chlorobi*. L'anàlisi comparativa del nombre de bandes presents en els patrons de DGGE, a més, ha revelat una diversitat bacteriana molt elevada a la part més fonda del llac en el període d'estratificació. Addicionalment, la FISH ens ha permès detectar canvis tant qualitius com quantitius dels diferents grups analitzats entre les diferents submostres i dies de mostreig. Tot i els resultats obtinguts, les mancances derivades dels mètodes d'ADN i ARN d'anàlisi emprats en la realització d'aquest treball, juntament amb la necessitat d'estudis complementaris als ja realitzats fins al moment, fan que no es

descarti en un futur l'ús de tècniques addicionals tècniques (Duineveld *et al.*, 2001; Giuliano *et al.*, 1999; Höfle *et al.*, 1999 Liu *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 2000) per a aprofundir en el coneixement d'aquest hàbitat.

VI.5 Conclusions

Una vegada analitzats els resultats obtinguts amb les diferents tècniques emprades en la realització d'aquest estudi al llac Gran d'Estanya, les conclusions principals que s'han extret són les següents:

1. L'ús combinat de metodologies clàssiques (microscòpia òptica i anàlisi dels paràmetres fisicoquímics) i moleculars (RFLP, DGGE i FISH) ens ha permès obtenir informació nova i/o complementària al llac Gran d'Estanya. Per exemple, els bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre s'han detectat en ambdós períodes de l'any macroscòpicament (coloració rogenca de l'aigua), microscòpicament (cèl·lules que acumulen glòbuls de sofre intracel·lular) i per FISH (cèl·lules bacterianes autofluorescents i l'increment del grup γ -*Proteobacteria*). Aquest grup bacterià, en canvi, no s'ha detectat per DGGE.
2. El domini *Bacteria* es troba homogèniament distribuït en totes dues estacions de l'any analitzades mitjançant PCR-RFLP i PCR-DGGE. El domini *Archaea* es localitza en la majoria de fondàries analitzades per PCR-RFLP, mentre que per FISH es detecta entre 9 i 12 m en el període d'estratificació i entre 2 i 10 m a l'hivern.
3. La complexitat dels patrons dels 16S ADNr bacterians obtinguts, determinada pel nombre de bandes visualitzades per DGGE, ens indica que la diversitat bacteriana en la part més fonda del llac a l'estiu (Su8-12m) és superior a la detectada en la resta de fondàries i èpoques de l'any. L'anàlisi de les seqüències obtingudes demostra que les diferències espacials són degudes a variacions dels grups bacterians dominants (*Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, α -*Proteobacteria*) detectats en cada fondària del llac. En canvi, les diferències estacionals existents són degudes, principalment, a l'aparició del grup β -*Proteobacteria* a l'hivern (W16,5m) i a l'aparició de *Chlorobi* a l'estiu (Su10-12m).
4. Mitjançant l'ús de la FISH s'obté informació quantitativa de les poblacions bacterianes actives presents en la columna d'aigua, però aquesta, en el nostre cas, està limitada per la presència d'una elevada

fracció de cèl·lules autofluorescents (38-43%) i per la presència de partícules de naturalesa inorgànica. Les diferències espacials i estacionals detectades per la FISH estan relacionades amb les variacions de les concentracions dels grups α -, β - i γ -*Proteobacteria*. Tot i que la presència de β -*Proteobacteria* en comunitats planctòniques en les mostres lacustres és molt comuna, sembla que no són predominants al llac Gran d'Estanya. A més, els bacteris sulfatoreductors es localitzen en tota la columna d'aigua, però la seva presència és majoritària a la part més fonda del llac.

5. Els mapes obtinguts a partir de l'anàlisi pel mètode MDS dels patrons dels 16S ADNr-RFLP i 16S ADNr-DGGE demostren que les mostres de la part més fonda (Su8-12m) del llac en el període d'estratificació i les mostres de tota la columna d'aigua (W0-16m) a l'hivern realment s'assemblaven molt entre si, independentment de tenir paràmetres fisicoquímics molt diferents.
6. Els patrons dels 16S ADNr-DGGE analitzats per MDS permeten detectar diferències intramostra més marcades que els patrons dels 16S ADNr-RFLP.

VII. Discussió general

VII.1 Anàlisi fisicoquímiques, bioquímiques i
biològiques

VII.2 Anàlisi moleculars

VII.3 16S ADNr-RFLP en poblacions
bacterianes mixtes

L'aplicació de tècniques clàssiques, com ara microscòpia òptica i anàlisi dels paràmetres biòtics i abiòtics, ha estat durant molt de temps essencial per a caracteritzar l'estructura, la diversitat i la funció de les poblacions microbianes presents en sistemes estratificats, entre els quals es troben els tapissos microbians del delta de l'Ebre (Martínez-Alonso, 1997; Navarrete, 1999; Solé *et al.*, 2002), el llac Gran d'Estanya (Àvila *et al.*, 1984; Gaju *et al.*, 1992; García-Cantizano, 1992; Gasol, 1988; Mir, 1997) i els estanyols d'en Cisó (Abellà *et al.*, 1980; Gaju *et al.*, 1992; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993) i del Vilar (Abellà, 1980; Brugada i Montesinos, 1986; García-Cantizano, 1992; Mir, 1997). En la darrera dècada, en canvi, l'aplicació de tècniques moleculars ha augmentat de forma exponencial, ja que permet aprofundir en el coneixement de les comunitats microbianes que habiten en aquests ecosistemes, tant la fracció cultivable com la no cultivable (Casamayor *et al.*, 2000, 2001, 2002; Macarrón, 1998; Navarrete, 1999). No obstant això, com a conseqüència de les limitacions que presenten ambdues aproximacions, clàssiques i moleculars, quan aquestes s'apliquen per separat, molts autors han arribat a la conclusió que l'aplicació combinada d'aquestes tècniques és la millor opció per a descriure de forma més acurada els ecosistemes naturals (Brinkhoff i Muyzer, 1998; Ovreas *et al.*, 1998). En aquest treball s'han estudiat l'estructura i la dinàmica de les poblacions microbianes que viuen en diferents sistemes estratificats (bentònics o planctònics) mitjançant l'ús combinat de tècniques clàssiques i moleculars. La gran importància que ha tingut en la darrera dècada l'anàlisi total o parcial dels gens dels 16S ARNr amplificats per PCR determinà que aquesta molècula fos la base del nostre estudi.

VII.1 Anàlisis fisicoquímiques, bioquímiques i biològiques

La distribució dels diferents paràmetres fisicoquímics en tots els sistemes estratificats estudiats, un de bentònic i tres de planctònics, és molt similar malgrat que la seva naturalesa és diferent i que l'escala espacial varia de mil·límetres a metres en funció del sistema estudiat. Als estanyols d'en Cisó i del Vilar i al llac Gran d'Estanya s'ha demostrat que les variacions d'aquests paràmetres en fondària i al llarg del temps són semblants a les descrites en treballs anteriors (Pedrós-Alió i Guerrero, 1993; Gaju, 1987; Guerrero *et al.*, 1987; Mir, 1997). No obstant això, cal remarcar, però, que en el Cisó i el Vilar la concentració d'un dels paràmetres, el sulfur d'hidrogen, és més baixa que la descrita en d'altres treballs (Gasol, 1988; Guerrero i Abellà, 1978; Mir, 1997). A l'estanyol d'en Cisó, la disminució de la concentració de sulfur d'hidrogen pot ser deguda al fet que, des que fou descrit per primera vegada, aquest estanyol ha anat tenint canvis morfològics i en la composició bacteriana (García-Cantizano, 1992; García-Gil *et al.*, 1985; Gasol *et al.*, 1990; Mas, 1982; Massana *et al.*, 1993; Sanz, 1986). Entre aquestes variacions trobem els esclavissaments provocats per la dissolució dels materials que formen la base dels estanyols amb la capa

freàtica d'aigua els anys 1982, 1984, 1986 i 1992 i l'increment de la concentració d'algues a l'estiu com *Cryptomonas*, les quals determinen que el grau d'oxidació del sulfur d'hidrogen sigui molt més elevat (Brugada i Montesinos, 1986; García-Gil *et al.*, 1985; Gasol, 1988; Mas, 1982; Massana *et al.*, 1993). Aquest segon fenomen podria ser el responsable també de la baixa concentració de sulfur d'hidrogen detectada a l'estanyol del Vilar, ja que no s'han descrit canvis morfològics en aquest estanyol.

Igual que succeeix amb els paràmetres fisicoquímics, la distribució en fondària dels diferents grups fisiològics mostra una gran similitud en tots els sistemes estratificats estudiats. En la part superficial d'aquests sistemes, on la presència de llum i oxigen és característica, trobem bàsicament organismes fototròfics oxigènics. Quan en fondària trobem llum, l'oxigen es troba a molt baixes concentracions i es comença a detectar sulfur d'hidrogen, les poblacions majoritàries que s'han detectat són les dels bacteris fototròfics anoxigènics, tal com s'ha descrit en treballs anteriors (Gaju, 1987; Guerrero *et al.*, 1987, 1993a; Martínez-Alonso, 1997; Rampone *et al.*, 1993). La presència dels bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre és la que determina la coloració roja de les làmines als tapissos microbians del delta de l'Ebre i la coloració rogenca de l'aigua del llac Gran d'Estanya entre 10 i 12 m en el període d'estratificació. En aquest llac, a més, l'observació de cèl·lules que acumulen glòbuls de sofre intracel·lular i la presència del pic de Bchl *a* en les fondàries descrites són indicadores que aquests bacteris fototròfics anoxigènics hi són presents. Igualment, la presència d'aquestes poblacions fototròfiques anoxigèniques en els estanyols d'en Cisó i del Vilar ha estat àmpliament descrita quan les condicions són les esmentades anteriorment (Casamayor *et al.*, 2000, 2001; Gasol, 1988; Guerrero *et al.*, 1987; Pedrós-Alió i Guerrero, 1993).

VII.2 Anàlisi molecular

Amb l'objectiu principal de determinar si hi ha canvis genètics temporalment (intermostra) i espacialment (intramostra) en els diferents sistemes estratificats objecte d'estudi, els gens dels 16S ARNr procariòtics s'han amplificat per PCR i els patrons dels 16S ADNr-RFLP i 16S ADNr-DGGE resultants han estat analitzats i comparats.

El primer punt que es va haver de resoldre per a fer l'anàlisi molecular va ser trobar un mètode d'extracció de l'ADN que fos aplicable als diferents sistemes estratificats objecte d'estudi. Aquest mètode ha de ser eficaç a l'hora d'eliminar la presència de substàncies inhibidores de la PCR i, a la vegada, no resultar gaire agressiu perquè l'ADN no es fragmenti i pugui ser analitzat posteriorment amb les tècniques moleculars seleccionades per fer aquest estudi (Chandler *et al.*, 1997b; Jackson *et al.*, 1997; Moré *et al.*,

1994; Tebbe *et al.*, 1993; Tsai i Olson, 1992; Zhou *et al.*, 1996). En els tapissos microbians s'ha emprat un mètode directe d'extracció a causa de l'elevat grau de compactació que presenten els tapissos, produït per la mescla de les partícules del sòl i dels exopolímers excretats pels organismes que hi viuen. Als estanyols d'en Cisó i del Vilar també es va utilitzar aquest mètode per a fer més comparables els resultats obtinguts. Al llac Gran d'Estanya, i addicionalment als estanyols d'en Cisó i el Vilar, s'ha emprat un mètode d'extracció d'ADN indirecte basat en la separació prèvia de les cèl·lules mitjançant filtració, tal com s'ha descrit en molts treballs anteriors. Tot i utilitzar diferents mètodes d'extracció, directes i indirectes, l'ADN extret en totes les mostres dels sistemes estratificats estudiats presenta un elevat pes molecular, observant-se en forma d'una banda de 23 kb, i una integritat suficient per a amplificar els gens procariòtics dels 16S ARNr (Kuske *et al.*, 1997).

