

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013*

# CONTROL CLIMÁTICO DE LA COLONIZACIÓN BACTERIANA REMOTA MEDIANTE AEROSOLAS ATMOSFÉRICOS EN EL PARQUE NACIONAL DE AIGÜESTORTES I ESTANY DE SANT MAURICI

EMILIO O. CASAMAYOR<sup>1</sup>, JOAN CÁLIZ<sup>1</sup> Y XAVIER TRIADÓ-MARGARIT<sup>1</sup>

## RESUMEN

Por su gran abundancia y ubicuidad, diversidad genética y metabólica y exacerbada capacidad de respuesta frente a los cambios en su entorno, los microorganismos son excelentes sensores precoces de cambios ambientales y actores principales de la respuesta de los ecosistemas. Las investigaciones que desarrollamos en el entorno del Parque Nacional de Aigüestortes dentro de la estrategia de seguimiento a largo plazo de la red LTER (Long Term Ecological Research) se centran en determinar la respuesta de los microorganismos a uno de los efectos del Cambio Global, el aumento de la carga de aerosoles como vehículo que incrementa la dispersión global y la ubicuidad de los microorganismos, algunos de ellos potencialmente patógenos.

**Palabras clave:** aerosol, bacterias patógenas, biodiversidad, cambio global, dispersión, lagos alpinos, polvo sahariano, seguimiento LTER.

## SUMMARY

Microbes are extremely abundant and ubiquitous on Earth, with a huge genetic and metabolic diversity and a large ability to quickly react to any change in environmental conditions. They are therefore excellent sensors of environmental changes and one of the main actors in the ecosystems response. Our investigations carried out in the Aigüestortes National Park are focused on the response of microbes to the Global Change within the Spanish Long Term Ecological Research network (LTER). In this investigation we focus on the terrestrial aerosols as a natural mechanism for global dispersal and ubiquity of microorganisms.

**Key words:** aerosol, alpine lakes, bacterial pathogens, biodiversity, dispersal, global change, Saharan dust, LTER.

<sup>1</sup> Observatorio Limnológico de Pirineos (LOOP)-LTER Aigüestortes. Centro de Estudios Avanzados de Blanes-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEAB-CSIC). Acc. Cala Sant Francesc, 14, 17300 Blanes (Girona). Tel +34 972 336 101 (ext. 246). Fax +34 972 337 806. E-mail: casamayor@ceab.csic.es. Website: <http://nodens.ceab.csic.es/ecogenomics>.

## INTRODUCCIÓN

Las presiones que la especie humana viene ejerciendo sobre su entorno en general y sobre los ecosistemas en particular, están provocando alteraciones profundas en el entramado del sistema Tierra y en la provisión de bienes y servicios que proporciona, sobrepasando en algunos casos los límites considerados «seguros» para el mantenimiento del equilibrio actual (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009). La estabilidad ambiental de la que ha disfrutado el planeta en los últimos 10.000 años, durante el Holoceno, ha favorecido el desarrollo masivo de la agricultura, la civilización y la tecnología, con un crecimiento de la especie humana sin precedentes, pero a costa de una alteración profunda de su entorno natural. De hecho, se ha llegado a comparar la magnitud de las perturbaciones introducidas por el hombre con las producidas en épocas geológicas pasadas, bautizándose con el término «Antropoceno» el período que se inicia a partir de la revolución industrial y en el cual las actividades humanas son el principal motor de cambio ambiental (Tabla 1). La estabilidad del Holoceno inicialmente prevista para como mínimo unos cuantos miles de años más, se encuentra por tanto claramente comprometida, así como la viabilidad

de las sociedades humanas contemporáneas. Las tasas de alteración del ecosistema y pérdida de patrimonio natural, lejos de ralentizarse, se siguen acelerando y sobrepasan con creces los mecanismos naturales de regeneración, adaptación y diversificación abocándonos a una situación de declive constante e irreversible del patrimonio natural que puede desembocar en una situación de no retorno y de crisis sistémica global definida por cambios abruptos y rápidos en el sistema Tierra (BARNOSKY *et al.*, 2012).

Para algunos de estos motores de cambio global se ha cuantificado su grado de alteración sobre el sistema Tierra respecto a los límites considerados «seguros», entre ellos las alteraciones en el ciclo del nitrógeno, los cambios en el uso del suelo o la pérdida de biodiversidad (Tabla 1). Los efectos del aumento de la concentración de partículas totales en la atmósfera (aerosoles) se encuentran, sin embargo, no cuantificados (Tabla 1). El principal contribuyente es el polvo del suelo que supone casi la mitad de las emisiones naturales y el 43% de las emisiones totales. El desierto del Sahara-Sahel genera el 50% de esa producción mundial de polvo, con unos patrones de distribución fuertemente ligados a la circulación general atmosférica pero con episodios de intrusión

PROCESO	GRADO DE ALTERACIÓN	INCREMENTO RESPECTO AL LÍMITE (valor = 1)
<b>Aumento de la carga de aerosoles</b>	<b>DESCONOCIDO</b>	-
Toxificación de la biosfera	DESCONOCIDO	-
Cambio climático	ALTO	1,10
Acidificación de los océanos	CERCANO AL LÍMITE	0,95
Desgaste de la capa de ozono estratosférico	CERCANO AL LÍMITE	0,97
Alteraciones en el ciclo del nitrógeno	MUY ALTO	3,46
Alteraciones en el ciclo del fósforo	DENTRO DEL LÍMITE	0,82
Cambios en el uso del suelo	DENTRO DEL LÍMITE	0,78
Cambios en el ciclo hidrológico	DENTRO DEL LÍMITE	0,65
Pérdida de biodiversidad	EXTREMO	>10

**Tabla 1.** Principales motores del cambio global y estima de su grado de alteración sobre el sistema Tierra respecto a los límites considerados «seguros» para la estabilidad ambiental de los últimos 10.000 años (Holoceno), mas allá de los cuales se podría desembocar en un cambio de estado irreversible (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009).

**Table 1.** Earth-system processes and associated thresholds in the desirable Holocene state (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009).

