

Diversitat de microorganismes

Carlos Pedrós-Alió
Institut de Ciències del Mar. CSIC

El 1992, els zoòlegs John MacKinnon i Do Tuoc van viure una de les experiències més inusuals del nostre segle. Estaven portant a terme una exploració en una àrea del parc nacional Vu Quang, a Vietnam, quan van trobar les banyes d'un mamífer desconegut a casa d'un veí de la zona. La gent del poble anomenava aquest animal *saola*. Durant els anys següents, van anar apareixent més restes de *saola*, i el 1994 un zoòleg va trobar-ne un exemplar amb vida. Descriure una nova espècie de mamífer superior com aquesta és cada vegada menys freqüent, ja que la majoria d'hàbitats on podrien trobar-se, o bé s'han explorat rigorosament o bé s'han destruït per complet. En canvi, en altres grups d'organismes vius, descriure una nova espècie encara és un fenomen molt comú. Així, cada any es descriuen, per exemple, unes cent noves espècies d'hidrozoous. La taula 1

TAULA 1. Nombre d'espècies descrites i extrapolació (modificat de diverses fonts)

<i>Organismes</i>	<i>Espècies descrites</i>	<i>Espècies calculades</i>
Mamífers	4 500	
Rèptils i amfibis	10 500	
Aus	9 000	
Peixos	21 000	
Vertebrats	45 000	50 000
Insectes	950 000	30 000 000
Crustacis	40 000	150 000
Nemàtodes	25 000	400 000
Altres invertebrats	200 000	
Invertebrats	1215 000	33 000 000
Plantes	270 000	320 000
Fongs	72 000	1 500 000
Protozoous	40 000	200 000?
Algues	40 000	400 000?
Procariotes	6 000	?
Total	1 700 000	50 000 000?

mostra el càlcul actual d'espècies existents en diferents grups d'organismes. Tal com es pot observar, els organismes més grans són bastant coneguts i els càlculs del nombre total d'espècies probablement són força exactes. Pel que fa als organismes més petits, en canvi, les extrapolacions són molt incertes. Fins i tot en un grup tan ben estudiat com el dels insectes el grau d'incertesa és elevat: la valoració actual oscil·la entre els cinc i els cinquanta milions d'espècies, un ordre de magnitud complet!

S'accepta de manera generalitzada que el cens actual d'1,4 milions d'espècies descrites és una estimació que està molt per sota de la biodiversitat real. L'ecòleg Robert May suggereix que «dispossem d'un catàleg de tots els cossos celestes visibles a través dels telescopis, però, en canvi, no comptem amb un càlcul del nombre d'éssers vius diferents que comparteixen el planeta Terra amb nosaltres» (conferència del Sisè Simposi Internacional d'Ecologia Microbiana, Barcelona, 1992; vegeu també May, 1988). El coneixement d'aquesta xifra, però, s'està convertint en una necessitat imperiosa, ja que el ritme d'extinció d'espècies vives s'ha anat accelerant a causa de les activitats humanes. La desaparició d'espècies del nostre planeta es percep com una amenaça per al nostre futur i com una pèrdua de material genètic per a possibles aplicacions útils. Aquesta pèrdua de diversitat és més dràstica i evident en el cas de les pluviselves. Epífits espectaculars, aus de colors vistosos i insectes estranys estan desapareixent a una velocitat alarmant a causa de l'acció humana.

Però la diversitat també és important des d'altres punts de vista, tant teòrics com pràctics (Sugihara, 1980; May, 1981, 1986; Stuart Chapin III *et al.*, 2000). La distribució concreta d'individus en espècies diferents que es troba en qualsevol comunitat determinada és el resultat d'una gran quantitat d'interaccions entre els organismes i entre els organismes i l'entorn. Per tant, la diversitat és una propietat sinòptica dels ecosistemes, i el seu estudi permet la comparació entre diferents ecosistemes sense haver d'analitzar exhaustivament totes les complicades relacions, components i fluxos.

La diversitat és important també per altres raons. Té una influència en els fluxos de carboni, d'energia i de nutrients. Així, per exemple, sembla que uns valors de diversitat de fitoplàncton molt elevats estan relacionats amb nivells intermedis de biomassa de fitoplàncton. No obstant això, tant els valors de biomassa molt alts com els molt baixos s'associen a valors de diversitat baixos (Estrada, comunicació personal).

Des d'un punt de vista pràctic, la diversitat es pot utilitzar com a diagnòstic de l'estat d'un sistema determinat, tant per qüestions de gestió com de control (Magurran, 1988; Ehrlich i Wilson, 1991). En el cas dels microorganismes, aquest aspecte és essencial per pronosticar el destí dels microorganismes creats per enginyeria genètica (MEG) introduïts en comunitats naturals (vegeu, per exemple, Halvorson *et al.*, 1985; Sussman *et al.*, 1988), per fer un seguiment dels efectes de l'activitat humana en entorns naturals i per saber on cal buscar microorganismes nous amb un possible valor comercial.

D'acord amb la importància de la diversitat, cada vegada es destina una quantitat més gran de recursos per estudiar-la. Un exemple de la importància que es concedeix a la diversitat és el re-

cent suplement especial (Nature Insight, 2000) de *Nature*, dedicat a la biodiversitat. Diverses organitzacions internacionals han subvencionat tallers per analitzar el problema de la reducció de la biodiversitat i per proposar-hi solucions. La Unió Europea ha reconegut la importància dels estudis sobre la diversitat en el V Programa Marc, i s'ha establert un programa internacional per promoure un estudi coordinat sobre la diversitat biològica (DIVERSITAS). Com a exemple de la rellevància que es dona als microorganismes en aquest marc, un dels paquets prioritaris rep precisament el nom de Diversitat de Microorganismes. Cap altre grup d'éssers vius no havia rebut mai abans un nivell de reconeixement comparable a aquest.

Els organismes més petits, en particular els microorganismes, continuen gairebé inexplorats (Ehrlich i Wilson, 1991). Ni tan sols es compta amb una estimació del nombre total d'espècies microbianes (vegeu la taula 1). Per exemple, només s'han descrit adequadament entre cinc mil i sis mil espècies de bacteris (Holt *et al.*, 1994). Els càlculs del percentatge del total d'espècies bacterianes conegudes continuen disminuint a mesura que obtenim millors avaluacions de la diversitat de microorganismes: del 20 % fa només uns anys al 5 % o menys ara. Evidentment, aquestes consideracions impliquen que no coneixem la diversitat de microorganismes (Atlas, 1983; Pedrós-Alió, 1993).

