

## Arqueas en el plancton marino

Ramon Massana

Institut de Ciències del Mar, CSIC. Passeig Joan de Borbó s/n, 08039 Barcelona

E-mail: ramonm@icm.csic.es

El mar constituye uno de los hábitats más extensos del planeta y está poblado por una gran variedad de seres vivos. Los organismos que viven en suspensión en la columna de agua forman el plancton marino. El plancton microscópico más pequeño, el picoplancton (0.2 a 2  $\mu\text{m}$  de tamaño), constituye el componente numéricamente mayoritario (cerca de un millón de células por mililitro de agua de mar), y es clave en todos los ciclos biogeoquímicos que ocurren en el mar. La gran mayoría de células del picoplancton son procariotas de tamaño y forma remarcablemente similar. Sin embargo, se sabe que este grupo aparentemente homogéneo está formado por poblaciones diversas, cada una de ellas con un papel ecológico potencialmente diferente. La identificación de procariotas se ha basado tradicionalmente en la obtención de cultivos puros y su caracterización en el laboratorio, pero la gran mayoría de procariotas marinas parecen no ser cultivables [1]. Paralelamente al creciente reconocimiento del papel fundamental del picoplancton en el sistema marino, existía hasta hace poco un gran desconocimiento sobre qué especies lo formaban. Y ésta es una cuestión fundamental para entender como funciona el ecosistema y como podría reaccionar ante alteraciones ambientales.

Durante las décadas de los 60 y 70 se desarrollaron las bases de la taxonomía molecular. Según ésta, la comparación de secuencias de proteínas o ácidos nucleicos permitía elucidar las relaciones entre los seres vivos y establecer un sistema de clasificación filogenético coherente. Para comparar todos los seres vivos se utilizó el gen que codifica el RNA de la subunidad pequeña del ribosoma, rDNA 16S en procariotas y rDNA 18S en eucariotas. Esta molécula es universal, está estructural y funcionalmente conservada y su secuencia de bases es fácilmente alineable. Dicho análisis clasificaba todos los seres vivos en tres Dominios, dos procarióticos (bacterias y arqueas) y uno eucariótico. Pronto se reconoció la capacidad de la taxonomía molecular para identificar los microorganismos de la naturaleza sin necesidad de cultivarlos. Se trataba de extraer directamente el DNA de la comunidad microbiana, secuenciar dicho gen y comparar las secuencias obtenidas con las ya disponibles en las bases de datos. Uno de los primeros problemas que se abordó con esta aproximación fue el de la composición de bacterias en

el Mar de los Sargazos [7]. Los autores construyeron una biblioteca de genes rRNA 16S de bacterias y los resultados fueron espectaculares, ya que la mayoría de secuencias eran muy distantes a las de bacterias en cultivo. La dominancia en el plancton marino de bacterias no cultivadas hizo preguntarse qué ocurría dentro del otro grupo de procariotas, las arqueas.

Las arqueas cultivadas sólo crecen en condiciones extremas: alta temperatura, alta salinidad o anoxia. Es por ello que su presencia en el agua de mar, aeróbica y a temperatura templada, no era esperable. Sin embargo, en bibliotecas genéticas de muestras marinas se detectaron secuencias de rRNA 16S de arqueas [2]. Algunas secuencias, denominadas grupo-I, formaban un cluster dentro las crenarqueas, cuyos miembros cultivados son termófilos. Otras secuencias, denominadas grupo-II, formaban un cluster dentro las euriarqueas, cuyos miembros cultivados incluyen termófilos, metanógenos y halófilos. Las secuencias de arqueas marinas eran muy diferentes de las de arqueas cultivadas y se debían considerar, pues, pertenecientes a nuevos y desconocidos organismos. Desde el descubrimiento de las arqueas marinas se han realizado numerosos estudios para determinar su papel ecológico. Un importante esfuerzo, de momento sin éxito, se ha centrado en obtener algún representante en cultivo puro. Diferentes técnicas moleculares, independientes de los cultivos, han revelado detalles interesantes de este nuevo y apasionante grupo de microorganismos marinos.