Posteriorment, es van amplificar per PCR els gens dels 16S ARNr procariòtics presents en tots els sistemes estratificats estudiats utilitzant encebadors dels dominis *Bacteria* i *Archaea*. Tal com podíem esperar, el domini *Bacteria* es va trobar homogèniament distribuït en totes les estacions de l'any i en totes les laminacions dels tapissos microbians i fondàries dels llacs. El domini *Archaea*, present en totes les estacions de l'any, es troba en la majoria de fondàries analitzades dels sistemes planctònics, fet que ja ha estat descrit per altres autors i que demostra una vegada més la gran versatilitat metabòlica d'aquest grup en els sistemes d'aigua dolça (Casamayor *et al.*, 2000, 2001; Cytryn *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2001). Aquest domini, en canvi, als tapissos microbians del delta de l'Ebre només es localitza en el sediment negre. En aquest cas, els membres del domini *Archaea* que viuen en els sistemes estratificats bentònics semblen estar adaptats només a unes condicions ambientals molt específiques.

Després de digerir els 16S ADNr bacterians amb els tres enzims de restricció tetramèrics d'alta freqüència de tall, la comparació del nombre total de fragments de restricció obtinguts en aquests sistemes estratificats mostra diferències espaciotemporals. En l'àmbit estacional, podem veure que als tapissos microbians del delta de l'Ebre i als estanyols d'en Cisó i el Vilar, el nombre total de fragments més gran s'observa, normalment, a les mostres d'hivern, on la temperatura i la llum incident no són tan elevades com en la resta d'estacions de l'any. En aquests ecosistemes, el nombre més baix es troba quan s'analitzen les mostres d'estiu, mentre que a la primavera i la tardor aquest presenta valors intermedis. Com que, en general, les condicions de temperatura i llum incident són més elevades a l'estiu, la supervivència de les poblacions bacterianes pot quedar afectada negativament o bé es pot afavorir el predomini de determinades poblacions, i això es pot reflectir en forma d'una davallada en el nombre total de fragments de restricció detectats. A diferència de la resta de sistemes estratificats, al llac Gran d'Estanya el nombre total de fragments de restricció detectats a l'estiu és superior al de l'hivern. En aquest llac, la intensitat de

llum incident i la temperatura de l'aigua són inferiors a les trobades habitualment en l'època estival, ja que una setmana abans del dia de mostreig el temps va estar ennuvolat i va ploure, i això podria haver afavorit el desenvolupament de diferents poblacions bacterianes.

En l'àmbit espacial, el nombre total de fragments de restricció obtinguts a la part superficial dels tapissos microbians i a l'estanyol del Vilar a l'estiu sol ser menor que a la resta d'estacions de l'any. Aquest fet podria ser degut a les condicions elevades de temperatura i de llum incident que es donen en aquesta època de l'any en aquests ecosistemes (Guerrero *et al.*, 1987; Martínez-Alonso, 1997; Mir, 1997). Com a conseqüència d'aquestes condicions, pot haver-hi un desplaçament en fondària de determinades poblacions bacterianes per a evitar danys o la mort (Castenholz i García-Pichel, 2000; Krekeler *et al.*, 1998; Kruschel i Castenholz, 1998), i això es reflecteix en una davallada quant al nombre total de fragments de restricció trobats en superfície. En canvi, tal com succeeix a l'estanyol d'en Cisó i al llac Gran d'Estanya, quan la temperatura no sobrepassa els 21 °C i el nivell de llum incident no és elevat, el nombre total de fragments de restricció que es troba en la superfície no és tan petit. Aquesta observació podria ser deguda al fet que la localització del primer, envoltat d'arbres alts que dificulten l'entrada de llum i produeixen molta ombra, no permet que l'aigua del llac arribi a temperatures tan elevades com les de l'estanyol del Vilar i al fet que en aquesta època de l'any al llac Gran d'Estanya les condicions meteorològiques van ser inusuals. Així doncs, veiem en tots els sistemes estratificats que determinats factors ambientals poden regular els moviments migratoris en fondària d'algunes poblacions bacterianes i, per tant, que aquests canvis poden ser detectats amb aquesta tècnica de caracterització genètica.

L'anàlisi comparativa dels patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians obtinguts en les diferents laminacions dels tapissos microbians del delta de l'Ebre i en les diferents fondàries als estanyols d'en Cisó i el Vilar han permès diferenciar-los estacionalment i espacialment, en funció de si la llum i l'oxigen són presents o no en les submostres i en funció de la temperatura de l'aigua. Al llac Gran d'Estanya, en canvi, la distribució estacional, sobretot, i l'espacial de les mostres no està tan ben definida com en la resta de sistemes estratificats. En aquest darrer llac, a més a més, es mostra un fet curiós, com és que els patrons dels 16S ADNr-RFLP bacterians trobats en la columna d'aigua en el període de barreja són gairebé idèntics als patrons detectats a la part més fonda en el període d'estratificació. Per aquesta raó, es va decidir aplicar una altra tècnica de caracterització genètica més moderna, com és la DGGE.

Un cop amplificades per PCR amb els encebadors universals del domini *Bacteria*, les seqüències parcials dels 16S ADNr bacterians presents al llac Gran d'Estanya es van separar per DGGE. Els patrons obtinguts en ambdós períodes de l'any van confirmar els resultats que s'havien obtingut prèviament per

PCR-RFLP, és a dir, una gran similitud entre els patrons del període de barreja i els de la part més fonda del llac en el període d'estratificació. Aquest fet determina que ambdues tècniques de caracterització genètica, tot i haver emprat encebadors diferents per al domini *Bacteria*, són vàlides per a detectar canvis en l'estructura genètica, tal com ja s'havia descrit en d'altres ecosistemes aquàtics (Acinas *et al.*, 1997; Casamayor *et al.*, 2000; Konopka *et al.*, 1999). Tot i això, cal destacar que també es troben marcades diferències quan es comparen el nombre de fragments de restricció i els patrons de bandes obtinguts per DGGE. Considerant que la diversitat bacteriana és determinada pel nombre de bandes obtingudes en els patrons dels 16S ADNr-DGGE (Muyzer *et al.* 1993, 1995), es va observar que quan la diversitat bacteriana augmenta, el nombre de fragments de restricció disminueix. Una de les possibilitats per a explicar aquesta relació inversa pot ser que els fragments de restricció generats a partir de bacteris que es troben a baixes concentracions no són visualitzats, com a conseqüència del tipus de gel i el mètode de tinció emprats, mentre que la DGGE ens permet detectar els fragments parcials dels 16S ADNr de poblacions bacterianes que representen tan sols un 1% del total (Muyzer *et al.*, 1999; Muyzer i Smalla, 1998). A més, l'elevat grau de conservació dels gens dels 16S ARNr determina que no puguem descartar que bacteris diferents, relacionats o no entre si filogenèticament, presentin els mateixos llocs de restricció i que, per tant, donin fragments d'una mateix mida, tal com també s'ha demostrat en l'experiment teoricopràctic descrit en el capítol V. Aquesta hipòtesi podria ser avalada pel fet que, encara que han estat poques les bandes escindides i seqüenciades a partir dels patrons dels 16S ADNr-DGGE, les seqüències obtingudes es troben majoritàriament afiliades dintre de quatre dels filums del domini *Bacteria*: *Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), *Proteobacteria* (classes α i β) i *Chlorobi*. Com a conseqüència d'això, els 16S ADNr detectats per DGGE i relacionats filogenèticament poden generar fragments de restricció idèntics (Urakawa *et al.*, 1997, 1998).

A part de la informació qualitativa obtinguda amb els mètodes de caracterització genètica, RFLP i DGGE, per primera vegada s'han obtingut dades quantitatives de les poblacions microbianes actives que es troben al llac Gran d'Estanya mitjançant l'aplicació de la FISH. No obstant això, i com a conseqüència de l'elevada proporció d'organismes fototròfics, i per tant autofluorescents, i la presència de partícules de naturalesa inorgànica, la informació obtinguda és parcial (Glöckner *et al.*, 1999; Tonolla *et al.*, 2000).

La FISH ens ha permès descriure canvis espaciotemporals de les poblacions microbianes. A més, s'ha detectat la presència en totes les fondàries i dies de mostreig d'un grup molt important en els sistemes aquàtics: el de β -*Proteobacteria* (Alfreider *et al.*, 1996; Battin *et al.*, 2001; Pernthaler *et al.*, 1998). També, s'ha detectat la presència del domini *Archaea* a la part més fonda del llac en el període d'estratificació i a tota la columna d'aigua en el de barreja. La comparació dels percentatges d'hibridació amb els patrons

dels 16S ADNr-RFLP i dels 16S ADNr-DGGE determinen que, tot i haver-hi diferències quantitatives, aquestes no es reflectissin qualitativament.

Els resultats obtinguts ha mostrat que la fracció de cèl·lules tenyida amb la sonda Eub338 respecte a la tenyida amb DAPI és molt baixa si es compara amb ecosistemes equivalents d'aigua dolça (Bosshard *et al.*, 2000). Això podria ser degut, entre d'altres coses, al fet que moltes de les cèl·lules autofluorescents d'origen bacterià no s'hagin tingut en compte a l'hora de determinar el percentatge total dels bacteris (Amann *et al.*, 1995a-b), la manca del lloc diana per a la sonda Eub338 en determinats bacteris planctònics aerobis (Zarda *et al.*, 1997); a la presència de bacteris amb un baix contingut ribosomal (Pernthaler *et al.*, 2002) o la difícil penetració de les sondes en determinats grups bacterians (Amann *et al.*, 1995a-b). També s'observà que l'aplicació de sondes poc específiques de grup pot subestimar alguns grups bacterians, com les *γ-Proteobacteria* (Nielsen *et al.*, 1999), i sobreestimar-ne d'altres, com les *Archaeas* (Battin *et al.*, 2001; Dang i Lovell, 2002; Pernthaler *et al.*, 2002).

Una vegada aplicades les diferents tècniques moleculars de caracterització genètica, l'anàlisi de les dades obtingudes es va fer a partir de les corresponents matrius binàries, obtingudes mitjançant l'anàlisi dels fragments de restricció i de les bandes presents o absents en els patrons dels 16S ADNr-RFLP i 16S ADNr-DGGE, respectivament. La similitud dels patrons va ser calculada amb el coeficient de Jaccard i les matrius de les distàncies obtingudes es van utilitzar per a aplicar el mètode d'agrupament jeràrquic UPGMA (Sneath i Sokal, 1973) i el mètode d'anàlisi mètric d'escala multidimensional MDS (Lessa, 1990). Els resultats obtinguts per ambdós mètodes és similar, i mostren una distribució clara en l'àmbit estacional de les diferents submostres analitzades en tots els sistemes estratificats estudiats, llevat del llac Gran d'Estanya. També cal dir que l'agrupament de les mostres, primàriament en funció de l'estacionalitat, mostra de forma secundària subgrups relacionats entre si per la presència o absència de llum i oxigen i per la temperatura de l'aigua en alguns dels ecosistemes estudiats. Així doncs, es demostra que determinats paràmetres poden influir de forma rellevant en la distribució en fondària de les poblacions bacterianes que poden establir-s'hi i, en conseqüència, dels patrons dels 16S ADNr-RFLP i 16S ADNr-DGGE obtinguts, tal com s'ha descrit en d'altres treballs (Acinas *et al.*, 1997; Àvila *et al.*, 1984; Gasol, 1988; Mir, 1997).

Malgrat la diferent base teòrica dels dos mètodes utilitzats, UPGMA i MDS, l'agrupament intramostra i intermostra presenta diferències molt petites. Així doncs, podem afirmar que el fet d'assumir linealitat entre les variables mesurades amb el mètode UPGMA no varia considerablement els resultats obtinguts quan s'analitzen mostres relacionades entre si amb variables no relacionades linealment (Lessa,

1990). A més, cal ressaltar que el mètode MDS és un mètode estadístic que representa espacialment la proximitat entre les diferents submostres, sovint en un espai de baixa dimensió, de manera que els resultats obtinguts són més fàcils d'interpretar.