Tot i això, la utilització de mètodes moleculars en situacions sobre el terreny està proporcionant una gran quantitat de gens dels quals es podria demostrar que pertanyen a microorganismes completament diferents i desconeguts. Per tant, l'estudiós de la diversitat microbiana es troba actualment en una situació similar a la dels naturalistes al segle XVIII: es disposa de tècniques i de conceptes prometedors i allà fora hi ha tot un món per explorar amb aquestes eines desenvolupades recentment.

La importància dels microorganismes

Els microorganismes són els éssers vius més abundants de la Terra. Això és clar en termes d'individus, ja que un mil·lilitre d'aigua conté prop de deu milions de virus, un milió de bacteris i mil cèl·lules eucariòtiques (que inclouen algues, flagel·lats heterotròfics i ciliats). En termes de biomassa, els microorganismes també són summament importants en comparació amb els animals i les plantes més coneguts. Whitman *et al.* (1998) han avaluat l'abundància de procariotes en ecosistemes diferents. Els resultats del seu estudi són força sorprenents. Així, es calcula que la biomassa de les plantes de terra és de 560 Pg de carboni (1 Pg = 10^{15} g). Alhora, només la biomassa dels microorganismes procariòtics ja es calcula que està entre 353 i 546 Pg de C. Aquests dos valors són del mateix ordre de magnitud. La major part de biomassa procariòtica es troba en un entorn descobert fa tan sols uns anys (Parkes *et al.*, 1994): la subsuperfície de la Terra. A terra, la subsuperfície va dels 8 m per sota de la superfície (on es poden trobar $4,5 \times 10^7$ cèl·lules cm^{-3}) fins a una profunditat de 4.000 m (amb $3,4 \times 10^5$ cèl·lules cm^{-3}), on les temperatures probablement impedeixen l'existència d'éssers vius. Als oceans, aquest hàbitat abasta des de 10 cm per sota de

la superfície fins a 300 m de sediments no consolidats. L'activitat d'aquests procariotes subsuperficials a penes es coneix. En canvi, s'ha demostrat que la dels microorganismes que es troben a la superfície és d'una importància primordial.

Els microorganismes són essencials per al funcionament de tots els ecosistemes, i són els responsables de mantenir la composició de l'aire i del mar en la seva forma actual.

— La producció primària als oceans la duen a terme gairebé tots els microorganismes, i una part important circula a través de xarxes alimentàries microbianes. Així doncs, els microorganismes tenen una funció determinant en el cicle del carboni i en les emissions o la captura de CO₂.

— L'acció combinada de microbis fototròfics i heterotròfics als oceans és la responsable de produir compostos de sofre metilats volàtils, l'emissió a l'atmosfera dels quals es creu que té un impacte important en el clima global.

— Els processos microbians constitueixen el principal mitjà del cicle global de les substàncies químiques a la biosfera, incloent-hi la degradació de contaminants ambientals, i per això són uns factors molt importants que determinen la qualitat de l'aigua, de l'aire, de la terra i del mar.

— I, a la inversa, poden tenir com a resultat la contaminació d'aigües potables i recreatives i de corrents utilitzats en processos industrials.

— Els microorganismes contribueixen a la corrosió i la deterioració de materials utilitzats pels éssers humans per construir objectes utilitaris o obres d'art.

— Els microorganismes provoquen reaccions químiques i vies que els humans poden aprofitar per produir una gran varietat de productes biotecnològics útils. La diversitat potencial dels microorganismes és enorme i desconeguda, i constitueix, a més, una font possible de gens beneficiosos.

— Els microorganismes provoquen malalties als animals i a les plantes, però a la vegada també eviten les malalties d'animals i plantes i els proporcionen nutrients importants.

A causa de l'impacte omnipresent dels processos microbians en les activitats humanes i en la condició humana, és obvi que hem d'adquirir un coneixement profund de l'ecologia dels microorganismes per treure profit dels seus efectes positius i disminuir-ne els negatius.

Diversitat i microorganismes

La diversitat té dos components: la riquesa d'espècies i l'equitat. La riquesa d'espècies és senzillament el nombre total d'espècies presents en una comunitat normalitzat al nombre total d'individus o al volum amb el qual s'ha realitzat el mostreig. L'equitat mesura la regularitat (o la manca de regularitat) en el nombre d'individus per espècie (Margalef, 1974; Magurran, 1988). No sabem quantes espècies de microorganismes coexisteixen en qualsevol hàbitat determinat (el component riquesa de la diversitat). I no tenim una idea de l'abundància relativa d'aquestes espècies diferents (el component equitat de la diversitat).

El primer pas en qualsevol estudi de la diversitat consisteix a assignar cada individu d'una co-

munitat a la seva espècie correcta. No obstant això, en el cas dels microorganismes aquest pas tan senzill és impossible. La taxonomia de la majoria de grups microbians encara és molt deficient (Lee *et al.*, 1985; Margulis *et al.*, 1989; Holt *et al.*, 1994; Balows *et al.*, 1992). Per això, la composició específica de les comunitats microbianes és completament desconeguda i els estudis sobre la diversitat només s'han dut a terme amb alguns grups de diatomees (Patrick, 1967, 1975) i altres grups de fitoplàncton (Margalef, 1974; Estrada *et al.*, 1988). Fins i tot amb aquests grups més coneguts queden dos problemes per resoldre. En primer lloc, l'estudi tradicional de mostres mitjançant el microscopi suposa molt de temps i requereix la intervenció d'experts molt ben preparats. Per resoldre aquest problema, cal desenvolupar mètodes que puguin automatitzar-se, però que alhora siguin capaços de classificar els organismes. I, en segon lloc, recentment s'ha demostrat que hi ha una variabilitat genètica críptica molt alta en els tàxons morfològicament uniformes (Medlin, 1995). Aquest problema només es pot solucionar per mitjà de l'ús de tècniques moleculars. Aquests mètodes, però, encara en fase de desenvolupament, només poden aplicar-se a un nombre limitat de microorganismes.