*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013*

en Europa ligados al posicionamiento de borrascas y anticiclones en la zona del golfo de Cádiz y sur del Mediterráneo, respectivamente. Dentro de este contexto, el transporte de microorganismos a largas distancias (miles de kilómetros) por vía aérea mediante aerosoles atmosféricos ha cobrado un renovado interés ligado a los mecanismos de dispersión ya que supone la movilización anual por todo el planeta del orden de 10 trillones de microorganismos (GRIFFIN *et al.*, 2002) que pueden ser estudiados con la aplicación de las técnicas de biología molecular basadas en el análisis y la secuenciación del material genético. Para ello existe un acuerdo más o menos extendido en utilizar la secuencia del gen ribosómico RNA 16S y un rango de valores de identidad en dicha secuencia (97-98%) como aproximación a la unidad biológica de estudio («especie»). Esta definición operacional ha permitido establecer un marco de trabajo comparativo y objetivo para empezar a discernir la magnitud de la biodiversidad microbiana, abordar cuestiones biogeográficas y evolutivas e identificar con razonable precisión la presencia de microorganismos de interés ecológico o sanitario.

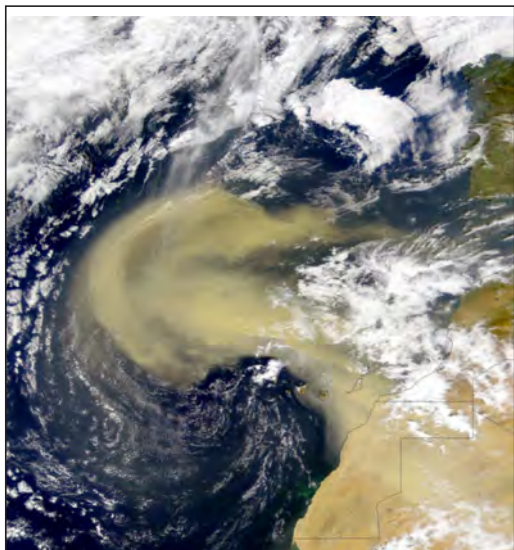
Por su gran abundancia y ubicuidad, los microorganismos tienen un papel central en los flujos biogeoquímicos globales y en el devenir de gases con efecto invernadero. Junto a esto, presentan gran capacidad de respuesta rápida frente a los cambios en su entorno y una composición filogenética extraordinariamente rica y diversa, con un potencial metabólico muy amplio desarrollado a lo largo de su dilatada historia evolutiva. Estos atributos les permiten reaccionar frente a un gran repertorio de moléculas, incluso aquéllas presentes a muy bajas concentraciones, y desarrollarse masivamente a partir de un único individuo en intervalos de tiempo muy cortos. Las investigaciones que desarrollamos en el entorno del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici se centran en determinar cómo los microorganismos responden o se ven afectados por el aumento de la carga de aerosoles, especialmente los de origen terrestre, como vehículo que incrementa la dispersión global y ubicuidad de los microorganismos gracias al transporte atmosférico (e.g., HERVÀS *et al.*, 2009, VILA-COSTA *et al.*, 2013, BARBERÁN *et al.*, 2014). Estos estudios

realizados en el Observatorio Limnológico de los Pirineos se integran dentro de la estrategia de seguimiento a largo plazo de la red internacional LTER (Long Term Ecological Research Network) en el nodo Aigüestortes LTER-Spain.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha trabajado en diferentes lagos dentro del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici situados en un rango de altitud entre los 1.600 y los 2.400 m utilizando la comunidad bacteriana presente en la interfase aire-agua (neuston) y en la columna de agua como sensor de la entrada de bacterias inmigrantes aerotransportadas y del éxito de su colonización, respectivamente. Las muestras de plancton se tomaron sobre el punto de mayor profundidad de los lagos integrando el primer metro de la columna de agua. El neuston se recogió utilizando una malla de nylon que permitía muestrear los primeros 400  $\mu\text{m}$  de espesor de la interfase aire-agua (CASAMAYOR, 2011; VILA-COSTA *et al.*, 2013). Para los análisis del material genético, las células se recogieron mediante filtración por vacío en membranas de policarbonato, se sometieron a procesos de digestión celular, desproteinización del material genético y purificación del ADN. El gen 16S rRNA se amplificó selectivamente por PCR utilizando cebadores específicos y pirosecuenciación FLX Roche 454 para bacterias (BARBERÁN *et al.*, 2014) o bien mediante clonación y secuenciación en el caso de archaea (AUGUET y CASAMAYOR, 2013). Para los eucariotas microscópicos se utilizó como marcador el gen ribosómico del RNA 18S (TRIADÓ-MARGARIT y CASAMAYOR, 2012). La identidad y relación filogenética de las secuencias fueron determinadas mediante BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el software ARB ([www.arb-home.de](http://www.arb-home.de)), respectivamente. La identidad de los taxones se estableció bien a nivel de especie ( $\geq 97\%$  de identidad) o bien a nivel de género (95-97% identidad). El grado de novedad se determinó mediante búsqueda mediante BLASTn en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, actualizado a Mayo 2014).

Las masas de polvo (Foto 1) fueron estimadas mediante la información suministrada en la página



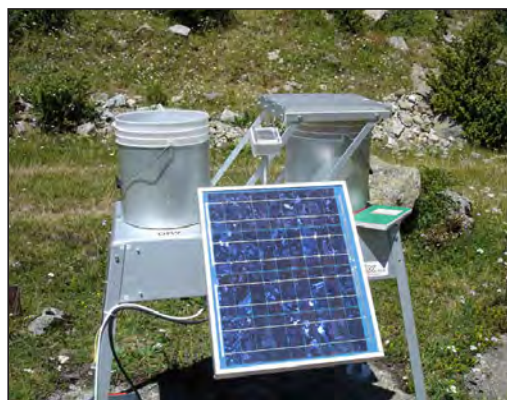
**Foto 1.** Imagen de satélite de una pluma de polvo sahariano desplazándose hacia el oeste sobre el Océano Atlántico. El tamaño de la masa de polvo es equivalente al de la Península Ibérica (borde superior derecho). Crédito foto NASA.

**Picture 1.** Satellite picture of a dust cloud off the Sahara desert moving west over the Atlantic Ocean. The size of the dust cloud is equivalent to the Iberian Peninsula (top on the right). Credit photo NASA.

web <http://www.calima.ws/> fruto del convenio de colaboración para el estudio y evaluación de la contaminación atmosférica por material particulado en suspensión en España entre la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, el CSIC (a través del Instituto de Ciencias de la Tierra «Jaume Almera») y la Agencia Estatal de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. También se utilizó datos de la sonda TOMS de la NASA (Total Ozone Mapping Spectrometer, [http://toms.gsfc.nasa.gov/aerosols/aerosols\\_v8.html](http://toms.gsfc.nasa.gov/aerosols/aerosols_v8.html)).