Tot i la distribució estacional que presenten les mostres de tots els sistemes estratificats estudiats amb els mètodes UPGMA i MDS, llevat de les del llac Gran d'Estanya, l'anàlisi estadística comparativa del nombre total de fragments de restricció només mostra diferències significatives en l'àmbit estacional a l'estanyol del Vilar i als tapissos microbians. A més, cal ressaltar que l'anàlisi de la mitjana de fragments de restricció obtinguts en cadascuna de les fondàries determina que en els diferents sistemes estratificats planctònics estudiats hi hagi una disminució significativa a partir de 7 m de fondària. Aquestes observacions podrien ser degudes al fet que l'eix principal d'estructuració de la comunitat passa de ser la variació estacional a ser-ho en fondària en augmentar el grau d'estabilitat tèrmica del llac i, sobretot, quan apareix sulfur d'hidrogen, tal com descriuen altres autors (Àvila *et al.*, 1984; Bosshard *et al.*, 2000; Gasol, 1988). També, cal destacar que l'anàlisi comparativa de la mitjana del nombre de fragments obtinguts als estanyols d'en Cisó i el Vilar és estadísticament significativa, fet que podria passar a causa de l'origen limnològic i perquè les condicions biòtiques i abiòtiques que s'estableixen en ambdós llacs són diferents (Gasol *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1987; Murray *et al.*, 1996).

VII.3 16S ADNr-RFLP en poblacions bacterianes mixtes

Al mateix temps que es van analitzar les mostres de camp, es va desenvolupar un experiment teoricopràctic per a determinar si el nombre d'operons d'ADNr i el grau d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana podien influenciar la PCR i, per tant, els subsegüents patrons dels 16S ADNr-RFLP obtinguts a partir de poblacions bacterianes mixtes. D'una forma molt clara podem afirmar que un nombre alt d'operons d'ADNr permet una eficiència de detecció més gran de les poblacions bacterianes que els presenten, mentre que quan el grau d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana és menor, això implica una disminució d'aquesta. Així doncs, i com que els bacteris que més aviat s'adapten o creixen en un ecosistema són aquells que presenten un nombre alt d'operons d'ADNr, és molt probable que, emprant aquesta tècnica, s'estiguin descrivint, principalment, les poblacions bacterianes dominants (Klappenbach *et al.*, 2000). No obstant això, cal destacar que les poblacions bacterianes no dominants que presenten un nombre elevat d'operons poden ser detectades encara que es trobin a baixes concentracions en l'ecosistema estudiat i que les poblacions bacterianes no descrites fins al moment poden no ser detectades per la manca d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana, suposadament universals, que aquestes presenten.

VIII. Conclusions generals

Les conclusions principals que s'han extret de l'estudi realitzat en sistemes estratificats, un sistema estratificat bentònic (tapissos microbians del delta de l'Ebre) i tres de planctònics (els estanyols d'en Cisó i el Vilar, del sistema càrstic de Banyoles, i el llac Gran d'Estanya), mitjançant l'ús combinat de tècniques de microbiologia clàssiques (microscòpia i anàlisi dels paràmetres fisicoquímics) i moleculars (RFLP, DGGE i FISH), han estat les següents:

1. L'ús combinat de metodologies clàssiques (microscòpia òptica i anàlisi dels paràmetres fisicoquímics) i moleculars (RFLP, DGGE i FISH) ens ha permès obtenir una informació més completa dels sistemes estratificats estudiats, obviant algunes de les deficiències de cadascuna de les metodologies emprades per separat. S'ha demostrat que hi ha canvis espaciotemporals de l'estructura dels ecosistemes estudiats observables en l'àmbit molecular que no ho són macroscòpicament i microscòpicament i viceversa.
2. El domini *Bacteria* es troba en totes les mostres, laminacions i fondàries analitzades, mentre que el domini *Archaea* presenta una distribució més heterogènia (sediment negre als tapissos microbians del delta de l'Ebre, a la part anoxigènica de l'estanyol d'en Cisó, a les parts oxigènica i anoxigènica del Vilar i el llac Gran d'Estanya).
3. La complexitat dels 16S ADNr-RFLP tendeix a augmentar en fondària en totes les mostres analitzades, llevat de la mostra d'estiu, on mostra normalment un comportament invers. La detecció en determinades laminacions o fondàries de fragments de restricció específics i fragments de restricció comuns en totes les laminacions d'una mateixa mostra ens indica que algunes poblacions dominants es troben en profunditats específiques i d'altres al llarg de tot el perfil vertical dels sistemes estratificats estudiats. A més, l'anàlisi dels 16S ADNr-RFLP obtinguts a partir de mostres idèntiques mitjançant centrifugació o filtració demostra que els patrons són idèntics, cosa que permet assegurar que la metodologia utilitzada no afecta els resultats obtinguts amb aquesta tècnica. Cal destacar que el nombre total de fragments de restricció observats és similar quan es comparen tots els sistemes estratificats planctònics, a pesar de tenir origen limnològic i condicions biòtiques i abiòtiques diferents.
4. La comparació dels 16S ADNr-RFLP de totes les laminacions i fondàries, mitjançant l'anàlisi de similitud amb els mètodes UPGMA i MDS, mostra una distribució de tipus estacional. No obstant això, i a pesar que la distribució estacional és la més acusada, també es detecta un cert component estructurador de tipus fisiològic degut, principalment, a la presència o absència de llum, oxigen i sulfur d'hidrogen. Els mapes MDS obtinguts a partir de l'anàlisi dels patrons dels RFLP i de DGGE

demostren que les submostres de la part més fonda del llac Gran d'Estanya i les mostres de tota la columna d'aigua a l'hivern realment s'assemblaven molt entre si, independentment de tenir paràmetres fisicoquímics molt diferents. A més, els patrons obtinguts per DGGE i analitzats per MDS són més discriminatoris, ja que ens permeten diferenciar algunes mostres entre si i no diferenciades mitjançant l'anàlisi dels RFLP.

5. L'estimació teòrica duta a terme ens determina que el factor d'amplificació de la PCR i, per tant, la detecció dels 16S ADNr-RFLP dels quatre bacteris emprats depèn del nombre de còpies dels gens del 16S ARNr i del grau d'homologia entre els encebadors i les seves seqüències diana, localitzades en les regions conservades d'aquests gens. Els factors d'amplificació teòrics més grans s'obtenen per a *B. cereus* ATCC 10876 (dotze operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors), les més petites per a *R. sphaeroides* 2.4.1 (tres operons i un 84.2% d'homologia per a ambdós encebadors), i les intermèdies i similars s'obtenen per a *E. coli* K-12 (set operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors) i *S. typhimurium* LT2 (set operons i un 100% d'homologia per a ambdós encebadors). A més, un cop analitzats experimentalment els 16S ADNr-RFLP de les soques bacterianes emprades durant l'estudi, els resultats obtinguts corroboren les prediccions dutes a terme teòricament.
6. El percentatge mínim de cadascun dels bacteris presents en les mescles indicades o límit inferior de detecció per anàlisi dels RFLP són: mescla d'*E. coli* K-12 i *R. sphaeroides* 2.4.1., 2% i 70%; mescla d'*E. coli* K-12 i *B. cereus* ATCC 10876, 2% per a ambdós; mescla de *R. sphaeroides* 2.4.1. i *B. cereus* ATCC 10876, 90% i 2%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *E. coli* K-12, 30% i 5%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *R. sphaeroides* 2.4.1., 2% i 70%; mescla de *S. typhimurium* LT2 i *B. cereus* ATCC 10876, 2% per a ambdós.
7. Igual que la predicció teòrica, els resultats experimentals demostren que els RFLP dels gens dels 16S ARNr amplificats per PCR estan altament influenciats pel nombre d'operons d'ADNr i pel mal aparellament entre els encebadors i les seves seqüències diana, i ambdós factors contribueixen significativament a l'hora d'obtenir els perfils genètics de les soques bacterianes analitzades. Un nombre alt d'operons d'ADNr permet una eficiència de detecció molt gran, i un grau d'homologia menor entre els encebadors i les seves seqüències diana implica una disminució d'aquesta. Així doncs, els bacteris que presenten un nombre més baix d'operons i un major *mismatch* dels encebadors poden estar infravalorats.

8. Els resultats experimentals obtinguts quan s'analitzen les diferents mescles bacterianes mostren el baix poder discriminatori de la tècnica a l'hora de diferenciar bacteris molt relacionats filogenèticament. Per aquesta raó, cal emprar dos o més enzims de restricció per obtenir RFLP específics i discriminatoris.
9. Durant el període de barreja, l'anàlisi microscòpica de la columna d'aigua del llac Gran d'Estanya ha permès detectar els bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre a molt baixes concentracions en les fondàries més properes al sediment del llac (W14-16,5 m), on la concentració d'oxigen és de 4-5 mg O₂ ml⁻¹. D'altra banda, la manca de detecció de seqüències relacionades amb els bacteris fototròfics anoxigènics rojos del sofre per DGGE en la part més fonda del llac en el període d'estratificació, l'observació macroscòpica de la coloració roja de l'aigua entre 10-12 m de fondària a l'estiu al llac Gran d'Estanya i l'observació microscòpica de cèl·lules que acumulen glòbuls de sofre intracel·lular de la família *Chromatiaceae* ens corroboren la importància de combinar metodologies per obtenir la màxima informació del sistema estudiat.
10. El grau de similitud entre les bandes de DGGE extretes, seqüenciades i identificades i les presents en la base de dades va ser de $\geq 93\%$. Les seqüències obtingudes es troben majoritàriament afiliades dintre de quatre dels filums del domini *Bacteria*: *Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), *Proteobacteria* (classes α i β) i *Chlorobi*. Relacionada amb un increment del nombre de bandes visualitzades en els patrons de DGGE, la diversitat bacteriana del sistema és superior en la part més fonda del llac a l'estiu que a la resta de fondàries i èpoques de l'any. L'anàlisi de les seqüències obtingudes demostra que les diferències espacials són degudes a variacions dels grups bacterians dominants (*Cyanobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, α -*Proteobacteria*) detectats en cada fondària del llac. En canvi, les diferències estacionals existents són degudes, principalment, a l'aparició del grup β -*Proteobacteria* a l'hivern (W16,5m) i a l'aparició de *Chlorobi* a l'estiu (Su10-12m).
11. Mitjançant l'ús de la FISH s'obté informació quantitativa dels bacteris actius presents en tota la columna d'aigua, però aquesta, en el nostre cas, es troba limitada per la presència d'una elevada fracció de cèl·lules autofluorescents (38-43%) i per la presència de partícules de naturalesa inorgànica. Les diferències espacials i estacionals detectades per la FISH estan relacionades amb les variacions de les concentracions dels grups α -, β - i γ -*Proteobacteria*. A pesar de ser molt comuna la presència de β -*Proteobacteria* en comunitats planctòniques en les mostres lacustres, aquestes no sembla que

siguin predominants al llac Gran d'Estanya. A més, els bacteris sulfatoreductors es localitzen en tota la columna d'aigua, però la seva presència és majoritària en les capes més fondes.