Un altre problema amb què ens trobem és que no comptem amb una definició satisfactòria del que és una espècie. Fins i tot en el cas dels eucariotes hi ha, almenys, vint-i-dues definicions diferents d'espècie. El cas dels procariotes és més polèmic (Rosselló-Mora i Amman, en premsa). Una definició actual podria ser «grup monofilètic i genòmicament coherent d'organismes individuals que mostren un alt grau de similitud general en moltes característiques independents i que es pot diagnosticar per una propietat fenotípica discriminant» (Colwell *et al.*, 1995). Aquest concepte d'*espècie filofenètica* s'ha desenvolupat de manera pragmàtica per la necessitat dels microbiòlegs d'identificar espècimens que causen malalties o que duen a terme determinats processos bioquímics d'interès. Però la definició és prou vaga per crear ambigüitats en molts casos. I amb relació als estudis sobre la diversitat té un inconvenient afegit: requereix un cultiu pur de l'organisme per poder trobar els trets fenotípics que el defineixen com a espècie.

Aquesta situació es produeix pel fet que tots els bacteris s'assemblen molt (vegeu la figura 1). Els trets morfològics són insuficients per a la determinació de l'espècie. Cal aïllar l'organisme en un cultiu pur i després caracteritzar-lo per mitjans fisiològics i bioquímics. Així és com s'ha dut a terme fins ara la taxonomia bacteriana, i s'ha establert el nombre total d'espècies descrites en unes sis mil (Holt *et al.*, 1994).

Ara bé, l'aïllament de cultius purs presenta el problema del criteri selectiu. Només s'han de seleccionar i d'identificar els organismes capaços de créixer sota les condicions imposades. Aquest fet es coneix des de fa dècades (Jannasch i Jones, 1959). Quan es compten els bacteris mitjançant un mètode microscòpic directe, el nombre de bacteris que es troba és sempre entre cent i mil vegades superior al nombre de bacteris que poden créixer en cultius del mateix hàbitat. Així, la majoria de cèl·lules bacterianes naturals (entre el 99,0 % i el 99,9 %) continuen essent inaccessibles a través dels mètodes d'identificació tradicionals. Evidentment, moltes d'aquestes cèl·lules podrien estar mortes o podrien pertànyer a unes poques espècies molt abundants. Però la possibilitat de trobar moltes altres espècies diferents i desconegudes continua oberta.

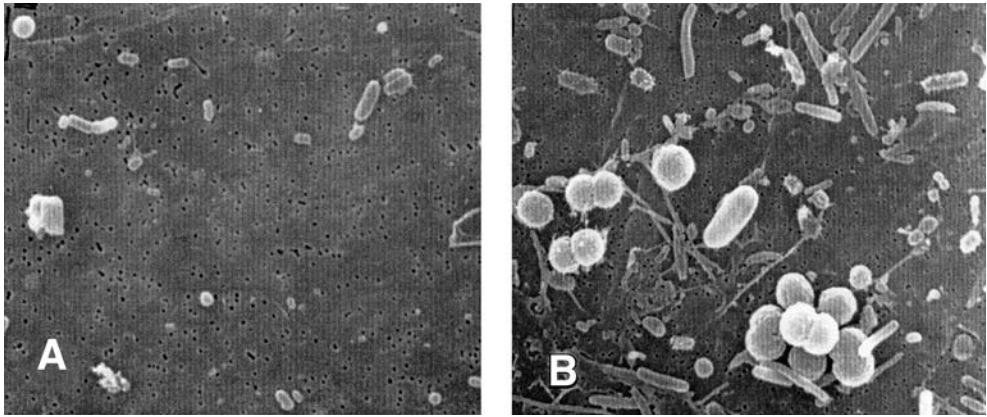


FIGURA 1. Micrografies electròniques d'escandallatge de bacteris heterotròfics marins (A) i procariotes anaeròbics d'aigua dolça del llac Ciso (B). En la superfície dels filtres de policarbonat s'observen microorganismes. Els porus de 0,2 µm de diàmetre es veuen com petits cercles negres.

Cada vegada hi ha més indicis que suggereixen que aquells bacteris capaços de créixer en cultius purs no són els que més abunden a la naturalesa (Wayne *et al.*, 1987; Ward *et al.*, 1990). Ward *et al.* (1990), per exemple, van estudiar els tapissos microbians a les fonts termals d'Octopus Spring, un ecosistema del parc nacional de Yellowstone (EUA) que s'havia estudiat durant molt de temps amb mètodes convencionals (Brock, 1978). Ward *et al.* (1990) van recuperar, de manera no selectiva, les molècules de RNAr de 16S del tapís i les van seqüenciar. Cap de les seqüències recuperades no corresponia a microorganismes coneguts, ni tan sols a les moltes soques aïllades del mateix tapís al llarg dels anys. De fet, sembla que la major part dels nostres coneixements de microbiologia són fruit de l'estudi d'unes quantes «males herbes» com *Escherichia coli*, que tan sols representa el 0,01 % de les cèl·lules bacterianes presents en el seu hàbitat natural: el tracte digestiu dels vertebrats.

Un altre exemple és el del grup SAR11 de seqüències marines. Els membres d'aquest grup han estat recuperats de totes les mostres marines examinades (Giovannoni *et al.*, 1990; DeLong *et al.*, 1993; Fuhrman *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 1995; Martínez i Rodríguez-Valera, en premsa). Més tard, s'ha demostrat que són relativament abundants a través de la hibridació. No obstant això, els organismes amb aquestes seqüències no han estat aïllats. D'altra banda, hi ha un altre bacteri marí aparentment comú, com els membres del gènere *Roseobacter*, que s'aïlla del mar amb una facilitat relativa (González *et al.*, en premsa).