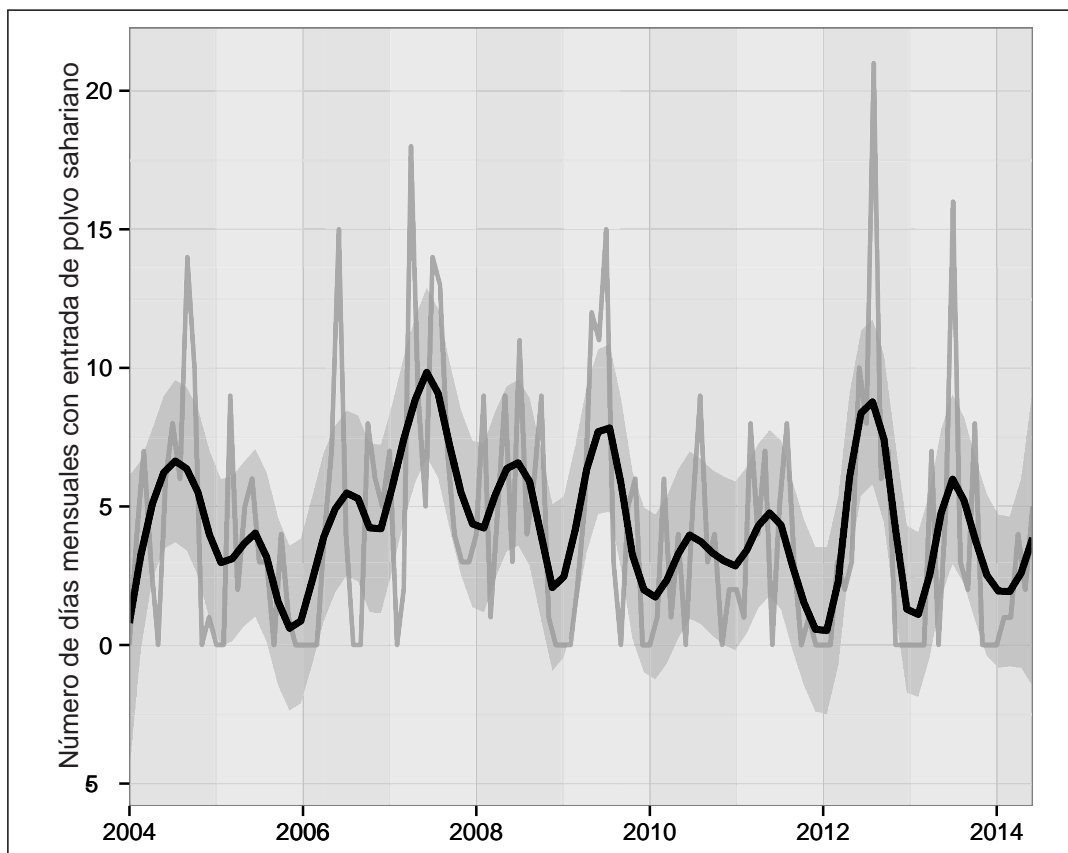
Las muestras de polvo atmosférico de las fracciones húmeda y seca se recolectaron mediante un colector pasivo automático conectado a una célula higrosensible (MTXARS 1010, MTX, Bologna, Italy) de 667 cm<sup>2</sup> de área y localizado en las cercanías del lago Llebre a, aproximadamente, 1.800 metros de altitud y dentro de la zona protegida del Parque Nacional (Foto 2). Las

muestras de la deposición húmeda (lluvia, nieve) eran recogidas de manera periódica (quincenalmente) y se relacionaron con los valores de deposición obtenidos a partir de datos de satélite y modelización numérica. Las bacterias detectadas fueron aquellas capaces de desarrollarse en el colector entre períodos de recogida y, por tanto, la estructura de la comunidad final pudo experimentar cambios respecto a la comunidad inicial. Las intrusiones de polvo sahariano seguidas durante el período 2004-2014 muestran un patrón interanual, presentando una mayor frecuencia en primavera-verano (Figura 1). En este trabajo se ha analizado la parte del seguimiento temporal correspondiente al período 2007-2010.



**Foto 2.** Colector atmosférico pasivo automático conectado a una célula higrosensible localizado dentro de la zona protegida del Parque Nacional d'Aigüestortes con contenedores de precipitación seca y húmeda.

**Picture 2.** Automatized dry / wet passive atmospheric collector installed within the protected area of the National Park.



**Figura 1.** Número de días por mes con entradas de polvo sahariano detectadas en el noreste de España de 2004 a 2014. La tendencia temporal se muestra mediante una regresión polinómica local (loess; en color negro), con el intervalo de confianza al 95% sombreado.

**Figure 1.** Number of days per month with Saharan dust intrusion in Northeast Spain from 2004 to 2014. Temporal trend is shown by a local polynomial regression (loess; in black) with shaded 95% confidence interval.

La presencia de patógenos potenciales se estimó mediante análisis BLASTn de las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas de aerosoles, plancton y neuston, frente a una base de datos de 275 especies de bacterias patógenas conocidas repartidas en distintas categorías según el tipo de huésped y/o órganos afectados. Estos resultados se contrastaron con las asignaciones taxonómicas obtenidas con la base de datos de referencia SILVA 111, reteniendo sólo aquellas secuencias con resultados coincidentes en ambas bases de datos. Estos resultados han de interpretarse con cautela ya que las especies detectadas fueron