¿Cuál es la abundancia de arqueas en el plancton marino? Claramente la respuesta a esta pregunta condicionará la relevancia de su papel ecológico. Mediante hibridación cuantitativa de rRNA extraído de muestras marinas se demostró que en aguas superficiales de la Antártida y en aguas profundas de sistemas templados el rRNA de arqueas podía constituir hasta el 30% del total [3]. Estos primeros resultados se complementaron con perfiles verticales en la costa del Pacífico [10], que demostraron que efectivamente la abundancia relativa de arqueas aumentaba con la profundidad, y en un muestreo más detallado en la Antártida, que reveló que la abundancia relativa de arqueas seguía un ciclo anual predecible, con valores altos durante el invierno y bajos durante el verano austral [12]. La presencia de arqueas en el

plancton marino se confirmó mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*), técnica que además permitía visualizar la morfología de las células [12]. Se observó que la mayoría de arqueas marinas eran de vida libre y que no se podían diferenciar de las bacterias marinas por su tamaño y forma. En una estación del Pacífico se estimó por FISH que las arqueas eran muy abundantes por debajo la zona fótica durante todo el año, con números similares a las bacterias por debajo los 1000 m de profundidad [8]. Así pues, las arqueas marinas variaban espacial y temporalmente en abundancia y podían llegar a codominar, junto con las bacterias, en uno de los biomas más extensos de la tierra, el océano profundo.

La existencia de arqueas marinas se había basado en la detección de secuencias de rRNA, tanto en extractos de ácidos nucleicos como en células enteras. Pronto se detectaron otras señales moleculares que corroboraron estos resultados. En una biblioteca genética en la que se habían clonado directamente fragmentos de DNA marino se detectó un clon con el gen rRNA de arqueas de grupo-I. Este clon contenía además el gen del factor EF2, proteína también utilizada para establecer filogenias globales. El análisis filogenético a partir del gen EF2 confirmó la afiliación del clon dentro las crenarqueas [14]. Por otra parte, todas las arqueas cultivadas tienen lípidos de membrana diferentes de los de bacterias y eucarias, basados en un enlace éter del glicerol con un alcohol. En muestras marinas donde las arqueas que dominaban eran del grupo-I se detectaron moléculas derivadas de estos lípidos, en particular diferentes variedades cíclicas y acíclicas de bifitano que son características de arqueas termófilas extremas [4]. Se demostraba pues que las arqueas marinas compartían otras propiedades celulares, como los lípidos de membrana, con las arqueas cultivadas.

La primera descripción de arqueas marinas demostró la existencia de dos grupos filogenéticamente distantes [2]. Ambos grupos parecían ocupar diferentes profundidades de la columna de agua, ocupando nichos ecológicos diferentes. Así, en aguas costeras del Pacífico las arqueas de grupo-II dominaban en superficie, mientras que las de grupo-I dominaban en profundidad [10]. El análisis de bibliotecas genéticas de diferentes sistemas reveló el mismo patrón en otros sistemas templados, como el Mediterráneo y el Atlántico Norte [11]. En contraste, en aguas de la Antártida se detectaron casi exclusivamente arqueas de grupo-I, tanto en superficie como en profundidad. Las arqueas de grupo-I parecían ser siempre el

**Ramon Massana** es Licenciado y Doctor en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona, donde presentó su tesis en octubre de 1993. Su trayectoria investigadora se caracteriza por el estudio de la estructura de las comunidades microbianas que viven en



suspensión en lagos y océanos desde diferentes perspectivas, como las relaciones tróficas, la estructura de tamaños o la diversidad filogenética. Entre 1995 y 1997 realizó una estancia postdoctoral en el Marine Science Institute de la Universidad de California, Santa Bárbara (Estados Unidos) en el equipo del Dr. E.F. DeLong, donde se incorporó al estudio del papel ecológico de las arqueas marinas aplicando técnicas moleculares. Desde junio de 1997 trabaja en el Institut de Ciències del Mar (CSIC) de Barcelona como investigador contratado. Sus intereses actuales se centran en el estudio de la diversidad de los microorganismos marinos, bacterias, arqueas y eucarias, y la descripción de patrones espaciales y temporales de variación de dichos grupos en el mar. Ha participado en numerosos proyectos de investigación y en diversas campañas oceanográficas, y presentado sus resultados en revistas científicas internacionales de gran prestigio, como *Applied and Environmental Microbiology*, *Limnology and Oceanography* y *Aquatic Microbial Ecology*, y en diversos congresos científicos.

grupo dominante, a excepción de las aguas superficiales (primeros 40 metros) de sistemas templados. El análisis exhaustivo de estas bibliotecas también permitió investigar la presencia de nuevos linajes de arqueas marinas. Se detectó un nuevo grupo de euriarqueas, el grupo-III [5], que formaba una fracción muy minoritaria de clones en aguas muy profundas. Recientemente se ha descrito un cuarto grupo, perteneciente a euriarqueas, también recuperado a partir de muestras de plancton profundo [9].