Aquesta situació sorprenent només es pot resoldre mitjançant la introducció de tècniques moleculars capaces de donar respostes coherents des del punt de vista ecològic en situacions de camp. Quan analitzem seqüències a partir de mostres de l'entorn només tenim un fragment d'un gen, normalment la petita subunitat de RNAr (de 16S en els procariotes i de 18S en els eucariotes). Ho ignorem tot sobre la resta de gens i sobre el fenotip de l'organisme que originàriament tenia aquella seqüència. S'han dut a terme estudis amb microorganismes coneguts per tal de pro-

porcionar una regla general que associés les diferències entre les seqüències del gen de DNAr de 16S amb les diferències entre espècies convencionals. Sembla que les soques bacterianes que pertanyen a la mateixa espècie tenen una similitud del 97 % (o superior) en les seqüències del seu gen de DNAr de 16S (Stackebrandt i Goebel, 1994). Aquesta xifra pot utilitzar-se com un indicador molt general per obtenir una idea de com són de similars o de diferents les seqüències ambientals entre si. No obstant això, cal tenir en compte que, des del moment en què els cultius purs no estan disponibles, no estem tractant amb espècies sinó amb unitats taxonòmiques operatives (OTU). La segona qüestió que cal no oblidar és que la seqüència de DNAr és molt adequada per explorar les relacions entre organismes vagament relacionats, però que no és prou determinant per discriminar bacteris en l'àmbit de les espècies. Per tant, els estudis de mostres ambientals basats en les seqüències de DNAr de 16S estaran calculant un nombre d'espècies microbianes inferior. Això significa que els estudis sobre la diversitat microbiana es realitzaran amb entitats que no són espècies. Però el problema no és tan greu com podria semblar. La diversitat es pot estudiar amb qualsevol tipus d'unitat, sempre que la definició sigui clara i s'utilitzi amb coherència en tots els sistemes estudiats. En la taxonomia numèrica, per exemple, s'han utilitzat OTU amb resultats satisfactoris.

Quantes espècies de microbis hi ha?

Hi ha diverses raons per pensar que el nombre total d'espècies de microorganismes hauria de ser molt elevat. En primer lloc, els microorganismes, i, en concret, els procariotes, fa tres mil cinc-cents milions d'anys que existeixen a la Terra, mentre que els eucariotes en fa mil milions, i a partir del registre fòssil sabem que els animals i les plantes només fa cinc-cents milions d'anys que existeixen. Per aquesta raó, els procariotes han tingut molt més temps que els animals i les plantes per evolucionar i especialitzar-se en moltes tasques diferents. Tots els animals i les plantes, per exemple, utilitzen un tipus de metabolisme respiratori per obtenir energia: la respiració de matèria orgànica amb oxigen per produir diòxid de carboni i aigua (i, en menor mesura, els animals també utilitzen la fermentació de l'àcid làctic). D'altra banda, els bacteris són capaços d'utilitzar una varietat considerable de metabolismes respiratoris. L'acceptor d'electrons final, per exemple, pot ser oxigen, nitrat, sulfat, diòxid de carboni o una varietat de molècules orgàniques. Si simplifiquem l'evolució fins a caricaturitzar-la, els passos centrals en la reproducció, el creixement i l'obtenció d'energia de la cèl·lula, els van desenvolupar i diversificar els procariotes. Posteriorment, els eucariotes van agafar un o dos d'aquests passos i van diversificar un metabolisme i una morfologia secundaris.

Hi ha una altra raó per esperar trobar moltes espècies entre els procariotes: l'estructura fractal de la natura. Quan observem estructures naturals a escales més petites (ja siguin partícules de terra o fulles de plantes) la quantitat de detall és cada vegada més gran. Com més petit és un organisme, més d'aquestes estructures pot colonitzar (Morse *et al.*, 1985). D'aquesta manera, pot esperar-se que els organismes petits tinguin molts més nínxols diferents per establir-hi colònies que

no pas els organismes més grans. Si això és veritat, hi hauria d'haver moltes més espècies d'organismes petits que de grans.

Per contra, també hi ha una raó per esperar trobar quantitats més petites d'espècies entre els microorganismes. Generalment, els microorganismes es troben en quantitats astronòmiques i, a causa de les seves dimensions, són fàcilment transportats a llocs molt distants. Per tant, constantment aniran arribant a possibles nous nínxols individuals de qualsevol espècie i les extincions locals seran improbables. Davant d'aquesta perspectiva, les taxes d'especiació al·lopàtrica seran baixes i el nombre total d'espècies no hauria de ser excessivament alt (Finlay i Fenchel, 1998). En conseqüència, les espècies microbianes haurien de ser cosmopolites i el nombre total d'espècies relativament baix. Aquest és el raonament que es troba darrere de l'afirmació clàssica de Baas-Becking i Beijerinck sobre els microorganismes, que diu: «Tot és a tot arreu. El medi ambient selecciona.»

Es té algun indicatiu de cap d'aquestes tendències? Primerament, l'arbre filogenètic basat en la petita subunitat de RNAr (de 16S per als procariotes i de 18S per als eucariotes) demostra clarament que els procariotes s'han diversificat molt més que els eucariotes (vegeu la figura 2). La diferència és espectacular entre els procariotes i els animals i les plantes. Els dos darrers grups d'organismes complexos no són sinó petites branques dins del domini dels eucariotes. Així, la distància filogenètica entre els bacteris que produeixen el iogurt i un bacteri intestinal com *Escherichia coli* és major que la que hi ha entre els éssers humans i els protozoous.

Tanmateix, aquestes distàncies no s'expressen fàcilment en nombre d'espècies diferents. Tal com s'ha explicat més amunt, el concepte d'espècie és difícil de definir amb precisió, tant pel que fa als eucariotes com als procariotes. Per tant, no podem deduir l'existència d'un gran nombre d'espècies del fet que les soques procariòtiques estiguin relacionades molt vagament.