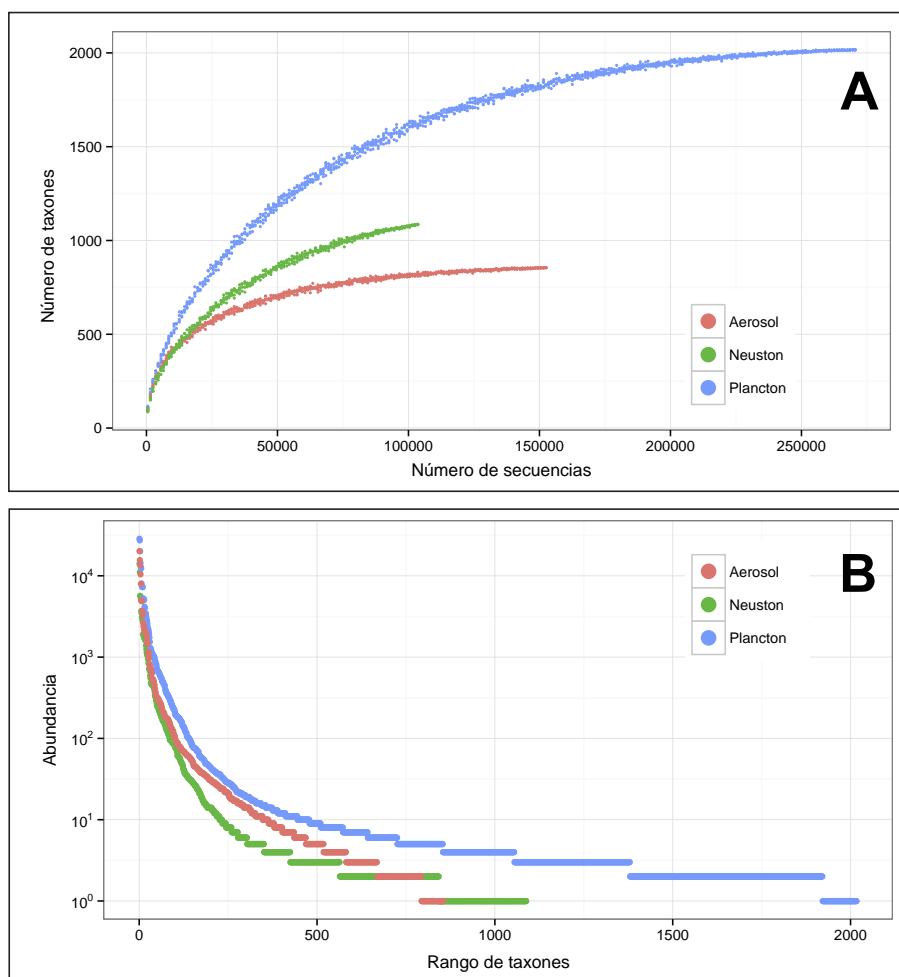
consideradas patógenos potenciales porque la resolución del gen rRNA 16S no permite asegurar que se trate exactamente de las variedades virulentas. Para ello, son necesarios estudios con marcadores específicos de virulencia ya que en muchos casos la patogenicidad viene codificada en elementos genéticos móviles tipo plasmídico. Nuestra aproximación sí que permite asegurar que poblaciones muy próximas a variedades virulentas tuvieron la capacidad de dispersarse de forma viable mediante aerosoles, a pesar de no disponer de mecanismos de resistencia conocidos (principalmente esporas).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estructura de la comunidad bacteriana en plancton, neuston y aerosoles y presencia de inmigrantes exitosos

La estructura de las comunidades bacterianas se determinó mediante el análisis de más de 500.000 secuencias de la región V4-V5 del gen 16S rRNA en muestras provenientes de un seguimiento anual de 4 lagos (n= 59, tanto de neuston como

de plancton), y de la dinámica interanual de aerosoles (deposición húmeda en el período 2007-2010, n= 65). Abordar con garantías este tamaño de muestra ha sido posible gracias a la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva utilizadas en este trabajo. Las curvas de rarefacción indicaron una buena cobertura en los tres tipos de muestras (Figura 2A), con un esfuerzo de secuenciación entre aproximadamente 100.000 y 270.000 secuencias requeridas para cubrir la mayor parte de la riqueza genética. Se observó



**Figura 2.** Curvas de rarefacción (A) y rango-abundancia (B) realizadas a partir de todas las muestras analizadas de lagos de Pirineos (plancton y neuston) y aerosoles.

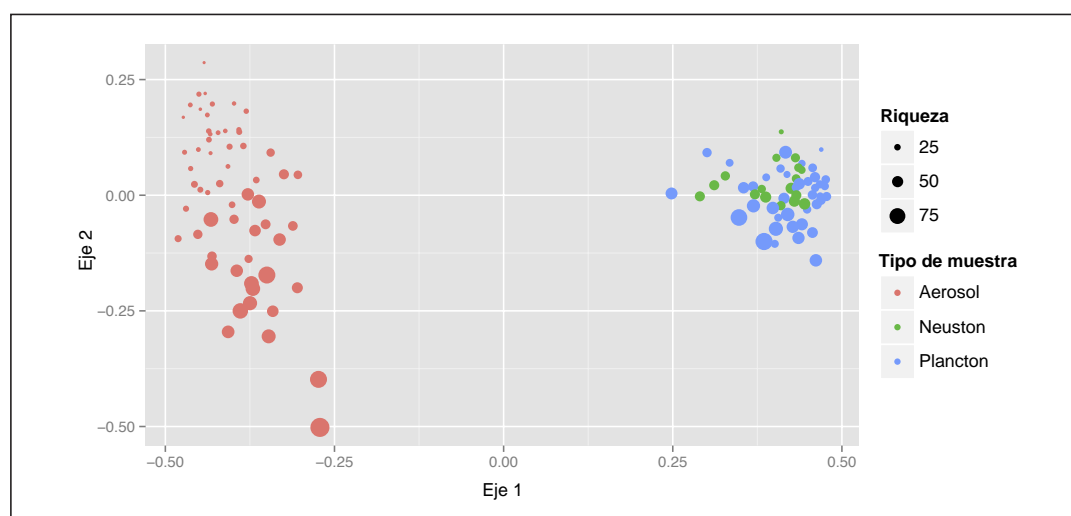
**Figure 2.** Rarefaction (A) and rank-abundance curves (B) for the whole Pyrenean lakes (plankton and neuston) and aerosol dataset.

que en el plancton se acumulaba una riqueza mayor de taxones bacterianos (alrededor de 2000) en comparación con el neuston o las muestras de aerosoles. La estructura de la comunidad bacteriana en los tres tipos de muestras mediante un análisis de rango-abundancia (Figura 2B) mostró que el 90% de las secuencias se agrupaban dentro de unos pocos taxones (el 4-7% del total de taxones) en los tres casos. En las muestras de plancton se observó el mayor número de poblaciones poco abundantes, con una larga cola de especies raras poco abundantes que explican la mayor riqueza bacteriana acumulada en este ambiente.