I X. Bibliografia

Referències

- Aagot N, Nybroe O, Nielsen P, Johnsen K (2001) An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5233-5239.
- Abellà C (1980) Dinàmica poblacional comparada de bacterias fotosintéticas planctónicas. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Abellà C, Montesinos E, Guerrero R (1980) Field studies on the competition between purple and green sulfur bacteria for available light (Lake Cisó, Spain). En: M. Dokulil, H. Metz and Jewson (eds.). *Shallow lakes. Contribution to their limnology.* Developments in Hydrobiology, vol. 3. Dr. W. Junk by Publishers, La Haia, Holanda, 173-181.
- Acinas S, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 27-40.
- Acinas S, Antón J, Rodríguez-Valera F (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 514-522.
- Achenbach L, Carey J, Madigan M (2001) Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2922-2926.
- Alfonso M, Miracle R (1987) Variación temporal de las poblaciones zooplanctónicas de una cubeta meromictica y de una laguna anóxica del sistema cárstico de Banyoles. *Act. IV Cong. Esp. Limnol. (Sevilla)*, p. 116-122.
- Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Satter B, Glöckner F, Wille A, Psenner R (1996) Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2138-2144.
- Al-Thukair A, Al-Hinai K (1993) Preliminary damage assessment of algal mats sites located in the western Gulf following the 1991 oil spill. *Mar. Pollut. Bullet.* 27, 229-238.
- Amann R, Krumholz I, Stahl D (1990) Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762-770.
- Amann R, Springer S, Ludwig W, Görtz H, Schleifer K (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* 351, 161-164.
- Amann R (1995) *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. En: *Molecular microbial ecology manual.* Akkermans A, Van Elsland J, De Bruijn F (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Londres, 3.3.6, 1-15.
- Amann R, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Amann R, Glöckner F, Neef A (1997) Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 191-200.
- Amann R, Kühl M (1998) In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 352-358.
- Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R (2000) Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3052-3057.
- Arabie P, Maschmayer (1988) Some current methods for the perception and judgment of risk. *Organizational Behavior and Human Decision Processes* 41, 300-329.

- Ávila A, Burrell J, Domingo A *et al.*, (1984) Limnología del lago Grande de Estaña (Huesca). *Oecol. Aquat.* 7, 3-24.
- Awramik S (1984) Ancient stromatolites and microbial mats. En: *Microbial mats stromatolites*. Cohen Y, Castenholz R i Halvorson H (ed.). Alan R. Liss. Nova York. p. 1-22.
- Barns S, Delwiche C, Palmer J, Pace N (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9188-9193.
- Bateson M, Ward D (1995) Methods for extracting DNA from microbial mats and cultivated micro-organisms: high molecular weight DNA from French press lysis. *Molecular Microbial Ecol. Manual* 1.1.4, 1-7.
- Battin T, Wille A, Sattler B, Psenner R (2001) Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 799-807.
- Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P (2000) Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1544-1552.
- Bauld J (1984) Microbial mats in marginal marine environments: Shark Bay, Western Australia, and Spencer Gulf, South Australia. En: *Microbial mats: stromatolites*. Cohen Y, Castenholz R, Halvorson H (ed.). Alan R. Liss. Nova York. p. 39-58.
- Bebout B, Garcia-Pichel F (1995) UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4215-4222.
- Bender J, Washintong J, Graves B, Phillips P, Abotsi G (1994) Deposit of zinc and manganese in an aqueous environment mediated by microbial mats. *Water, Air and Soil Pollution* 75, 195-204.
- Blanc M, Marilley L, Beffa T, Aragno M (1997) Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1246-1248.
- Blum S, Lorenz M, Wackernagel W (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 513-521.
- Bodelier P, Libochant J, Blom C, Laanbroek H (1996) Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4100-4107.
- Borneman J, Skroch P, O'Sullivan K, Palus J, Rumjanek N, Jansen J, Nienhuis J, Triplett E (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1935-1943.
- Bosshard P, Stettler R, Bachofen E (2000a) Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic Lake Cadagno. *Arch. Microbiol.* 174, 168-174.
- Bosshard P, Santini Y, Gruter D, Stettler R, Bachofen R (2000b) Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 173-182.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bradley P, Chapelle F, Lovley D (1998) Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3102-3105.
- Brinkhoff T, Muyzer G (1997) Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3789-3796.
- Brinkhoff T, Muyzer G (1998) A polyphasic approach to study the diversity and vertical distribution of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* species in coastal sediments of the German Wadden Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4650-4657.
- Broch-Due M, Ormerod J, Strand F (1978) Effect of light intensity on vesicles formation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.* 116, 269-274.

- Brosius M, Dull T, Sleeter D, Noller H (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127.
- Brugada D, Montesinos E (1986) Función detoxificadora de sulfhídrico de la comunidad fototrófica de la laguna del Vilar (Banyoles). *Actas IV Cong. Esp. Limnol.* (Sevilla), p. 95-104
- Brune A, Frenzel P, Cypionka H (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 691-710.
- Buckley D, Graber J, Schmidt T (1998) Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4333-4339.
- Bull A, Goodfellow M, Staler J (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 219-252.
- Bull A, Ward A, Goodfellow M (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573-606.
- Busse H, Denner E, Lubitz W (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* 47, 3-38.
- Caraco N, Puccoon A (1986) The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll a in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 31, 889-893.
- Carpenter L., Kennedy A, Reganold J (1998) Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4062-4064.
- Carsten J, Rasmussen O (1992) Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2458-2462.
- Casamayor E, Schafer H, Bañeras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 499-508.
- Casamayor E, Mas J, Pedrós-Alió C (2001a) In situ assessment on the physiological state of purple and green bacteria through the analyses of pigment and 5S rRNA content. *Microb. Ecol.* 42, 427-437.
- Casamayor E, Muyzer G, Pedrós-Alió C (2001b) Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microb. Ecol.* 25, 237-246.
- Casamayor E, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R (2002) Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1706-1714.
- Castenholz R, Garcia-Pichel F (2000) Cyanobacterial responses to UV-radiation. En: *The ecology of Cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Whitton B, Potts M (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 591-611
- Caumette P, Matheron R (1989) Les eaux rouges bactériennes. En: *Microorganismes dans le écosystemes océaniques*. Bianchi M, Marty D, Bertrand J, Caumette P, Gauthier M (ed.), p. 411-443.
- Cohen Y (1989) Photosynthesis in cyanobacterial mats and its relation to the sulphur cycle: a model for microbial sulfur interactions. En: *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*. Cohen Y, Rosenberg E, (ed.). American Society for Microbiology. Washington DC, p. 22-36.
- Coolen M, Overmann J (1998) Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4513-4521.
- Cowan D (2000) Microbial genomes--the untapped resource. *Trends of biotechnol.* 18, 14-16.
- Cytryn E, Minz D, Oremland R, Cohen Y (2000) Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a

- hypersaline stratified lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3269-3276.
- Chandler D, Fredrickson K, Brockman F (1997a) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* 6, 475-482.
- Chandler D, Schreckhise R, Smith J, Bolton H (1997b) Electroelution to remove humic compounds from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods.* 28, 11-19.
- Chang Y, Stephen J, Richter A, Venosa A, Bruggemann J, Macnaughton S, Kowalchuk G, Haines J, Kline E, White D (2000) Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J. Microbiol. Methods* 40, 19-31.
- Cho J, Tiedje J (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3677-3682.
- D'Amelio E, Cohen Y, Des Marais D (1987) Association of a new type of gliding filamentous purple phototrophic bacterium inside bundles of *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline cyanobacterial mats. *Arch. Microbiol.* 147, 213-220.
- Dang H, Lovell C (2002) Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 496-504.
- De Bruijn F (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2180-2187.
- De Vos P, De Ley J (1983) Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 487-509.
- De Wit R, Van Gernerden H (1989) Growth and metabolism of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* under combined light/dark and oxic/anoxic regimens. *Arch. Microbiol.* 154, 459-464.
- Degrange V, Bardin R (1995) Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2093-2098.
- Dennis L (1998) Introduction to the polymerase chain reaction. En: *Clinical applications of PCR*. Ed. Dennis Lo. Humana Press Inc. Nova Jersey. EUA.
- Devereux R, Kane M, Winfrey J, Stahl A (1992) Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 610-619.
- Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh T, Massana R (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2942-2951.
- Dojka M, Hugenholtz P, Haack S, Pace N (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3869-3877.
- Dojka M, Harris J, Pace N (2000) Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1617-1621.
- Drozanski W (1991) *Sarcobium lyticum* gen nov. sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 82-87.
- Duineveld B, Kowalchuk G, Keijzer A, Van Elsas J, Van Veer J (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 172-178.
- Dyer B, Gaju N, Pedrós-Alió C, Esteve I, Guerrero R (1986) Ciliates from a fresh water sulfuretum. *Biosystems* 19, 127-135.
- Engelen B, Meinken K, Wintzingerode F, Heuer H, Malkomes H, Backhaus H (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting

- in addition to conventional testing procedures. *App. Environ. Microbiol.* 64, 2814-2821.
- Eschenfeldt W, Stols L, Rosenbaum H, Khambatta Z, Quate-Randall E, Wu S, Kilgore D, Trent J, Donnelly M (2001) DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. *App. Environ. Microbiol.* 67, 4206-4214.
- Esteve I, Abellà C, Guerrero R (1981) Identificació i estudi poblacional de bacteris fototròfics a l'estanyol de Cisó (Banyoles) Aplicació de tècniques de microscòpia electrònica. *Butll. Soc. Cat. Biol.* V-VI, 29-38.
- Esteve I, Guerrero R, Montesinos E, Abellà C (1983) Electron microscopy study of the interaction of epibiotic bacteria with *Chromatium minus* in natural habitats. *Microb. Ecol.* 9, 57-64.
- Esteve I, Mir J, Gaju N, McKhann H, Margulis L (1989) Green endosymbiont of *Coleps* from Lake Cisó identified as *Chlorella vulgaris*. *Symbiosis* 6, 197-200.
- Esteve I, Montesinos E, Mitchell J, Guerrero R (1990) A quantitative ultrastructural study of *Chromatium minus* in the bacterial layer of Lake Cisó (Spain). *Arch. Microbiol.* 153, 316-323.
- Esteve I, Ceballos D, Martínez-Alonso M, Guerrero G (1992) Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain: a preliminary study. *Limnetica.* 8, 185-195.
- Esteve I, Ceballos D, Martínez-Alonso M, Gaju N, Guerrero R (1994) Development of versicoloured microbial mats: succession of microbial communities. En: Structure, development and environmental significance. Stal LJ, Caumette (ed.). NATO ASI Series, Vol G 35. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 415-420.
- Fantroussi S, Verschuere L, Verstraete W, Top E (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *App. Environ. Microbiol.* 65, 982-988.
- Farrelly V, Rainey A, Stackebrandt E (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *App. Environ. Microbiol.* 61, 2798-2801.
- Ferris M, Muyzer G, Ward D (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *App. Environ. Microbiol.* 62, 340-346.
- Ferris M, Ward D (1997) Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat community examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *App. Environ. Microbiol.* 63, 1375-1381.
- Fox G, Pechman K, Woese C (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 44-57.
- Fründ C, Cohen J (1992) Diurnal cycles of sulfate reduction under oxi conditions in microbial mats. *App. Environ. Microbiol.* 58, 70-77.
- Fuchs B, Glöckner F, Wulf J, Amann R (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *App. Environ. Microbiol.* 66, 3603-3607.
- Fuhrman J, Comeau D, Hagström A, Chan A (1988) Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *App. Environ. Microbiol.* 54, 1426-1429.
- Gaju N (1987) Estudios ecológicos de microorganismos depredadores de *Chromatiaceae*. Caracterización morfológica y fisiológica de *Daptobacter*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Gaju N, Esteve I, Guerrero R (1992) Distribution of predatory bacteria that attack Chromatiaceae in a sulfurous lake. *Microb. Ecol.* 24, 171-179.
- García de Emiliani M (1973) Fitoplancton de la laguna del Vilà (Gerona) *Oecol. Aquat.* 1, 107-155.
- García-Cantizano J (1988) Fraccionamiento de la productividad primaria en un ecosistema microbiano: fotosíntesis oxigénica, fotosíntesis anoxigénica y fijación a oscuras. Treball de 3r cicle. Dpt. Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona.