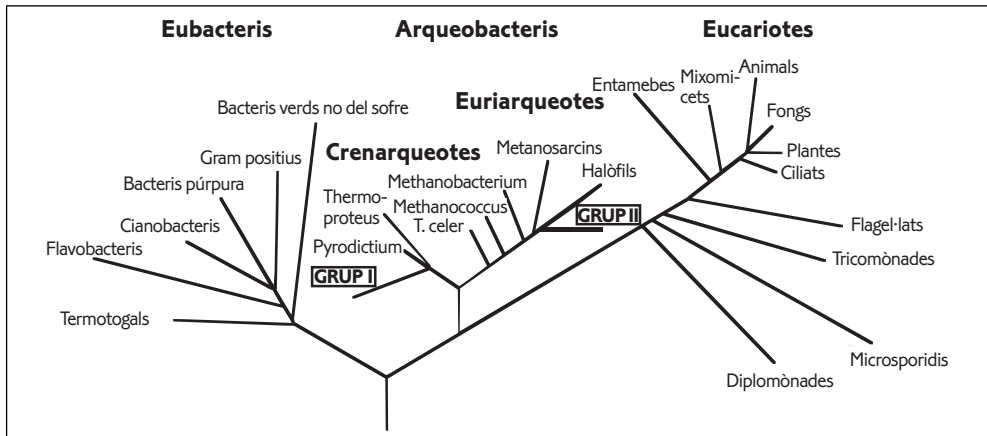


FIGURA 2. Arbre filogenètic de la vida basat en petites subunitats de seqüències de RNA ribosòmic. Hi apareixen tres dominis d'éssers vius: Bacteris, Arqueus i Eucariotes. En el grup dels Arqueus hi ha dues branques, cadascuna de les quals té un grup de representants marins que no han estat aïllats en cultius purs.

FONT: modificat de Woese *et al.*, 1990.

La qüestió de l'augment en el nombre d'espècies a mesura que les dimensions corporals es van fent cada vegada més petites es va provar en els animals terrestres (May, 1988). La relació hauria previst al voltant de cent vuit espècies de ciliats, per exemple. No obstant això, les dades reals van mostrar menys espècies de les que s'havien predit per als organismes més petits d'1 cm. May pensava que això es devia al fet que la taxonomia es trobava en una fase molt menys desenvolupada pel que fa als organismes més petits. Aquest és, sens dubte, el cas dels microorganismes. Per tant, la tendència existeix, però no estem segurs si podem extrapol·lar-la a l'àmbit de les dimensions dels microorganismes.

En conclusió, encara és aviat per intentar avaluar si el nombre total d'espècies microbianes és gran o petit. Tot i això, es pot estudiar una de les conseqüències de la dimensió d'aquest nombre d'espècies. Si el nombre total d'espècies és baix, la majoria de les espècies microbianes, o moltes, haurien de ser cosmopolites. En canvi, si el nombre total d'espècies és alt, les més comunes haurien de ser les espècies microbianes endèmiques. En l'apartat següent s'estudiaran els exemples de diferents microorganismes.

Les espècies microbianes són cosmopolites?

Primnesiòfits

Un exemple especialment rellevant és el de dos gèneres diferents de primnesiòfits: *Phaeocystis* i *Emiliana* (Medlin, 1996). Els primnesiòfits són un grup molt comú i estès d'algues del fitoplàncton. Els seus pigments traçadors (19'hexanoiloxifucoxantina) es troben amb freqüència en la majoria de zones marines del món (Moon-van der Staay *et al.*, 2000). A més, se sap que tant *Phaeocystis* spp. com *Emiliana huxleyi* formen grans floracions que s'estenen fins a 500.000 km². Mitjançant la utilització de tres marcadors genètics diferents, es va demostrar que els clons d'*E. huxleyi* de diferents zones del món eren idèntics (Medlin, 1996). El fet és sorprenent, ja que aquest organisme pot trobar-se en latituds molt diferents, des dels oceans subpolars fins a les àrees tropicals. És evident, doncs, que *E. huxleyi* és una espècie cosmopolita. En el cas de *Phaeocystis*, una anàlisi genètica similar va agrupar les soques en dos grups i tres espècies diferents: un grup d'aigua freda, que inclouria *P. pouchetii* de l'Àrtic i *P. antarctica* de l'oceà Austral, mentre que l'altra espècie, *P. globosa*, es troba en aigües càlides i és l'únic membre del segon grup (Medlin *et al.*, 1994). Així doncs, les soques de *Phaeocystis* s'han diferenciat en espècies adaptades a diferents regions oceàniques. És especialment interessant esmentar que les espècies d'aigua freda són diferents a l'Àrtic i a l'Antàrtic. La comparació entre aquests dos oceans hauria de ser prometedora a l'hora d'estudiar la qüestió de si les espècies microbianes són cosmopolites o no. En el cas d'*E. huxleyi*, la manca de diferenciació s'atribueix a una aparició recent d'aquesta espècie com a part dominant del fitoplàncton que forma floracions. Els estudis del registre geològic indiquen que *E. huxleyi* va substituir l'espècie *Gephyrocapsa* com a principal cocolitoforal molt tard, des de principis de l'holocè (Brown i Yoder, 1994).

Bacteris del gel marí polar

El gel marí d'ambdós pols de la Terra és un possible candidat a trobar-hi bacteris endèmics (Staley i Gosink, 1999). Els casquets del gel marí cobreixen entre un 7 % i un 10 % de la superfície dels oceans, i creen així un ecosistema d'una extensió considerable. Suposadament, els bacteris que habiten en el gel haurien de ser psicròfils, estar adaptats a les baixes temperatures i ser incapaçs de sobreviure en els molts de milers de quilòmetres d'aigües càlides que separen un pol de l'altre. D'altres mecanismes de transport alternatius també semblen poc probables. Així, per exemple, la migració associada al xatrac àrtic també exigiria recórrer molts milers de quilòmetres a través d'aire calent. El transport per mitjà de cristalls de gel a l'alta atmosfera implicaria altes dosis de radiació esterilitzadora. Finalment, el transport mitjançant els corrents de les profunditats marines requeriria centenars d'anys i és difícil imaginar que els bacteris de les zones glacials persistissin tan lluny del gel durant un període de temps tan llarg.

Staley i els seus col·laboradors van aïllar unes dues-centes soques de bacteris amb vacúols de gas tant de l'oceà Àrtic com de l'Antàrtic (vegeu la figura 3, Staley i Gosink, 1999). Van trobar almenys tres exemples de gèneres bacterians que incloïen espècies diferents a l'Àrtic i a l'Antàrtic (vegeu la taula 2). Aquesta troballa indica que almenys algunes espècies bacterianes no són cosmopolites i que els endemismes existeixen entre els bacteris.