Un análisis de ordenación reflejó claramente (ANOSIM  $R = 0,77$ ,  $p$ -valor 0.001) que la composición en la comunidad «aerosol» a nivel de abundancia relativas de géneros bacterianos presentes fue en conjunto muy diferente de las presentes en las comunidades de plancton y neuston (NMDS, Figura 3). Este resultado está en consonancia con el hecho que el 80% de los géneros detectados en el neuston son comunes en el plancton (diagrama de Venn, Figura 4). Sin embargo, solo el 50% de los géneros bacterianos del plancton se detectan en el neuston. Esto indicaría

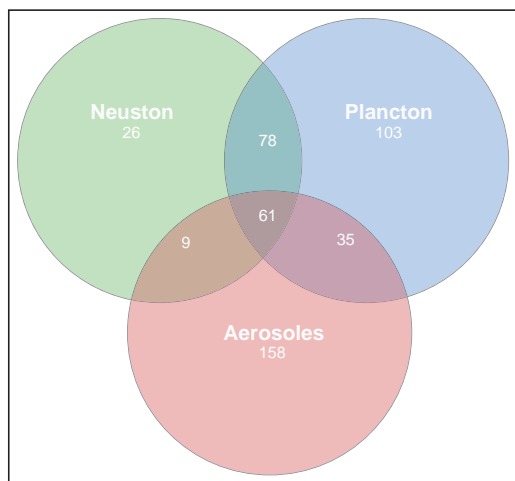
que las condiciones ambientales imperantes en la interfase aire-agua son ciertamente diferentes del resto de la columna de agua imposibilitando el desarrollo de la mayoría de bacterias planctónicas, y/o seleccionado poblaciones neustónicas específicas o bien acumulando células de orígenes diversos (locales de la cuenca o alóctonas aerotransportadas) algunas de ellas en estado fisiológico precario (SARMENTO *et al.*, 2014).

Los bioaerosoles presentaron una riqueza mayor de géneros bacterianos en las muestras recogidas durante los períodos invernales (Figura 3). Hemos observado también que la composición de la comunidad aerotransportada repite un patrón similar de forma interanual (BARBERÁN *et al.*, 2014) y que los aerosoles transportados durante los diferentes inviernos y veranos albergan comunidades bacterianas más cercanas entre ellas, respectivamente, que durante la primavera y el otoño, mucho más variables interanualmente y por tanto de peor predicción. A pesar de que las intrusiones de polvo sahariano también mostraron un patrón interanual (Figura 1), resulta todavía difícil establecer conexiones debido a que la fracción analizada en este trabajo respecto a toda la serie interanual recolectada es limitada.



**Figura 3.** Ordenación NMDS de las comunidades presentes en lagos de Pirineos (plancton y neuston) y aerosoles basado en la similitud de géneros bacterianos. El tamaño de los puntos se corresponde con la riqueza de géneros.

**Figure 3.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot of communities from Pyrenean lakes (plankton and neuston) and aerosol based on bacterial genera composition. Size corresponds to genera richness.



**Figura 4.** Diagrama de Venn presentando los géneros compartidos entre los distintos tipos de muestras analizadas. Los géneros compartidos entre aerosoles y plancton fueron analizados con más detalle como potenciales inmigrantes exitosos.

**Figure 4.** Venn diagram showing bacterial genera overlapping among the different samples analyzed. The genera shared between atmospheric deposition and plankton samples were further inspected in detail to determine its potential as successful colonizers.

Mejorar el diagnóstico y establecer pronósticos más ajustados requiere de una serie sostenida y más larga de la disponible hasta la fecha, objetivo prioritario en los seguimientos LTER. En esta dirección apunta el nuevo proyecto DISPERSAL (OAPN 829/2013) que cubrirá la recolección de muestras durante el período 2014-2016 y el análisis molecular del tramo de la serie 2010-2013.

Como aproximación a la identificación de géneros de bacterias inmigrantes de colonización exitosa en lagos del Parque (por tanto presentes por encima de un cierto umbral en el plancton) se analizaron los valores de abundancia relativa promedio para el total de 96 taxones compartidos aerosol-plancton (Figura 4). Sólo aquéllos que presentaron un valor de abundancia promedio  $> 1\%$  en el plancton (equivalente a más de 1 millón de células por litro de agua del lago) y con una presencia notable en muestras de aerosol ( $\geq 1\%$ ) fueron identificados como géneros inmigrantes con potencial colonizador. Entre éstos se encontraron los géneros *Acidovorax*, *Pseudomonas*

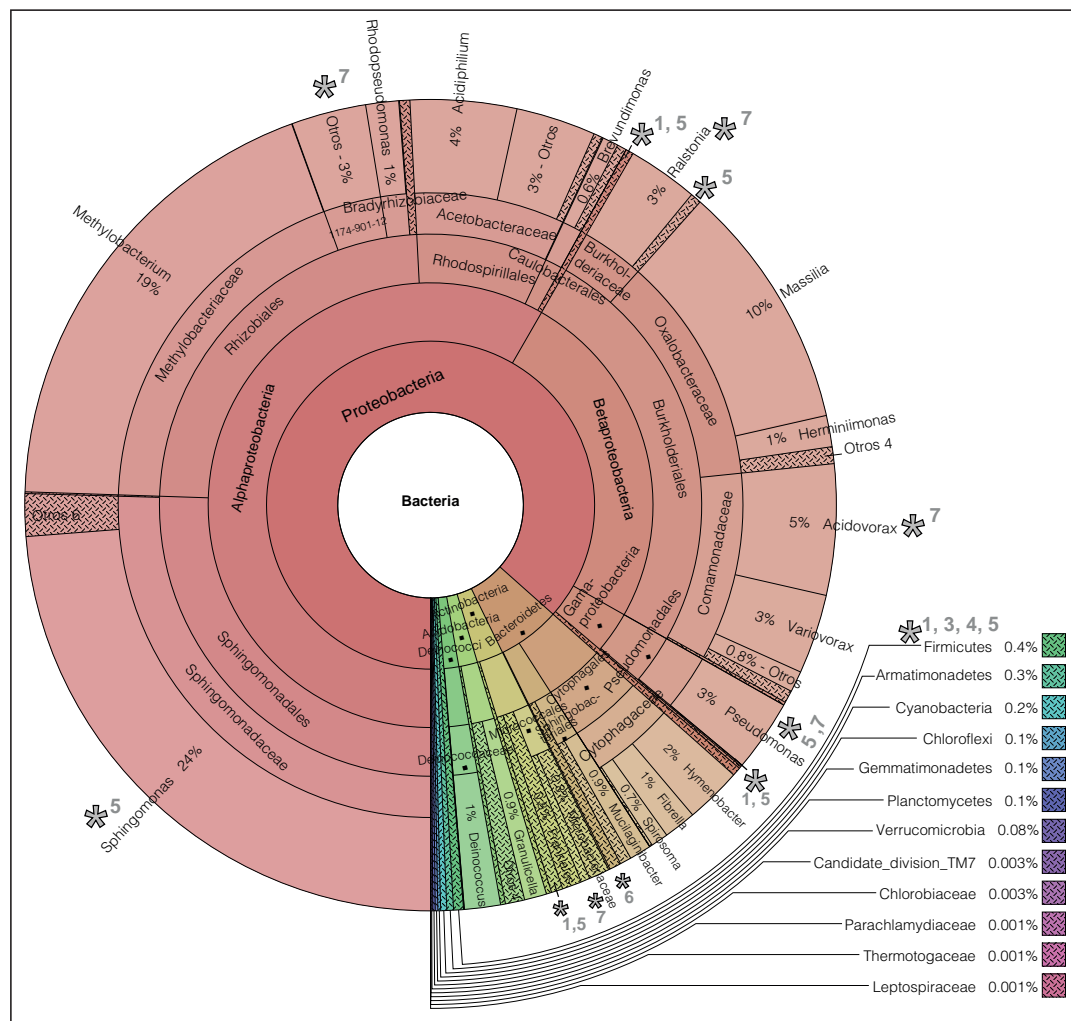
y *Novosphingobium*. Debido al potencial patogénico de algunas de las especies incluidas en los géneros *Acidovorax* y *Pseudomonas*, éstas se comentarán con más detalle en el siguiente apartado. Curiosamente, algunos géneros típicamente de ambientes acuáticos con abundancias destacables en el plancton (en algunos casos identificables como el taxón dominante) fueron también detectados en aerosoles, aunque de forma testimonial. Este fue el caso de los géneros *Limnohabitans*, *Flavobacterium*, *Sediminibacterium* y *Arcicella*, lo que indicaría que estos organismos planctónicos también podrían utilizar el medio atmosférico para su dispersión exitosa a nuevos ambientes acuáticos en forma de bioaerosoles.