- García-Cantizano J (1992) Análisis funcional de la comunidad microbiana en ecosistemas plantónicos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- García-Gil J, Brunet R, Montesinos E, Abellà C (1985) Estudi comparatiu de l'evolució de la morfometria dels estanyols de la Riera Castellana (Banyoles): Estanyol Nou, Cisó i brollador. *Scientia Gerundensis* 11, 81-90.
- García-Gil J, Borrego C, Bañeras L, Abellà C (1993) Dynamics of phototrophic microbial populations in the chemocline of a meromictic basin of Lake Banyoles. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 78, 283-294.
- García-Pichel F, Castenholz R (1991) Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* 27, 395-409.
- García-Pichel F, Castenholz R (1994a) On the significance of solar ultraviolet radiation for the ecology of microbial mats. En: *Microbial mats. Structure, development and environmental significance*. Stal L, Caumette P (ed.). NATO ASI Series. Springer-Verlag. Berlín. 35, 77-84.
- García-Pichel F, Mechling M, Castenholz R (1994b) Diel migrations of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1500-1511.
- García-Pichel F, Kuhl M, Nubel U, Muyzer G (1999) Salinity-dependent limitation of photosynthesis and oxygen exchange in microbial mats. *J. Phycol.* 35, 227-238.
- Gasol J (1988) Ecologia microbiana a l'estanyol d'en Cisó. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Gasol J, Mas J, Pedrós-Alió C, Guerrero R (1990) Ecología microbiana y limnología en la laguna Cisó: 1976-1989. *Scientia Gerundensis* 16, 155-178.
- Gasol J, García-Cantizano J, Massana R, Peters F, Guerrero R, Pedrós-Alió C (1991a) Diel changes in the microstratification of the metalimnetic community in Lake Cisó. *Hydrobiol.* 211, 227-240.
- Gasol J, Pedrós-Alió C (1991b) On the origin of deep algal maxima: the case of Lake Cisó.-*Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24, 1024-1028.
- Gasol J, Peters F, Guerrero R, Pedrós-Alió C (1992) Community structure in Lake Cisó: Biomass allocation to trophic groups and differing patterns of seasonal succession in the meta- and epilimnion. *Arch. Hydrobiol.* 123, 275-303.
- Gich F, Amer E, Figueras J, Abellà C, Balaguer M, Poch M (2000) Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Int. Microbiol.* 3, 103-106.
- Gich F, García-Gil J, Overmann J (2001) Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.* 177, 1-10.
- Gillan D, Argen G, Zwart G, Ridder C (1998) Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* 64, 3464-3472.
- Giuliano L, Domenico M, Domenico E, Höfle M, Yakimov M (1999) Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb. Ecol.* 37, 77-85.
- Glöckner F, Fuchs B, Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721-3726.
- Glöckner F, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5053-5065.
- Gordon D, Giovannoni S (1996) Detection of stratified microbial populations related to *Chlorobium* and *Fibrobacter* species in the Atlantic and Pacific oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1171-1177.

- Gordon D, Priscu J, Giovannoni S (2000) Distribution and phylogeny of bacterial communities associated with mineral particles in Antarctic lake ice. *Microb. Ecol.* 39, 197-202.
- Görtz H (1986) Endonucleobiosis in ciliates. *Int. Rev. Cytol.* 102, 169-213.
- Grant J, Gust G (1987) Prediction of coastal sediment stability from photopigment content on mats of purple sulphur bacteria. *Nature* 330, 244-246.
- Gregori G, Citterio S, Ghiani A, Labra M, Sgorbati S, Brown S, Denis M (2001) Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nuclei acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4662-4670.
- Grey B, Steck T (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5325-5327.
- Guerrero R, Abellà C (1978) Dinámica espaciotemporal de las poblaciones bacterianas fotosintéticas en una laguna anaerobia de aguas sulfurosas. *Oecol. Aquat.* 3, 193-205.
- Guerrero R, Montesinos E, Esteve I, Abellà C (1980) Physiological adaptation and growth of purple and green sulfur bacteria in a meromictic lake (Vilà) as compared to a holomictic lake (Cisó). En: M. Dokulil, H. Metz, Jewson (ed.). *Shallow lakes. Contribution to their limnology. Developments in Hydrobiology*, vol. 3. Dr. W. Junk by Publishers, La Haia, Holanda, p. 161-171.
- Guerrero R, Montesinos E, Pedrós-Alió C, Esteve I, Mas J, van Gemerden H, Hofman P, Bakker J (1985) Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* 30, 919-931.
- Guerrero R, Pedrós-Alió C, Esteve I, Mas J, Chase D, Margulis L (1986) Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2138-2142.
- Guerrero R (1987) Lagos cársticos españoles: la zona lacustre de Banyoles y Sant Miquel de Campmajor. Seminario FAST Comunidad Europea CSIC, p. 65-77.
- Guerrero R, Pedrós-Alió C, Esteve I, Mas J (1987) Communities of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. *Acta Academiae Aboensis* 47, 125-151.
- Guerrero R, Urmeneta J, Rampone J (1993a) Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta, Spain. *BioSystems.* 31, 135-144.
- Guerrero R, Ashen J, Solé M, Margulis L (1993b) *Spirosymplokos deltaeiberi* nov. gen., nov. sp.: variable-diameter composite spirochete from microbial mats. *Arch. Microbiol.* 160, 461-470.
- Guerrero R, Hasselton A, Solé M, Wier A, Margulis L (1999) *Titanospirillum velox*: a huge, speedy, sulphur-storing spirillum from Ebro Delta microbial mats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11584-11588.
- Gulledge J, Ahmad A, Steudler P, Pomerantz W, Cavanaugh C (2001) Family- and genus-level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4726-4733.
- Gürtler V, Stanisich (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3-16.
- Guyoneaud R, Borrego C, Martínez-Planells A, Buitenhuis E, García-Gil J (2001) Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*: changes in prosthecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.* 176, 278-284.
- Hahn D, Kester R, Starrenburg M, Akkermans A (1990) Extraction of ribosomal RNA from soil for detection of *Frankia* with oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 154, 329-335.
- Hahn D, Amann R, Ludwig W, Akkermans A, Schleifer K (1992) Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 138, 879-88.
- Hansen M, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S (1998) Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 141-149.

- Head I, Saunders J, Pickup R (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35, 1-21.
- Helms C (1990) Method: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).
- Herbert D, Phipps P, Strange R (1971) Chemical analysis of microbial cells. En: Norris J, Ribbons B (ed.). Academic Press, Londres. *Methods Microbiol.* 5B, 209-344.
- Hiorns W, Hastings R, Head I *et al* (1995) Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrosospiras* in the environment. *Microbiology* 141, 2793-2800.
- Hiraishi A, Umezawa T, Yamamoto H, Kato K, Maki Y (1999) Changes in quinone profiles of hot spring microbial mats with a thermal gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 198-205.
- Höfle M, Haas H, Dominik K (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in an eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3164-3174.
- Holben W, Harris D (1995) DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.* 4, 627-631.
- Holben W, Jansson J, Cheim B, Tiedje J (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711.
- Hoppe H (1978) Relations between active bacteria and heterotrophic potential in the sea. *Neth. J. Sea Res.* 12, 78-98.
- Horz H, Tchawa M, Liesack W (2001) Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4177-4185.
- Hugenholtz P, Goebel B, Pace N (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774 (Erratum, 180, 6793)
- Hughes J, Hellmann J, Ricketts T, Bohannon B (2001) Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4399-4406.
- Humphry G, Wootton I (1966) Comparison of the techniques used in the determination of phytoplankton pigments. Report SCOR-UNESCO. Paris.
- Hurt R, Qiu X, Wu L, Roh Y, Palumbo A, Tiedje J, Zhou J (2001) Simultaneous recovery of RNA and DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4495-4503.
- Innis M, Gelfand D (1990) Optimization of PCRs. En PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.). Academic Press, Inc. San Diego, CA. EUA.
- Ishii K, Fukui M (2001) Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3753-3755.
- Jackson C, Harper J, Willoughby D, Roden E, Churchill P (1997) A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4993-4995.
- Jacobsen C, Rasmussen O (1992) Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2458-2462.
- Jacobsen C (1995) Extraction of bacterial DNA from soil and detection and quantification of microbial DNA sequences by Southern- and dot/slot blot hybridization. *Molecular Microbial Ecol. Manual* 1.1.4, 1-7.
- Jannasch A, Taylor C (1984) Deep sea microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 487-514.
- Jensen S, Ovreås L, Daae F, Torsvik V (1998) Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE

- separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. FEMS Microbiol. Ecol. 26, 17-26.
- Jensen T, Sicko L (1971) Fine structure of poly- β -hydroxybutyrate acid granules in a blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. J. Bacteriol 106, 683-686.
- Johnston W, Stapleton R, Saylor G (1996) Direct extraction of microbial DNA from soils and sediments. Molecular Microbial Ecology Manual 1.3.2, 1-9.
- Jorgensen B (1982) Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 298, 543-561.
- Jorgensen B (1989) Light penetration, absorption, and action spectra in cyanobacterial mats. En: Microbial mats, physiological ecology of benthic microbial communities. Cohen Y, Rosenberg E (ed.). American Society for Microbiology. Washington DC, p. 123-137.
- Jorgensen B, Cohen Y, Revsbech N (1986) Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in a *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mat. Appl. Environ. Microbiol. 51, 408-417.
- Jorgensen B, Nelson D (1988) Bacterial zonation, photosynthesis, and spectral light distribution in hot spring microbial mats of Iceland. Microbiol. Ecol. 16, 133-147.
- Jurgens G, Lindstrom K, Saano A (1997) Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. Appl. Environ. Microbiol. 63, 803-805.
- Kehrmeyer S, Applegate B, Pinkart H, et al (1996) Combined lipid/DNA extraction method for environmental samples. J Microbiol Methods 25, 153-163.
- Kidd K, Ruano G (1995) Optimizing PCR. En PCR: A practical approach. McPherson M, Hames B, Taylor G (ed). Oxford University Press. Regent Unit.
- Klappenbach J, Dunbar J, Schmidt T (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1328-1333.
- Kondratieva E, Pfennig N, Trüper H (1992) The phototrophic prokaryotes. En: The Prokaryotes. Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer K (ed.). Springer-Verlag. Nova York, p. 312-330.
- Konopka A, Bercot T, Nakatsu C (1999) Bacterioplankton community diversity in a series of thermally stratified lakes. Microb. Ecol. 38, 126-135.
- Kowalchuk G, Stephen J, de Boer W, Prosser J, Embley T (1997) Analysis of ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1489-1497.
- Kowalchuk G, Bodelier P, Heilig G, Stephen J, Laanbroek H (1998) Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. FEMS Microbiol. Ecol. 27, 339-350.
- Krekeler D, Teske A, Cypionka H (1998) Strategies of sulphate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. FEMS Microbiol. Ecol. 25, 89-96.
- Kruschel C, Castenholz R (1998) The effect of solar UV and visible irradiance on the vertical movements of cyanobacteria in microbial mats of hypersaline waters. FEMS Microbiol Ecol 27, 53-72.
- Kuske C, Barns S, Busch J (1997) Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3614-3621.
- Lai-King N, Kingombe I, Yan W, Taylor D, Hiratsuka K, Malik N, Garcia M (1997) Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4558-4563.
- LaRiviere J, Schmidt K (1991) Morphologically conspicuous sulfur-oxidizing eubacteria. En: Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder

- W, Schleifer K (ed.). The Prokaryotes, 2a ed. Springer-Verlag. Nova York, p. 3934-3947.
- Lazo G, Roffey R, Gabriel D (1987) Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37, 214-221.
- Lee S, Fuhman J (1990) DNA hybridization to compare species composition of natural bacterioplankton assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 739-746
- Lee S, Malone C, Kemp P (1993) Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 193-201.
- Lee S, Bollinger J, Bezdicek D, Ogram A (1996) Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3787-3793.
- Leff L, Dana J, McArthur J, Shimkets L (1995) Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1141-1143.
- Lessa E (1990) Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Syst. Zool.* 39, 242-252.
- Lewis W, Frost T, Morris D (1986) Studies of planktonic bacteria in Lake Valencia, Venezuela. *Arch. Hydrobiol.* 106, 289-305.
- Liesack W, Weyland H, Stackebrandt E (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* 21, 191-198.
- Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J *et al.* (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19, 554-568.
- Lyra C, Hantula J, Vainio E, Rapala J, Rouhiainen L, Sivonen K (1997) Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Arch. Microbiol.* 168, 176-184.
- Macarrón, B. (1998) Utilización de marcadores lipídicos en el estudio de la biomasa, la estructura y el estado nutricional de las comunidades de los tapices microbianos del Delta del Ebro. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- MacGregor B (1999) Molecular approaches to the study of aquatic microbial communities. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 220-224.
- MacGregor B, Moser D, Baker B, Alm E, Maurer M, Neelson K, Stahl D (2001) Seasonal and spatial variability in Lake Michigan sediment small-subunit rRNA concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3908-3922.
- Madigan M, Martinko J, Parker J (1997) *Brock Biology of Microorganisms*. 8th ed. Prentice Hall, Inc. Simon & Schuster International Group, Regne Unit.
- Maidak B, Cole J, Lilburn T, Parker C, Saxman P, Stredwick J, Garrity G, Li B, Olsen G, Pramanik S, Schmidt T, Tiedje J (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28, 173-174.
- Manz W, Amann R, Ludwig M, Wagner M, Schleifer (1992) Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- Manz W, Eisenbrecher M, Neu T, Szewzyk U (1998) Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 43-61.
- Marchesi J, Sato T, Weightman A, Martin T, Fry J, Hiom S, Wade W (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795-799 (Errata 64, 2333).