Las secuencias recuperadas de arqueas marinas se relacionaban entre sí formando clusters, conjunto de secuencias parecidas pero suficientemente diferentes como para pertenecer a diferentes unidades taxonómicas. Esta microdiversidad es un fenómeno muy frecuente en comunidades naturales de microorganismos, y podría explicarse en parte por especies similares adaptadas a nichos ecológicos ligeramente distintos. El análisis filogenético de las arqueas marinas mostraba que alguno de los clusters dentro del grupo-I o del grupo-II contenía secuencias detectadas sólo en superficie o en profundidad [6,11]. La similitud entre clones venía pues más determinada por la profundidad de origen en la columna de agua que

por la proximidad geográfica. De hecho, clones obtenidos en muestras separadas por miles de kilómetros pero a la misma profundidad podían ser casi idénticos. En general, la diversidad de arqueas marinas era limitada. Es más, una sola población de arqueas del grupo-I parecía ser cosmopolita y dominar en sistemas tan distantes como el Mediterráneo, el Atlántico Norte, la costa del Pacífico y la Antártida.

Para explicar la presencia de arqueas en el plancton marino podrían plantearse diversas hipótesis. La primera es que son autóctonas del plancton aeróbico y crecen a partir de sustancias disueltas, como se considera que lo hacen la mayoría de bacterias marinas. La segunda es que crecen en microhábitats planctónicos anaeróbicos, como partículas en sedimentación o el sistema digestivo de animales, y cuando son liberadas al medio están inactivas. La tercera es que tienen un origen remoto, en lugares tales como surgencias hidrotermales submarinas, desde los cuales se dispersan en el plancton. La abundancia de arqueas marinas, así como la predictibilidad de su distribución y dinámicas espaciales y temporales, sugieren que son un componente autóctono del plancton. De hecho, algunos análisis moleculares han detectado crenarqueas en sedimentos marinos y de lagos y en suelos agrícolas y forestales, formando clusters emparentados con las crenarqueas marinas. Estas diferentes crenarqueas no termófilas parecen ser un componente activo de dichos sistemas. Pero la confirmación definitiva del estado activo de las arqueas en el plancton de aguas templadas y aeróbicas se presenta en un reciente trabajo en que se demuestra la incorporación de aminoácidos por las arqueas marinas [13].

Los resultados obtenidos durante los últimos diez años han revelado que las arqueas marinas son un componente esencial del sistema planctónico y que su abundancia y composición cambia según escalas espaciales y temporales identificables. Probablemente participen en diferentes ciclos biogeoquímicos, aunque su contribución es todavía desconocida, y se prevén diferentes papeles ecológicos para los dos principales grupos detectados. Las arqueas marinas más abundantes, las crenarqueas de grupo-I, parecen provenir de la adaptación de un antecesor termófilo a condiciones templadas y posterior colonización de diferentes hábitats, entre ellos la columna de agua de mar. Las líneas del futuro pasarán por la aplicación de nuevas e imaginativas estrategias de aislamiento para conseguir algún representante en cultivo puro, y de técnicas que permitan estudiar la actividad (o función) de los microorganismos *in situ*. Las arqueas marinas constituyen un

claro ejemplo de un grupo de organismos hasta hace poco totalmente desconocidos pero con una relevancia indiscutible en la naturaleza.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
2. DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5685-5689.
3. DeLong EF, Wu KY, Prézelin BB, Jovine RVM (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371:695-697.
4. DeLong EF, King LL, Massana R, Cittone H, Murray AE, Schleper C, Wakeham SG (1998) Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1133-1138.
5. Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356:148-149.
6. García-Martínez J, Rodríguez-Valera F (2000) Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of group I. *Mol. Ecol.* 9:935-948.
7. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.
8. Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.
9. López-García P, Moreira D, López-López A, Rodríguez-Valera F (2000) A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. *Environ. Microbiol.* 3: 1-8.
10. Massana R, Murray AE, Preston CM, DeLong EF (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 50-56.
11. Massana R, DeLong EF, Pedrós-Alió C (2000) A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1777-1787.
12. Murray AE, Preston CM, Massana CM, Taylor LT, Blakis A, Wu K, DeLong EF (1998) Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2585-2595.
13. Ouverney CC, Fuhrman JA (2000) Marine planktonic archaea take up amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4829-4833
14. Stein J, Marsh TL, Wu KY, Shizuya H, DeLong EF (1996) Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine Archaeon. *J. Bacteriol.* 178:591-599.