Arqueus marins

Massana *et al.* (2000) van comparar la presència i la composició filogenètica dels arqueus planctònics marins en diferents províncies marines que abasten des de l'oceà Austral fins a l'Atlàntic Nord (vegeu la figura 3). Es van recollir mostres de vuit ambients diferents en dues profunditats (superfície i zona afòtica), i es van construir setze biblioteques genètiques de gens de RNAr 16S d'arqueus amplificats mitjançant PCR. Les biblioteques es van analitzar a partir d'un

TAULA 2. Gèneres de bacteris amb vacúols de gas del gel marí amb espècies diferents en cada pol

Grup bacterià	Gènere	Espècies àrtiques	Espècies antàrtiques
Protobacteri alfa	<i>Octadecabacter</i>	<i>O. arcticus</i>	<i>O. antarcticus</i>
Protobacteri beta	«Iceobacter»	soques 37, 174	soca 90
<i>Cytophaga</i> - <i>Flavobacterium</i> - <i>Bacteroides</i>	<i>Polaribacter</i>	<i>P. filamentus</i>	<i>P. franzmannii</i> <i>P. glomeratus</i> <i>P. irgensii</i>

FONT: Staley i Goslink, 1999.

enfocament jeràrquic de tres fases. Els experiments d'hibridació de la membrana van demostrar que la majoria de clons arqueans s'afiliaven a un dels dos grups d'arqueus marins descrits anteriorment: el grup-I dels Crenarqueotes i el grup-II dels Euriarqueotes. Un clon DNAr dels 2.328 analitzats estava relacionat amb un llinatge euriarqueà diferent, recuperat recentment del plàncton marí profund. En les zones temperades (oceà Pacífic, oceà Atlàntic i mar Mediterrània), es van trobar ambdós grups principals en les dues profunditats investigades. El grup-II predominava a la superfície i el grup-I a les profunditats, mentre que en les aigües antàrtiques i subantàrtiques el grup-II era pràcticament absent. La composició clonal de les biblioteques arqueanes es va investigar a partir d'una anàlisi RFLP i utilitzant dos enzims de restricció tetràmers, que van definir OTU diferenciades. Les OTU així definides eren filogenèticament constants: els clons pertanyents a la mateixa OTU estaven molt relacionats. La diversitat clonal tal com es va provar a partir de l'anàlisi RFLP era baixa, i la majoria de biblioteques estaven dominades per només una o dues OTU. Algunes OTU es van distribuir en mostres de llocs molt allunyats, indicant així la ubiqüitat d'alguns filotips. Així doncs, els arqueus marins sembla que són cosmopolites.

Comparació de bacteris fototròfics marins i d'aigua dolça

Emilio Casamayor va estudiar-ne un exemple que crida a la reflexió (dades no publicades). Va obtenir cultius purs de bacteris púrpura del sofre de fonts diferents. Hi havia dos grups de cultius bacterians. El primer consistia en cultius de *Chromatium purpuratum* de zones marines allunyades que incloïen el mar Carib, la Mediterrània i el mar del Japó (vegeu la figura 3). El segon grup,

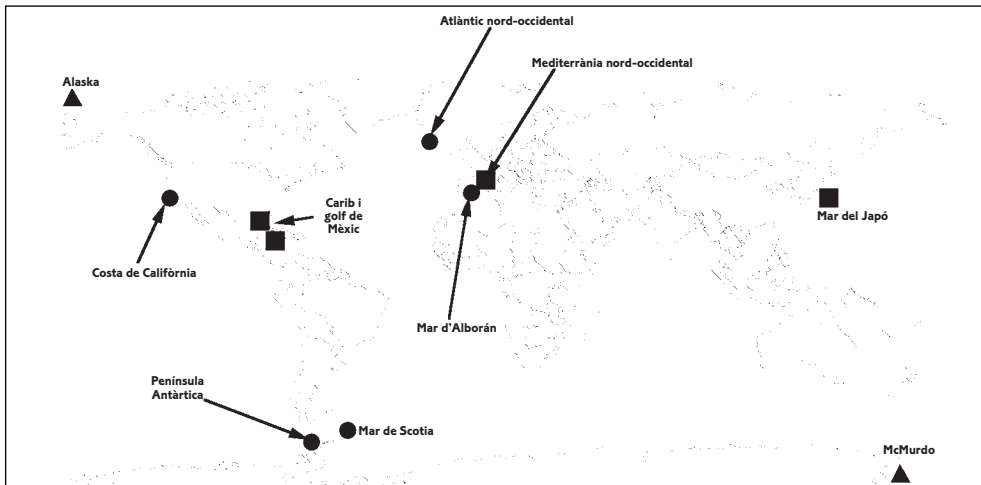


FIGURA 3. Mapa dels oceans del món que mostra les zones esmentades en els diferents exemples utilitzats en el text: cercles, mostres arqueanes a Massana *et al.* (2000); triangles, aïllats bacterians amb vacúols de gas a Staley i Gosink (1999); quadrats, aïllats bacterians fototròfics a Casamayor *et al.* (en preparació).

al seu torn, estava compost per cultius de *Chromatium minus* aïllat de diversos llacs del nord-est d'Espanya. Entre aquests llacs (El Tobar, Banyoles i Estanya) hi ha una distància de tan sols uns centenars de quilòmetres. D'altra banda, les zones marines mostrejades es troben a milers de quilòmetres les unes de les altres. Casamayor va analitzar el baix pes molecular de RNA d'aquests cultius i va comparar entre si els patrons de bandes resultants. Evidentment, els cultius formaven dos grups diferents, un per a cada espècie. Malgrat tot, el més sorprenent que es va descobrir va ser l'alt grau de diversitat dintre de cada grup. Mentre que tots els cultius marins eren pràcticament idèntics, els cultius d'aigua dolça estaven molt vagament relacionats entre si, tot i les distàncies molt més curtes entre els seus ambients originaris. Els bacteris púrpura fototròfics dels llacs viuen en les capes d'aigua anòxiques més profundes, separades de la superfície per les capes òxiques d'aigua poc profunda. Així doncs, potser les capes anòxiques dels llacs actuen com a illes en un món aerobi. Això reduiria la dispersió de bacteris anaerobis d'un llac a un altre i afavoriria la diferenciació de noves espècies endèmiques. A l'oceà, d'altra banda, aquests bacteris tendeixen a viure com a simbiotes de diferents crustacis i els corrents marins en faciliten la dispersió. Aquest exemple il·lustra la nostra ignorància sobre quins ambients és més probable que acullin una gran diversitat microbiana i suggereix que hem de fer un gran esforç d'imaginació per pensar quins ecosistemes poden ser illes per als microorganismes.