#### Composición taxonómica del bioaerosol e identificación de bacterias patógenas potenciales

La composición de la comunidad aerotransportada a nivel de géneros bacterianos presente en los colectores de deposición húmeda ( $n=65$ ; 263 géneros bacterianos identificados) se analizó con más detalle utilizando la herramienta de visualización Krona de forma jerarquizada taxonómicamente e incluyendo datos de abundancia relativa (Figura 5). Tres géneros, *Sphingomonas*, *Methylobacterium* y *Massilia*, presentaron abundancias relativas  $> 10\%$  de las secuencias mientras que un amplio abanico de géneros pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos no superaron en ningún caso el 5% (ver detalle en Figura 5). Debido al diseño experimental y sistema de muestreo utilizados en este trabajo (recolección quincenal de la deposición acumulada en colectores de precipitación húmeda), estos resultados deben interpretarse como el conjunto de bacterias aerotransportadas viables que se han seleccionado del total depositadas. De este modo, no es posible tener una estima de la abundancia de microorganismos inicialmente presentes en el aire, pero sí de aquéllos con potencial para desarrollarse. La variedad de taxones detectados contrasta sin embargo con la idea preconcebida de que mayoritariamente bacterias formadoras de esporas (*Actinobacteria* y *Firmicutes*) serían viables en la atmósfera.



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013



**Figura 5.** Visualización de datos jerárquica de las abundancias relativas de géneros bacterianos encontrados en muestras de deposición atmosférica. Los géneros que pueden presentar patógenos potenciales han sido marcados con un asterisco. Los números que acompañan a los asteriscos se corresponden con distintas categorías de patógenos (ver texto y figura 6).

**Figure 5.** Hierarchical data visualization of taxonomic abundances from bacteria found in atmospheric deposition samples. The genera potentially including pathogenic species are marked with an asterisk. Numbers accompanying asterisks indicate pathogenic type classification (see main text and Figure 6 for details).

La presencia de potenciales patógenos dentro de este conjunto de géneros se estudió mediante análisis de identidad de la secuencia del gen del 16S rRNA. De nuevo estos resultados deben interpretarse con cautela ya que incluso valores de identidad del 100% requieren confirmación de la capacidad patogénica con marcadores genéticos

más específicos ligados a factores de virulencia (DNA plasmídico). Lo que sí permiten resaltar estos resultados es que especies o cepas muy próximas a patógenos tuvieron la capacidad de dispersarse de forma viable mediante bioaerosoles. Estos «patógenos potenciales» fueron agrupados en 7 categorías: (i) Respiratorios, y procesos fe-

CASAMAYOR, E.O. Y COLS.

«Control climático de la colonización bacteriana»

briles; (ii) entéricos; (iii) piel y tejidos blandos; (iv) patógenos específicos de vísceras y (v) oportunistas (todos ellos afectando a mamíferos, especie humana incluida); (vi) patógenos de peces y/o anfibios; (vii) patógenos de plantas. Los patógenos oportunistas sólo suponen una amenaza para individuos con el sistema inmune debilitado y fueron, junto a los patógenos de plantas, los que se detectaron de forma más abundante.

La abundancia relativa de dichos patógenos potenciales se mantuvo generalmente baja (<1%) a lo largo del período estudiado tanto en aerosoles (Tabla 2) como en el agua (Tabla 3), aunque algunos valores se movieron alrededor del 10% e incluso más allá de manera muy puntual (Figura 6). Los casos más extremos en muestras de aerosoles se observaron para las categorías oportunistas (*Pseudomonas fluorescens* y *Sphingomonas* spp.) y patógenos de plantas (*Acidovorax avenae* y *Ralstonia solanacearum*, Tabla 2). En las muestras de lagos del Parque Nacional, se detectaron además máximos para especies bacterianas próximas a patógenos de peces y anfibios, concretamente del género *Flavobacterium*, aunque con valores de identidad en la secuencia ligeramente superiores al 98% (Tabla 3), que requerirían de comprobaciones adicionales del grado de virulencia real. La abundancia relativa de los distintos tipos de patógenos potenciales varió significativamente entre muestras de deposición atmosférica y agua de los lagos (Welch t-test; p-valor < 0,01), siendo la presencia de las categorías oportunista, patógenos de plantas y de patologías respiratorias y fiebres significativamente más elevada en las muestras de aerosoles.