- Margalef R (1946) Materiales para el estudio del lago de Bañolas. Publ. Inst. Biol. Apl. 1, 27-28.
- Marsh T, Saxman P, Cole J, Tiedje J (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3616-3620.
- Martínez A, Pibernat I, Figueras J, Gracia-Gil J (1997) Structure and composition of freshwater microbial mats from a sulfur spring ("Font Pudosa", NE Spain). Microbiología SEM 13, 45-56.
- Martínez-Alonso, M. (1997) Estudio comparativo de los ecosistemas bentónicos estratificados de la zona mediterránea de la Península Ibérica. Caracterización ecofisiológica de los tapetes microbianos del Delta del Ebro. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Martínez-Murcia A, Acinas S, Rodríguez-Valera F (1995) Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. FEMS Microbiol. Ecol. 17, 247-256.
- Mas J (1982) Sucesión de bacterias planctónicas en un sistema anaeróbico de baja diversidad. Tesina de llicenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Mas-Castellà J (1991) Acumulació de poli- β -hidroxialcanoats per bacteris. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Massana R, Pedrós-Alió C (1993) The role of anaerobic ciliates in planktonic food webs: abundance, feeding, and impact on bacteria in the field. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1325-1334.
- Massana R, DeLong E, Pedrós-Alió C (2000) A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1706-1714.
- McGrath S, Chaudri A, Giller K (1995) Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. J. Industr. Microbiol. 14, 94-104.
- McSpadden B, Weller D (2001) Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4414-4425.
- Méndez-Álvarez S, Esteve I, Guerrero R, Gaju N (1996) Genomic analysis of different *Chlorobium* strains by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 1177-1179.
- Méndez-Álvarez S, Esteve I, Guerrero R, Gaju N (1998) RAPD fingerprinting of *Chlorobium* strains. Syst. Appl. Microbiol. 21, 274-278.
- Miller J (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Nova York.
- Minz D, Flax J, Green S, Muyzer G, Cohen Y, Wagner M, Rittman B, Stahl D (1999a) Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4666-4671.
- Minz D, Fishbain S, Green S, Muyzer G, Cohen Y, Rittman B, Stahl D (1999b) Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in a contrast to a eukaryotic preference for anoxia. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4659-4665.
- Mir J, Martínez-Alonso M, Esteve I, Guerrero G (1991) Vertical stratification and microbial assemblage of a microbial mat in the Ebro Delta (Spain). FEMS Microbiol. Ecol. 86, 59-68.
- Mir J (1997) El cicle biogeoquímic del sofre en ecosistemes estratificats. Paper dels compostos de sofre inorgànic. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Mir J, Martínez-Alonso M, Esteve I (2000) Estudi de la biocenosi dels tapissos microbianos del delta de l'Ebre. Butll. Ins. Cat. Hist. Nat. 68, 112-133.
- Miracle M (1976) Distribución en el espacio y en el tiempo de las especies del zooplancton del lago de Banyoles. Monografías ICONA 5, 1-270.

- Miracle M (1983) Vertical distribution and rotifer concentrations in the chemocline of meromictic lakes. *Hydrobiologia* 104, 259-267.
- Miracle M, Vicente E, Pedrós-Alló C (1992) Biological studies in Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica* 8, 59-77.
- Mitchell J (1987) Microplankton live in structured microenvironment. PhD Thesis. Universitat de Nova York. EUA.
- Mitchell J, Martínez-Alonso M, Lalucat J, Esteve I, Brown S (1991) Velocity changes, long runs, and reversals in the *Chromatium minus* swimming response. *J. Bacteriol.* 173, 997-1003.
- Montesinos E (1982) Ecofisiología de la fotosíntesis bacteriana. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Montesinos E, Guerrero R, Abella C, Esteve I (1983) Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chromatium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1007-1016.
- Montesinos E, Esteve I (1984) Effect of algal shading on the net growth and production of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Banyoles karstic area. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22, 1102-1105.
- Montesinos E, Van Gernerden H (1986) The distribution and metabolism of planktonic phototrophic bacteria. *Proc. IV ISME*, pp 349-359.
- Moore DD (1996) Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Current protocols in molecular ecology*. John Wiley and Sons, Inc.
- Moré M, Herrick J, Silva M, Ghiorse W, Madsen E (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572-1580.
- Moyer C, Dobbs F, Karl D (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system Loihi seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879.
- Moyer C, Dobbs F, Karl D (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1555-1562
- Murray A, Hollibaugh J, Orrego C (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2676-2680.
- Murray A, Preston C, Massana R, Taylor L, Blakis A, Wu K (1998) Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anverse island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2585-2595.
- Murrell J, Radajewski S (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol* 151, 807-814.
- Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden A (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Waver C (1995) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. En: Akkermans A, Van Elsas J, De Bruijn F (ed.) *Molecular microbial ecology manual*, 2a ed. Kluwer, Dordrecht, Holanda.
- Muyzer G, Smalla K (1998a) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Waver C (1998b) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: *Molecular microbial ecology manual*. Akkermans A, Van Elsas J, De Bruijn F (ed.) 2a ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, vol. 3, 1-27

- Muyzer G, (1999) DGGE/TGGE, a method to identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317-322.
- Myrold D, Martin K, Ritchie N (1995) Gel purification of soil DNA extracts. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.3.5, 1-9.
- Navarrete A (1999) Caracterización ecofisiológica y bioquímica de los tapetes microbianos del Delta del Ebro. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona. Espanya.
- Navarrete A, Peacock A, Macnaughton S, Urmeneta J, Mas-Castella J, White D, Guerrero R (2000) Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 92-99.
- Neef A (1997) Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von bakterien zur population analyse in komplexen microbiellen. Biozönosen. PhD Thesis. Faculty for biology chemistry and geosciences.
- Nielsen A, Liu W, Filipe C *et al* (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1251-1258.
- Novichkova-Ivanova L (1980) Soil algae in phytocoenoses of Saharo-Gobi region. Nauka Publishing House. Leningrad., p. 255.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaird J, Wieshuber A, Amann R, Ludwig W, Backhaus H (1996) Sequences heterogeneities of genes encoding 16s rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Syst. Bacteriol.* 178, 5636-5643.
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Clavero E, Muyzer G (2000) Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol* 2, 217-226.
- Nübel U, Bateson M, Madigan M, Kühl M, Ward D (2001) Diversity and distribution in hypersaline microbial mats of bacteria related to *Chloroflexus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4365-4371.
- Nüsslein K, Tiedje J (1999) Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropic soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3622-3626.
- Ogram A, Saylor G, Barkay T (1987) DNA extraction and purification from sediments. *J. Microbiol. Meth.* 7, 57-66.
- Olsen G, Lane D, Giovannoni S, Pace N, Stahl D (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 337-365.
- Ollivier B, Hatchikian C, Prensier G, Guezennec J, Garcia J (1991) *Desulfohalobium retbaense* gen. nov., sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 74-81.
- Ortega-Calvo J, Saiz-Jimenez C (1998) Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3123-3126.
- Ouverney C, Fuhrman J (1997) Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2735-2740.
- Overmann J, Marco J, Coolen L, Tuschak C (1999) Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA genes fragments. *Arch. Microbiol.* 172, 83-94.
- Overmann J, Van Gemerden H (2000) Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 591-599.
- Ovreås L, Forney L, Daae F, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3367-3373.
- Ovreås L, Jensen S, Daae F, Torsvik V (1998) Microbial community in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2739-2742.

- Parsiegla K, Hudec B, Wipermann T (1994) Microbially mediated processes in tide influenced deposits and their importance in stabilization and diagenesis of sediments. En: Biostabilization of sediments. Krumbein W, Paterson D, Stal L (ed.). (BIS)-Verlag. Oldenburg. Sedimentol, p. 241-256.
- Pavón V, Gaju N, (1997) Genomic relationship of five species of the genus *Chromatium* by analysis of large restriction fragments (macrorestriction analysis) using pulsed-field gel electrophoresis. International J. Syst. Bacteriol. 47, 586-589.
- Pedros-Alió C, Montesinos E, Guerrero R (1983) Factors determining annual changes in bacterial photosynthetic pigments in holomictic Lake Cisó, Spain. Appl. Environ. Microbiol. 46, 999-1006.
- Pedros-Alió C, Abellà C, Guerrero R (1984) Influence of solar radiation, water flux and competition on biomass of phototrophic bacteria in Lake Cisó, Spain. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22, 1097-1101.
- Pedros-Alió C, Gasol J, Guerrero R (1986) Microbial ecology of sulfurous lake Cisó. En: Megusar R, Gantar M (ed.) Perspectives in Microbial Ecology. Slovenian Soc. Microbiol. Ljubljana, p. 638-643.
- Pedros-Alió C, Gasol J, Guerrero R (1987) On the ecology of a *Cryptomonas phaseolus* population forming a metalimnetic bloom in Lake Cisó, Spain. Limnol. Oceano. 32, 285-298.
- Pedros-Alió C, Guerrero R (1993) Microbial ecology in Lake Cisó, Adv. Microb. Ecol. 13, 155-209.
- Pernthaler J, Glöckner F, Unterholzner S, Alfreider A, Psenner R, Amann R (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4299-4306.
- Pernthaler A, Preston C, Pernthaler J, DeLong E, Amann R (2002) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. Appl. Environ. Microbiol. 68, 661-667.
- Pfennig N, Lippert D (1966) Über das vitamin B12- bedürfnis phototropher schwefelbakterien. Archives für Mikrobiologie 55, 245-256.
- Pfennig N, Trüper H (1981) Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. En: Starr M, Stolz H, Trüper H, Ballows A, Schlegel H (ed.). The Prokaryotes. 1a edition, Springer-Verlag. Berlin, p. 279-289.
- Pfennig N (1989) Ecology of phototrophic purple bacteria and green sulphur bacteria. En: Autotrophic bacteria. H. Schlegel, H. Bowien (ed.), Springer-Verlag, Nova York. EUA, p. 81-86.
- Pfennig N, Trüper H (1992a) The family *Chlorobiaceae*. En: The Prokaryotes. Ballows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer K (ed.). Springer-Verlag, Berlin. 4, 3583-3592.
- Pfennig N, Trüper H (1992b) The family *Chromatiaceae*. En: The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Ballows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W, y Schleifer K (eds). 2ª Ed. vol. 1, cap. 170, p. 3200-3221,
- Phillips P, Russel P, Bender J, Muñoz R (1994) Management plan for utilization of a floating microbial mat with its associated detrital gelatinous layer as a complete tilapia *Oreochromis niloticus* feed system. Bioresource Technol. 47, 239-245.
- Phillips C, Smith Z, Embley T, Prosser J (1999) Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in the northwestern mediterranean sea. Appl. Environ. Microbiol. 65, 779-786.
- Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P, (1992) Detection and Enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2717-2722.
- Pierson B, Oesterle A, Murphy G (1987) Pigment, light penetration and photosynthetic activity in multilayered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachusetts. FEMS Microbiol. Ecol. 45, 365-376.