Substitució d'espècies bacterianes amb el temps

Casamayor *et al.* (en preparació) van analitzar l'evolució estacional de la comunitat de bacterioplàncton d'un llac meromíctic (estanyol de Vilar, Banyoles) utilitzant simultàniament quatre estudis independents dels cultius, com són la microscòpia, les impressions digitals PCR-DGGE i d'altres seqüenciacions de fragments DNAr de 16S, la hibridació cel·lular completa *in situ* (FISH) i la citometria de flux. A través de la microscòpia òptica es van quantificar evolucions estacionals en massa d'un cianobacteri semblant a un *Synechococcus*, d'un bacteri verd del sofre semblant a un *Chlorobium phaeobacteroides* i d'un bacteri púrpura del sofre semblant a *Thiocystis minor*. Les DGGE van recuperar aquestes poblacions manifestes a més de poblacions pertanyents al filum *Cytophaga* com a membres predominants de la comunitat. Les anàlisis de les seqüències de DNAr de 16S van posar de manifest una major diversitat genètica de la que s'esperava en aquests grups. Així, amb el temps, es van recuperar amb criteri selectiu seqüències amplificades mitjançant PCR de dos *Synechococcus* (98 % de similitud entre si), dos *Cytophaga* (93 % - 99 %) i dues cèl·lules semblants a *Thiocystis* (93 % de similitud). El mètode FISH i la citometria de flux van corroborar la presència en la comunitat de subpoblacions naturals corresponents a seqüències de DNAr de 16S lleugerament diferents. Mitjançant el FISH i la citometria de flux es va fer el seguiment de dues subpoblacions de *Thiocystis* i de dues cèl·lules semblants a *Synechococcus*, respectivament, i es va observar un canvi en la població predominant a la primavera, diferent de la de l'estiu. Les dues poblacions semblants a *Synechococcus* presentaven composicions pig-

mentàries diferents, tal com va revelar la citometria de flux. D'aquesta manera, la funció del gremi es va mantenir, però la identitat de l'espècie microbiana va canviar amb el temps. Aquests resultats posen de manifest que fins i tot en un mateix ecosistema hi ha una diversitat oculta considerable.

Comentaris finals

Margalef (1994) ha introduït una distinció útil entre «biodiversitat» i «diversitat». La biodiversitat seria el nombre total de genomes existents a la Terra. La diversitat de qualsevol ecosistema determinat seria la combinació particular de genomes que formen la comunitat en qualsevol punt concret en el temps. Així, la diversitat d'un ecosistema consistiria en un subconjunt de la biodiversitat del planeta. Si utilitzem una metàfora literària, la biodiversitat seria com el diccionari que conté totes les paraules d'una llengua, mentre que la diversitat serien les paraules concretes (i les seves freqüències relatives) escollides per escriure un llibre determinat.

Potser una manera de fer coincidir l'observació de Baas-Becking amb els exemples d'espècies endèmiques o d'àmbit restringit presentats més amunt és pensar en termes de biodiversitat i diversitat. En el cas dels microorganismes, les grans quantitats i la facilitat de distribució provoca-rien que tot el diccionari estigués disponible en qualsevol punt concret de la Terra. En el cas dels animals i les plantes, en canvi, la biogeografia i la història condicionen que només estigui disponible una part del diccionari en cada lloc i en cada moment. No obstant això, la diversitat de qualsevol ecosistema en un moment determinat serà limitada tant per als microorganismes com per als éssers vius superiors. Pel que fa als microorganismes, només uns quants dels genomes disponibles podran créixer en un conjunt determinat de condicions ambientals. Si aquestes condicions són força constants en el temps (com en les aigües polars) molts genomes presents en formes de resistència i/o en quantitats molt petites mai no podran créixer i formar part del conjunt actiu del sistema. Aleshores, aquests sistemes afavoriran l'aparició d'espècies d'àmbit restringit i fins i tot d'espècies endèmiques. Tot i això, la qüestió de quantes espècies microbianes hi ha haurà d'esperar fins que desenvolupem millors conceptes per descriure què és una espècie microbiana i els mètodes per recuperar espècies microbianes de la natura.

Agraïments

El treball al meu laboratori ha estat finançat per la subvenció de DGICyT PB91-075 i la subvenció de la UE MIDAS MAS3-CT97-0154. Dono les gràcies a Juan Isidro Calderón-Paz, Emilio O. Casamayor, Ramon Massana i Beatriz Díez per la seva dedicació en la resolució dels «misteris» de la diversitat microbiana.

Referències bibliogràfiques

- ATLAS, R. M. (1983). «Diversity of microbial communities». *Adv. Microb. Ecol.*, núm. 7, p. 1.
- BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. [cur.] (1992). *The prokaryotes*. 2a ed. Berlín: Springer.
- BROCK, T. D. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Nova York: Springer.
- BROWN, C. W.; YODER, J. A. (1994). «Coccolithophorid blooms in the global ocean». *J. Geophys. Res.*, núm. 99, p. 7467-7482.
- CASAMAYOR, E. O.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER G.; AMANN, R. *Interpreting microbial diversity at the 16S rRNA level: seasonal succession of highly related ecotypes*. [En preparació]
- CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. [cur.] (1997). *Species the units of biodiversity*. Londres: Chapman and Hall.
- COLWELL, R. R.; CLAYTON, R. A.; ORTIZ-CONDE, B. A.; JACOBS, D.; RUSSEK-COHEN, E. (1995). «The microbial species concept and biodiversity». A: ALLSOPP, D.; COLWELL, R. R.; HAWKSWORTH, D. L. [cur.]. *Microbial diversity and ecosystem function*. Oxon: CAB International, p. 3-15.
- DELONG, E. F.; FRANK, D. G.; ALLDREDGE, A. L. (1993). «Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages». *Limnol. Oceanogr.*, núm. 38, p. 924-934.
- EHRlich, P. R.; WILSON, E. O. (1991). «Biodiversity studies: Science and policy». *Science*, núm. 253, p. 758-762.
- ESTRADA, M.; MARRASÉ, C.; ALCARAZ, M. (1988). «Phytoplankton response to intermittent stirring and nutrient addition in marine microcosms». *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, núm. 48, p. 225-234.
- FINLAY, B. J.; FENCHEL, T. (1999). «Divergent perspectives on protist species richness». *Protist*, núm. 150, p. 229-233.
- FOISSNER, W. (1999). «Protist diversity: estimates of the near-imponderable». *Protist*, núm. 150, p. 363-368.
- FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. (1993). «Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans». *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 59, p. 1294-1302.
- GIOVANNONI, S. J.; BRITSCHGI, T. B.; MOYER, C. L.; FIELD, K. G. (1990a). «Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton». *Nature*, núm. 345, p. 60-63.
- GONZÁLEZ, J. M.; SIMÓ, R.; MASSANA, R.; COVERT, J. S.; CASAMAYOR, E. O.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MORAN, M. A. *Bacterial community structure associated with a DMSP producing North Atlantic algal bloom*. [En premsa]
- HALVORSON, H. O.; PRAMER, D.; ROGUL, M. [cur.] (1985). «Engineered organisms in the environment: scientific issues». *Amer. Soc. Microbiol.* Washington, DC.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. [cur.] (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9a ed. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 787.