Curiosamente, la cantidad de patógenos oportunistas fue más grande siempre en la fracción aerosoles independientemente de la estación del año. Sin embargo, los patógenos de plantas fueron más abundantes en verano y otoño, mientras que los responsables de patologías respiratorias y fiebres fueron, como intuitivamente cabría esperar, menos abundantes en verano. En conjunto, las abundancias relativas de los diferentes tipos de patógenos potenciales en aerosoles fueron distintas en función de la estación del año (ANOVA, p-valor < 0,01), siendo la diferencia más claramente significativa la existente entre verano e in-

vierno (Test de Tukey para múltiples comparaciones, p-valor < 0,01). Ello indica un componente estacional en la distribución y dispersión de estos microorganismos aerotransportados. Sin embargo, no se observaron diferencias estacionales significativas en las muestras de agua de los lagos del Parque Nacional. Esta observación, junto a las bajas abundancias relativas observadas *in situ* indican que, en términos generales, las deposiciones atmosféricas de patógenos parecen tener un efecto limitado sobre las masas de agua del Parque Nacional. Sin embargo, esta situación puede experimentar cambios repentinos, como se constató por los episodios puntuales en junio y setiembre 2007 y en abril 2008 donde se detectaron abundancias relativas anormalmente altas de *Flavobacterium branchiophilum* (potencial patógeno de peces y anfibios) y de *Acidovorax avenae* (potencial patógeno de plantas). Estas especies también fueron detectadas en aerosoles, sugiriendo un estrecho vínculo entre la dispersión exitosa aire-agua/agua-aire para estos grupos (Tabla 3, Figura 6). Por otro lado, especies muy próximas a patógenos respiratorios del tipo *Bacillus anthracis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (> 99% identidad) altamente contagiosos y agresivos se detectaron en aerosoles de forma poco abundante y poco recurrente, y nunca en las masas de agua del Parque Nacional examinadas (Tabla 2).

### Composición taxonómica, novedad y riqueza genética del plancton microbiano en lagos del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici

En conjunto, nuestras investigaciones han mostrado que los lagos del Parque Nacional de Aigüestortes i Estany de Sant Maurici contienen una riqueza natural de formas microscópicas muy elevada tanto de los dominios Bacteria y Archaea como Eukarya (protistas) (Figura 7). En base a la secuencia de los genes 16S/18S rRNA obtenidos del plancton, los grupos con mayor abundancia relativa son Betaproteobacteria especialmente el género *Limnohabitans* (15%) y Actinobacteria del grupo HGC 1 (34%). En el caso de Archaea, dominan los Thaumarchaeota oxidadores de amonio de los grupos SAGMAG y

## Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

Tipo de patógeno		Cepa patógena	ID (%)	Abundancia promedio (%)	Abundancia máxima (%)	Recurrencia (%)	Presencia en lagos AT
Humanos y mamíferos	Respiratorio, fiebres y otros	<i>Bacillus anthracis</i> BF1	100	0,06	2,2	9,2	ND
		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sv 2 4226	99,2	0,01	0,5	3,1	ND
		<i>Legionella longbeachae</i> NSW150	97,5	0,004	0,3	1,5	+
		<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	97,5	0,01	0,3	1,5	+
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457	97,5	0,01	0,4	1,5	+
	Entéricos	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis	98,8	0,001	0,1	1,5	ND
	Piel y tejidos blandos	<i>Streptococcus pyogenes</i> Alab49	97,1	0,002	0,1	1,5	ND
	Visceras	<i>Streptococcus bovis</i> ATCC700338	99,6	0,03	1,6	4,6	ND
	Oportunistas	<i>Actinomyces odontolyticus</i> F0309	100	0,001	0,1	1,5	ND
		<i>Gemella sanguinis</i> M325	100	0,07	2,0	7,7	ND
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i> R1P1	100	0,02	0,5	6,2	+
		<i>Streptococcus oralis</i> SK255	100	0,002	0,1	1,5	+
		<i>Haemophilus parainfluenzae</i> HK262	99,6	0,01	0,3	3,1	ND
		<i>Acinetobacter lwoffii</i> RHKC-12	99,2	0,03	1,6	6,2	ND
		<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	99,2	3,20	33,3	70,8	+
		<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978	98,8	0,03	0,5	13,8	+
		<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	98,3	0,01	0,3	4,6	+
		<i>Serratia liquefaciens</i>	98,3	0,03	1,2	7,7	ND
		<i>Mycobacterium haemophilum</i> DSM44634	97,9	0,02	0,3	12,3	ND
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK2	97,9	0,004	0,1	3,1	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113		97,9	1,38	25,2	49,2	+	
<i>Burkholderia cepacia</i> GG4		97,5	0,02	0,4	7,7	ND	
<i>Rickettsiella grylli</i>		97,5	0,002	0,1	1,5	+	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> IAM12411	96,7	0,002	0,1	1,5	ND		
Peces y anfibios	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	97,1	0,03	1,6	3,1	+	
Plantas y hongos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100	0,15	2,2	20,0	+	
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	100	0,35	6,2	40,0	ND	
	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	99,2	3,84	52,4	76,9	+	
	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	99,2	0,57	19,0	37,2	+	
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	98,7	0,65	17,1	36,2	+	
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	98,3	2,93	35,4	75,4	ND	

**Tabla 2.** Bacterias aerotransportadas presentes en el colector de deposición húmeda con un alto grado de identidad (% ID) en el gen rRNA 16S con especies patógenas conocidas. Se indica la abundancia relativa promedio y máxima en la mezcla de amplicones, su presencia recurrente en el set de muestras de aerosol analizadas (n= 65), y su detección en muestras provenientes de lagos del Parque Nacional d'Aigüestortes (n=59). ND, no detectado.