- Pierson B, Parenteau M, Griffin B (1999) Phototrophs in high-iron-concentration microbial mats: physiological ecology of phototrophs in an iron-depositing hot spring. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5474-5483.
- Pillai S, Josephson K, Bailey R, Gerba C, Pepper I (1991) Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2283-2286.
- Planas D (1973) Composición, ciclo y productividad del fitoplancton del lago de Banyoles. *Oecol. Aquatica* 1, 3-106.
- Porter K, Feig Y (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- Porter K, Sherr E, Sherr B, Pace M, Sanders R (1985) Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.* 32, 409.
- Power M, Van der Meer JR, Tchelet R, Egli T, Eggen R (1998) Molecular-based methods can contribute to assessments of toxicological risks and bioremediation strategies. *J. Microbiol. Methods* 32, 107-119.
- Raeymaekers L (1998) Quantitative PCR. En: *Clinical applications of PCR*. Dennis Lo (ed.). Humana Press Inc. Nova Jersey. EUA.
- Ramírez-Moreno S, Martínez-Alonso M, Méndez-Álvarez S, Esteve I, Gaju N (2002) Seasonal population changes in the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified 16S rRNA genes of predominant ribotypes in microbial mat samples from Ebro Delta (Spain). *Curr. Microbiol.* 46, 190-198.
- Rampone G, Urmeneta J, Puigdefabregas C, Guerrero R (1993) Geographical distribution of the microbial mats in the Ebro Delta: structural diversity and role in the stabilization of the sediments. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25, 1014-1019.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151, 167-177.
- Revsbech N, Jorgensen B (1986) Microelectrodes: their use in microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 293-352.
- Reysenbach A, Giver L, Wickham G, Pace N (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3417-3418.
- Richardson L, Castenholz R (1987) Diel vertical movements of the cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in a sulfide-rich hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2142-2150.
- Ritchie N, Schutter M, Dick R, Myrold D (2000) Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1668-1675.
- Rochelle P, Olson B (1991) A simple technique for electrolution of DNA from environmental samples. *Biotechniques.* 11, 724-728.
- Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A (1981) Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbiol. Ecol.* 7, 235-243.
- Rozsak D, Grimes D, Colwell R (1984) Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30, 334-338.
- Rozsak D, Colwell R (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-494.
- Saiki R (1989) The design and optimization of the PCR. En: *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification*. Erlich HA (ed.). Stockton Press. Nova York, EUA.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory. Nova York. EUA.
- Sánchez-Cabeza J, Masqué P, Martínez-Alonso M, Mir J, Esteve I (1999) ²¹⁰Pb atmospheric flux and growth rates of a microbial mat from the northwestern mediterranean sea (Ebro river Delta). *Environ. Sci. Technol.* 33, 3711-3715.

- Sass H, Cypionka H, Babenzien H (1997) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 245-255.
- Sass H, Wieringa E, Cypionka H, Babenzien H, Overmann J (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* 170, 243-251.
- Schäfer H, Servais P, Muyzer G (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Arch. Microbiol.* 173, 138-145.
- Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe C (2001) Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3557-3563.
- Schmidt T, DeLong E, Pace N (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 175, 4371-4378.
- Selenska-Pobell S (1995) Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.5.1, 1-17
- Sievert S, Brinkhoff T, Muyzer G, Ziebis W, Kuever J (1999) Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3834-3842.
- Skirnisdottir et al. (2000) Influence of sulfite and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2835-2841.
- Skirnisdottir S, Hreggvidsson G, Hjorleifsdottir S, Marteinsson V, Petursdottir S, Holst O, Kristjansson J (2000) Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2835-2841.
- Small J, Call D, Brockman F, Straub T, Chandler D (2001) Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4708-4716.
- Smit E, Leeflang P, Wernars K (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.
- Snaird J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer K (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884-2896.
- Sneath P, Sokal R (1973) *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Sokal R, Rohlf F (1983) *Biometry*. 2a ed. W. H. Freeman, Londres. Regne Unit.
- Solé A, Gaju N, Méndez-Álvarez S, Esteve I (2001) Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. *J. Microscopy* 204, 258-262.
- Solé A, Gaju N, Méndez-Álvarez S, Esteve I (2002) The biomass dynamics of cyanobacteria in an annual cycle determined by confocal laser scanning microscopy. *Scanning* 25, 1-7.
- Somerville C, Knight I, Straube W, Colwell R (1989) Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 548-554
- Sorokin Y, Kadota K (1972) Techniques for the assessment of microbial populations and decomposition in freshwaters. *IBP handbook* 23. Blackwells Sci. Publ. Oxford.
- Soutourina O, Semenova E, Parfenova V, Danchin A, Bertin P (2001) Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3852-3859.
- Spring S, Schulze R, Overmann J, Schleifer K (2000) Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 573-590.

- Stackebrandt E, Goebel B (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Bacteriol.* 44, 846-849.
- Stahl D, Amann R (1991) Development and application of nucleic acid probes. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E, Goodfellow M (ed.). John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Regne Unit, p. 205-248.
- Stal L, Krumbein W (1985) Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. *Botanica Marina* 28, 351-365.
- Steffan R, Atlas R (1988a) DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2185-2191.
- Steffan R, Goksoyr J, Atlas R (1988b) Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2908-2915.
- Steffan R, Atlas R (1991) Polymerase chain reaction: application in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 137-161.
- Strickland J, Parsons T (1972) A practical handbook of seawater analysis. 2a ed. *Bull. Fish. Res. Board Canada* 167.
- Strunk O, Gross O, Reichel B, May M *et al.* (1998-2000) ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>.
- Suzuki M, Giovannoni S (1996) Bias caused template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625-630.
- Takahashi M, Ichimura I (1970) Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 14, 929-944.
- Tan Z, Hurek T, Vinuesa P, Müller P, Ladha J, Reinhold-Hurek B (2001) Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3655-3664.
- Tatusova T, Madden T (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing proteins and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 247-250.
- Tebbe C, Vahjen W (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657-2665.
- Teske A, Wawer C, Muyzer G, Ramsing N (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1405-1415.
- Teske A, Ramsing N, Habicht K, Fukul M, Küver J, Jorgensen B, Cohen Y (1998) Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of solar lake (Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2943-2951.
- Teske A, Brinkhoff T, Muyzer G, Moser D, Rethmeier J, Jannasch H (2000) Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3125-3133.
- Thomas J (1984) Formations benthiques a cyanobactéries des salins de Santa Pola (Espagne): composition spécifique, morphologie et caractéristiques biologiques des principaux peuplements. *Rev. Inv. Geol.* 38/39, 139-158.
- Thorhill, R. Grant, J. and Matsunaga, T. 1995. PCR for direct detection of indigenous uncultured magnetic cocci in sediment and phylogenetic analysis of amplified 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 495-500.
- Tonolla M, Demarta A, Peduzzi S, Hahn D, Peduzzi R (2000) In situ analysis of sulfate-reducing bacteria related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 820-824.
- Torsvik V, Daae F, Sandaa R, Ovreås L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64, 53-62.

- Toth I, Avrova A, Hyman L (2001) Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4070-4076.
- Trevors, J. T. 1992. DNA extraction from soil. *Microbiol. Releases.* 1, 3-9.
- Trüper H, Schlegel H (1964) Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie Leewenhoek* 30, 225-238.
- Tsai Y, Olson B (1992) Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 754-757.
- Turet J (1981) Colonització i dinàmica poblacional de bacteris fotosintètics en un estanyol de nova formació a la zona càrstica de Banyoles. Tesina de llicenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Espanya.
- Tuschak C, Glaeser J, Overmann J (1999) Specific detection of green sulfur bacteria by in situ hybridization with fluorescently labeled oligonucleotide probe. *Arch. Microbiol.* 171, 265-272.
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K (1997) 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragments length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 125-132.
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K (1998) A new approach to separate the genus *Photobacterium* from *Vibrio* with RFLP pattern by *Hha* I digestion of PCR-amplified 16S rDNA. *Curr. Microbiol.* 36, 171-174.
- Vallaëys T, Persello-Cartieaux F, Rouard N, Lors C, Laguerre G, Soulas G (1997a) PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 269-278.
- Vallaëys T, Topp E, Muyzer G, Macharet V, Laguerre G, Rigaud A, Soulas G (1997b) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 279-285.
- Van Beek S, Priest F (2002) Evolution of the lactic bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 297-305.
- Van der Meer J, Zepp K, Eggen R (1998) Modern methods for the detection of microorganisms and their activity. *BIO WORLD* 5, 3-8.
- Van Elsas J, Smalla K (1995) Extraction of microbial community DNA from soils. *Molecular Microbial Ecol. Manual* 1.3.3, 1-11.
- Van Gernerden H, Montesinos E, Mas J, Guerrero R (1985) Diel cycle of metabolism of phototrophic purple sulfur bacteria in Lake Cisó (Spain). *Limnol. Oceanogr.* 30, 932-943.
- Van Hannen E, Mooij W, Van Agterveld M, Gons, H, Laanbroek H (1999a) Detritus-dependent development of the microbial community in a experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2478-2484.
- Van Hannen E, Zwart G, van Agterveld M, Gons H, Ebert J, Laanbroek H (1999b) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 795-801.
- Vanechoutte M, Rossau R, de Vos P, Gillis M, Janssens D, Paepe N, de Rouck A, Fiers T, Claeys G, Kersters K (1992) Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 227-234.
- Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von G (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 429-448.
- Voordouw G, Voordouw J, Karkhoff-Schweizer R, Fedorak P, Westlake D (1991) Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3070-3078.
- Wang G, Wang Y (1996) The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* 142, 1107-1114.

- Ward D, Tayne T, Anderson K, Bateson M (1987) Community structure and interactions among community members in hot spring cyanobacterial mats. En: Ecology and microbial communities. Fletcher M, Gray T, Jones J (ed.). 41th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press. Cambridge, p. 179-210.
- Ward D, Weller R, Bateson M (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 344, 137-141.
- Ward D, Bateson M, Weller R, Ruff-Roberts A (1992) Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in the nature. *Adv. Microb. Ecol.* 12, 219-286.
- Ward D, Ferris M, Nold S, Bateson M (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1353-1370.
- Weidner S, Arnold W, Pühler A. (1996) Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 766-771.
- Wikström P, Wiklund A, Andersson A, Forsman M (1996) DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. *J. Biotech.* 52, 107-120.
- Wilson I (1997) Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- Wintzingerode F, Göbel U, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-229.
- Wood J, Scott K, Avgustin G, Newbold C, Flint H (1998) Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3683-3689.
- Woese C (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- Woese C, Fox G (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5088-5090.
- Xia X, Bollinger J, Ogram A (1995) Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2, 4-D. *Mol. Ecol.* 4, 17-28.
- Yamamoto H, Hiraishi A, Kato K, Chiura H, Maki Y, Shimizu A (1998) Phylogenetic evidence for the existence of novel thermophilic bacteria in hot spring sulfur-turf microbial mats in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1680-1687.
- Yeates C, Gillings M, Davison A, Altavilla N, Veal D (1997) PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 303-307.
- Young C, Burchoff R, Keim L, Minak-Bernero V, Lute J, Hinston S (1993) Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1972-1974.
- Yurkov V, Beatty J (1998) Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 337-341.
- Zarda B, Amann R, Wallner G, Schleifer K (1991) Identification of single cells using digoxigenin-labelled rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2823-2830.
- Zarda B, Hahn D, Chatzinotas A *et al* (1997) Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridisation. *Arch. Microbiol.* 168, 185-192.
- Zehr J, Harvey R, Oremland R, Cloern J, George L, Lane J (1987) Big Soda Lake (Nevada). 1. Pelagic bacterial heterotrophy and biomass. *Limnol. Oceanogr.* 32, 781-793.
- Zehr J, Hiorns W (1998) Molecular approaches for assessing activities of marine organisms. En: Molecular approaches to the study of the ocean. Cooksey K (ed.). Chapman and Hall.
- Zhou J, Bruns M, Tiedje J (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.