- JANNASCH, H. W.; JONES, G. E. (1959). «Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration». *Limnol. Oceanogr.*, núm. 4, p. 128-139.
- LEE, J. J.; HUNTER, S. H.; BOVEE, E. C. [cur.] (1985). «An illustrated guide to the Protozoa». *Soc. Protozoologists*. Kansas.
- MAGURRAN, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton: Princeton Univ. Press.
- MARGALEF, R. (1974). *Ecología*. Barcelona: Omega.
- (1994). «Diversity and biodiversity: Their possible meaning in relation with the wish for sustainable development». *An. Acad. bras. Ci.*, núm. 66 [supl. 1], p. 3-14.
- MARGULIS, L.; CORLISS, J. O.; MELKONIAN, M.; CHAPMAN, D. J. [cur.] (1989). *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones and Bartlett.
- MASSANA, R.; DELONG, E. F.; PEDRÓS-ALIÓ, C. (2000). «A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces». *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 66, p. 1777-1787.
- MAY, R. M. (1981). «Patterns in multi-species communities». A: MAY, R. M. [cur.]. *Theoretical ecology. Principles and applications*. 2a ed. Sunderland: Sinauer Ass. Inc., p. 197-227.
- (1986). «The search for patterns in the balance of nature: advances and retreats». *Ecology*, núm. 67, p. 1115-1126.
- (1988). «How many species are there on Earth?». *Science*, núm. 241, p. 1441-1449.
- MEDLIN, L. K. (1995). «New avenues in understanding oceanic biodiversity (the molecular way)». A: HEMPEL, G. [cur.]. *The ocean and the poles. Grand challenges for European cooperation*. Jena: Gustav Fischer, p. 229-243.
- MEDLIN, L. K.; LABGE, M.; BAUMANN, M. E. M. (1994). «Genetic differentiation among three colony-forming species of Phaeocystis: further evidence for the phylogeny of the Prymnesiophyta». *Phycologia*, núm. 33, p. 199-212.
- MOON-VAN DER STAAY, S. Y.; VAN DER STAAY, G. W. M.; GUILLOU, L.; VAULOT, D. (2000). «Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences». *Limnol. Oceanogr.*, núm. 45, p. 98-109.
- MULLINS, T. D.; BRITSCHGI, T. B.; KREST, R. L.; GIOVANNONI, S. J. (1995). «Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific communities». *Limnol. Oceanogr.*, núm. 40, p. 148-158.
- NATURE INSIGHT (2000). «Biodiversity». *Nature*, núm. 405, p. 207-253.
- PARKES, R. J.; CRAGG, B. A.; BALE, S. J.; GETLIFF, J. M.; GOODMAN, K.; ROCHELLE, P. A.; FRY, J. C.; WEIGHTMAN, A. J.; HARVEY, S. M. (1994). «Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments». *Nature*, núm. 371, p. 410-413.
- PATRICK, R. (1967). «The effect of invasion rate, species pool, and size of area on the structure of the diatom community». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, núm. 58, p. 1335-1342.
- (1975). «Stream communities». A: CODY, M. L.; DIAMOND, J. M. [cur.]. *Ecology and evolution of communities*. Cambridge: Belknap Press, Harvard University, p. 445-459.

- PEDRÓS-ALIÓ, C. (1993). «Bacterioplankton diversity». *Trend Ecol. Evol.*, núm. 8, p. 86-90.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMMAN, R. *The species concept for prokaryotes*. [En premsa]
- SMETACEK, V. (1995). «Biodiversity and production in the water mass». A: HEMPEL, G. [cur.]. *The ocean and the poles. Grand challenges for European cooperation*. Jena: Gustav Fischer, p. 207-216.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. (1994). «Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology». *Int. J. Syst. Bacteriol.*, núm. 44, p. 846-849.
- STALEY, J. T. (1997). «Biodiversity: are microbial species threatened?». *Curr. Opinion Biotechnol.*, núm. 8, p. 340-345.
- STALEY, J. T.; GOSINK, J. J. (1999). «Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria». *Annu. Rev. Microbiol.*, núm. 53, p. 189-215.
- STUART CHAPIN III, F.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S.; SALA, O. E.; HOBBI, S. H.; MACK, M. C.; DÍAZ, S. (2000). «Consequences of changing biodiversity». *Nature*, núm. 405, p. 234-242.
- SUGIHARA, G. (1980). «Minimal community structure: an explanation of species abundance patterns». *Amer. Nat.*, núm. 116, p. 770-787.
- SUSSMAN, M.; COLLINS, C. H.; SKINNER, F. A.; STEWART-TULL, D. E. [cur.] (1988). *The release of genetically-engineered microorganisms*. Londres: Academic Press.
- WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON M. M. (1990). «16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community». *Nature*, núm. 345, p. 63-65.
- WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. (1987). «Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics». *Int. J. Syst. Bacteriol.*, núm. 37, p. 463-464.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. (1998). «Prokaryotes: The unseen majority». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, núm. 95, p. 6578-6583.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. (1990). «Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, núm. 87, p. 4576-4579.