ADRECES D'INTERNET

<http://biology.Kenyon.edu/courses/biol14/slides/slides-1.html>

<http://commtechlab.msu.edu>

<http://garbanzo.scripps.edu/nmrgrp/gallery0a.html>

<http://insma.udg.es/ambientalitzacio/linies/curricular/webciutats/TextGI.htm>

<http://personal.bgsu.edu/~dbeck/Pages/index3.htm>

<http://rdpwww.life.uiuc.edu>

<http://rrmdb.cme.msu.edu/rrmdb/>

<http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/bac/arb01.htm#p1>

<http://statsoftinc.com/textbook/stmulasca.html>

<http://www.aragonesasi.com/natural/enclima.htm>

<http://www.asmus.org/mbrsrc/archive/SIGNIFICANT.htm>

<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/analyses.html>

<http://www.ch.cam.ac.uk/SGTL/Structures/nucleic>

<http://www.drpez.com/drmicro.htm>

<http://www.fisio.buap.mx/online/confocal/confocal.htm>

<http://www.graphpad.com>

<http://www.isciii.es/museo/crono/ed/edc2171.html>

<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>

<http://www.mjr.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.pfizer.com/rd/microbes/meet8.html>

<http://www.scie-plas.co.uk>

<http://www.statsoftinc.com>

<http://www.uv.es/cect>

<http://www.uv.es/medios/1M.htm>

<http://www.xlstat.com/119e.htm>



X. Anexos



Sonda	Diana (posició ARNr)	Seqüència (5'-3')	(%) FM	Especificitat	Referència
Non338	-----	ACTCCTACGGGAGGCAGC	35	Control negatiu	Amann <i>et al.</i> 1990
Eub338	16S (338-355)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Domini <i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> 1990
Arch915	16S (915-935)	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20	Domini <i>Archaea</i>	Stahl D i Amann R, 1991
Alf968	16S (968-986)	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20	α - <i>Proteobacteria</i>	Neef A, 1997
Bet42a	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	β - <i>Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> 1992
Gam42a	23S (1027-1043)	GCCTTCCCACATCGTTT	35	γ - <i>Proteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> 1992
Srb385	16S (385-402)	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	35	δ - <i>Proteobacteria</i>	Amann <i>et al.</i> 1990
Dss658	16S (658-675)	TCCACTTCCCTCTCCCAT	60	<i>Desulfosarcina, Desulfococcus, Desulfofrigus</i>	Manz <i>et al.</i> 1998
Dsv698	16S (698-717)	GTTCTCCAGATATCTACGG	35	<i>Desulfovibrio spp.</i>	Manz <i>et al.</i> 1998

Annex 1. Sondes utilitzades per FISH en les mostres del llac Gran d'Estanya. FM, Percentatge (vol/vol) de formamida en el tampó d'hibridació



Generalitat de Catalunya
Departament de Medi Ambient
Direcció General de Qualitat Ambiental

	gener	febrer	març	abril	maig	juny	juliol	agost	setembre	octubre	novembre	desembre	Resum anual
Temperatura mitjana (°C)	10,2	12,7	14,6	16,5	19,0	22,3	24,1	25,5	23,1	20,7	14,7	11,6	17,9
Precipitació (mm)	138,8	0,2	0,0	28,0	49,4	43,6	7,8	45,6	7,2	18,8	31,2	79,2	449,8
Mitjana de temperatura màxima (°C)	13,5	17,5	19,9	20,5	22,4	25,9	28,0	29,2	27,0	25,0	18,9	15,7	21,9
Mitjana de temperatura mínima (°C)	7,7	8,6	9,4	12,5	15,4	18,8	20,3	21,5	19,5	16,9	10,9	8,4	14,1
Dies de glaçada (temperatura mínima ≤ 0°C)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dies de precipitació	17,0	1,0	0,0	3,0	5,0	4,0	4,0	4,0	4,0	6,0	9,0	10,0	67,0
Temperatura màxima absoluta (°C)	16,5	23,7	26,4	28,2	27,4	31,3	32,6	31,5	30,4	33,5	23,6	20,6	33,5
Temperatura mínima absoluta (°C)	2,7	3,4	6,5	8,0	9,7	14,5	16,5	18,2	17,2	8,7	6,3	3,2	2,7
Humitat relativa mitjana (%)	81,0	73,2	66,3	66,6	67,6	66,5	63,7	74,3	77,1	67,2	64,2	66,6	69,4
Irradiació mitjana diària (MJ · m ⁻²)	4,1	8,5	11,4	11,9	13,4	13,8	16,0	14,2	11,6	8,9	5,7	4,4	10,4
Velocitat mitjana del vent (m · s ⁻¹)	1,6	1,3	1,4	2,1	1,9	1,9	1,7	1,3	1,1	1,5	1,4	1,7	1,6
Direcció dominant													NW

Annex 2. Dades meteorològiques de l'any 1997 al delta de l'Ebre



Generalitat de Catalunya
Departament de Medi Ambient
Direcció General de Qualitat Ambiental

	gener	febrer	març	abril	maig	juny	juliol	agost	setembre	octubre	novembre	desembre	Resum anual
Temperatura mitjana (°C)	11,6	11,4	14,0	15,5	18,8	22,5	25,7	25,5	22,5	18,2	13,7	9,8	17,4
Precipitació (mm)	86,8	10,6	1,6	17,4	38,2	16,0	4,0	23,6	0,6	6,6	0,6	73,6	279,6
Mitjana de temperatura màxima (°C)	15,2	16,2	18,9	20,1	22,7	26,3	29,3	30,0	27,2	22,7	18,1	14,4	21,7
Mitjana de temperatura mínima (°C)	8,5	7,8	9,9	11,2	15,0	18,8	22,0	21,4	18,9	14,5	9,8	6,3	13,6
Dies de glaçada (temperatura mínima ≤ 0°C)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dies de precipitació	9,0	3,0	1,0	4,0	6,0	3,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	5,0	40,0
Temperatura màxima absoluta (°C)	22,3	21,5	25,4	26,0	26,4	32,0	32,2	33,3	32,3	29,2	25,7	20,0	33,3
Temperatura mínima absoluta (°C)	2,5	4,6	5,7	5,9	9,8	15,1	19,5	15,9	6,9	10,3	3,1	2,7	2,5
Humitat relativa mitjana (%)	77,4	72,9	66,9	53,7	64,8	67,3	63,2	65,9	62,2	59,6	57,8	69,2	64,9
Irradiació mitjana diària (MJ · m ⁻²)	4,9	7,6	10,1	12,7	13,8	15,4	16,8	14,1	12,3	9,2	6,3	5,3	10,7
Velocitat mitjana del vent (m · s ⁻¹)	1,9	1,4	1,7	2,2	1,8	1,9	2,1	1,7	1,9	2,2	2,1	1,9	1,9
Direcció dominant													NW

Annex 3. Dades meteorològiques de l'any 1998 al delta de l'Ebre

Mostres	Submostres	Hivern			
		Chl a (mg m ⁻²)	Bchl a (mg m ⁻²)	Bchl c, d i e (mg m ⁻²)	Proteïna (mg m ⁻²)
Cisó	Mixolímnion	745,91	132,49	53,63	6279,86
Vilar	Mixolímnion	43,65	1,32	0,54	4787,36
Vilar	Monimolímnion	1,07	0,32	0,13	342,80

Annex 4A. Valors integrats de pigments i proteïnes als estanyols d'en Cisó i el Vilar en el període de barreja

Mostres	Submostres	Hivern			
		Chl a (%)	Bchl a (%)	Bchl c+d+e (%)	Protein (%)
Cisó	Mixolímnion	100	100	100	100
Vilar	Mixolímnion	97,61	80,77	80,77	93,32
Vilar	Monimolímnion	2,39	19,23	19,23	6,68

Annex 4B. Percentatges dels valors integrats de pigments i proteïnes als estanyols d'en Cisó i el Vilar en el període de barreja

Mostres	Submostres	Primavera				Estiu				Tardor			
		Chl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>c, d i e</i> (mg m ⁻²)	Proteïna (mg m ⁻²)	Chl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>c, d i e</i> (mg m ⁻²)	Proteïna (mg m ⁻²)	Chl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>a</i> (mg m ⁻²)	Bchl <i>c, d i e</i> (mg m ⁻²)	Proteïna (mg m ⁻²)
Cisó	Epilímnion	9,10	2,96	9,84	20,66	27,87	0,693	34,25	589,1	141,66	5,80	141,14	747,05
Cisó	Metalímnion	1049,77	89,81	808,40	1319,06	239,25	25,58	419,17	2079,78	500,60	32,19	524,25	1755,57
Cisó	Hipolímnion	265,53	183,71	273,16	537,72	525,61	99,92	807,53	5146,84	415,35	105,90	959,26	5184,53
Vilar	Epilímnion	47,19	3,69	35,42	3395,35	18,99	0,35	10,99	4768,79	83,30	0,63	53,98	3165,67
Vilar	Metalímnion	43,92	5,13	35,73	2216,91	14,09	5,92	11,58	1911,30	21,43	0,00	13,37	965,25
Vilar	Hipolímnion	42,51	5,54	35,05	3316,54	15,42	6,90	11,74	2020,43	3,52	0,00	1,82	265,51
Vilar	Monimolímnion	3,62	0,63	2,84	641,57	15,42	6,90	11,74	2020,43	6,52	6,27	10,46	878,79

Annex 5A. Valors integrats de pigments i proteïnes als estanyols d'en Cisó i el Vilar en el període d'estratificació

Mostres	Submostres	Primavera				Estiu				Tardor			
		Chl <i>a</i> (%)	Bchl <i>a</i> (%)	Bchl <i>c, d i e</i> (%)	Proteïna (%)	Chl <i>a</i> (%)	Bchl <i>a</i> (%)	Bchl <i>c, d i e</i> (%)	Proteïna (%)	Chl <i>a</i> (%)	Bchl <i>a</i> (%)	Bchl <i>c, d i e</i> (%)	Proteïna (%)
Cisó	Epilímnion	0,7	1,1	0,9	1,1	15,4	10,2	16,8	13,8	13,4	4,0	8,7	9,7
Cisó	Metalímnion	79,3	32,5	74,1	70,3	33,7	39,7	32,5	34,2	47,3	22,4	32,3	22,8
Cisó	Hipolímnion	20,0	66,4	25,0	28,6	50,9	50,1	50,7	52,0	39,3	73,6	59,0	67,4
Vilar	Epilímnion	34,4	24,6	32,5	35,5	29,7	1,7	23,9	44,5	72,6	9,1	67,8	60,0
Vilar	Metalímnion	32,0	34,2	32,8	23,2	22,0	29,5	25,1	17,8	18,7	0,0	16,8	18,3
Vilar	Hipolímnion	31,0	37,0	32,1	34,7	24,1	34,4	25,5	18,8	3,1	0,0	2,3	5,0
Vilar	Monimolímnion	2,6	4,2	2,6	6,7	24,1	34,4	25,5	18,8	5,7	90,9	13,1	16,7

Annex 5B. Percentatges dels valors integrats de pigments i proteïnes als estanyols d'en Cisó i el Vilar en el període d'estratificació

A/B	2%	3%	5%	7%	10%	30%	50%	70%	90%	93%	95%	97%	98%	100%
														15
2%													14	
3%												13		
5%											12			
7%										11				
10%									10					
30%								9						
50%							8							
70%						7								
90%					6									
93%				5										
95%			4											
97%		3												
98%	2													
100%														
1														

Annex 6. Mescla de dues soques bacterianes, A i B, a les proporcions indicades. Per exemple, en el tub 3 hi ha un 97% de la soca A i un 3% de la soca B.

En negreta apareix la numeració dels tubs utilitzada en les figures del capítol V