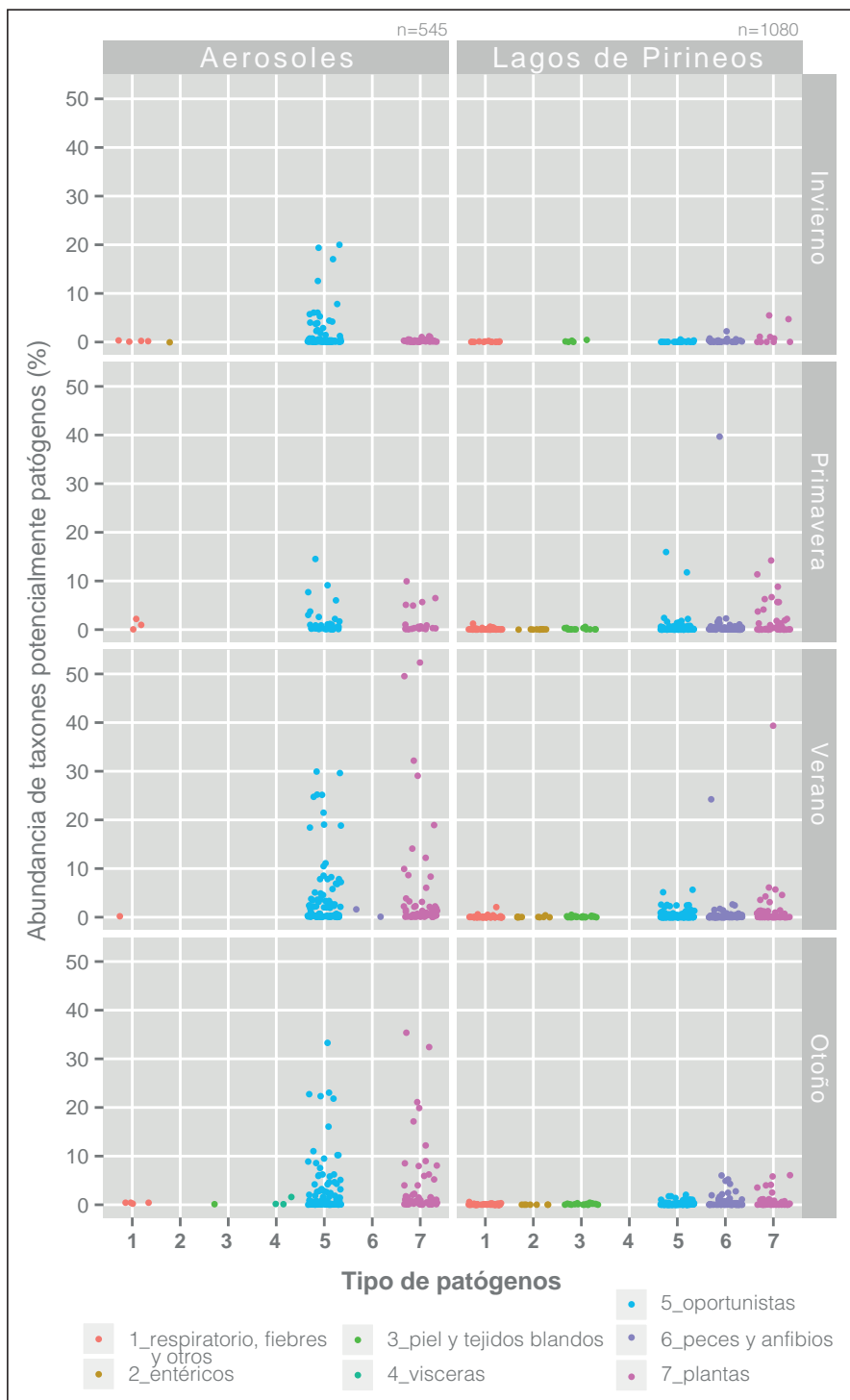
**Table 2.** Airborne bacteria from the wet collector closely related to the 16S rRNA gene of bacterial pathogens. Averaged and maximum relative abundance (%) in the amplicon mixture, recurrence in the aerosol dataset (n=65), and presence in lakes within the National Park (n=59) are shown. ND, not detected.

Tipo de patógeno		Cepa patógena	ID (%)	Abundancia promedio (%)	Abundancia máxima (%)	Recurrencia (%)	Presencia en aerosol
Humanos y mamíferos	Respiratorio, fiebres y otros	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a	100	0,01	0,1	23,7	ND
		<i>Streptococcus suis</i> D9	98,7	0,001	0,03	5,1	ND
		<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	98,3	0,01	0,1	22,0	ND
		<i>Rickettsia felis</i> URRWXC12	98,3	0,004	0,05	13,6	+
		<i>Legionella longbeachae</i> NSW150	98,3	0,02	0,6	36,6	+
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457	97,5	0,11	2,1	39,0	+
	Entéricos	<i>Clostridium difficile</i> CD196	99,2	0,004	0,05	16,9	ND
		<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	99,2	0,01	0,4	30,5	ND
	Piel y tejidos blandos	<i>Veillonella dispar</i> ATCC 17748	99,6	0,0003	0,02	1,7	ND
		<i>Clostridium septicum</i> JCM 7312	98,3	0,002	0,1	3,4	ND
		<i>Mycobacterium leprae</i> Br4923	97,9	0,11	0,5	66,1	ND
		<i>Corynebacterium minutissimum</i> NCTC 10288	97,5	0,02	0,5	28,8	ND
	Oportunistas	<i>Acinetobacter radioresistens</i> SK82	100	0,18	2,5	40,7	ND
		<i>Pantoea agglomerans</i>	100	0,02	0,7	18,6	ND
		<i>Streptococcus oralis</i> SK255	100	0,003	0,05	11,9	+
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i> R1P1	99,6	0,01	0,1	28,8	+
		<i>Rothia mucilaginosa</i> DY-18	99,6	0,0004	0,02	1,7	ND
		<i>Rickettsiella grylli</i>	99,6	0,003	0,1	13,6	+
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2	99,2	0,01	0,1	23,7	ND
		<i>Clostridium butyricum</i> 5521	98,8	0,0004	0,01	3,4	ND
		<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	98,8	0,06	0,5	78,0	ND
		<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	98,3	0,31	5,6	75,4	+
		<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	97,9	0,04	0,7	35,6	+
		<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	97,9	0,002	0,1	10,2	+
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK2	97,9	0,01	0,8	8,5	+
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	97,9	0,58	16,0	86,4	+
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166	97,5	0,004	0,1	8,5	ND	
	Peces y anfibios	<i>Aeromonas caviae</i> NCIMB 13016	100	0,01	0,2	27,1	ND
		<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	98,3	0,51	24,2	77,4	+
		<i>Flavobacterium columnare</i> 8239/97	98,3	0,18	2,5	46,6	ND
		<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	97,5	0,41	39,7	47,5	ND
	Plantas y hongos	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	100	0,12	2,6	57,6	+
		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100	0,04	1,3	44,1	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>		98,8	0,63	14,2	42,4	+	
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>		98,3	3,00	39,3	100	+	

**Tabla 3.** Bacterias presentes en lagos del Parque Nacional d' Aigüestortes con un alto grado de identidad (% ID) en el gen rRNA 16S con especies patógenas conocidas. Se indica la abundancia relativa promedio y máxima en la mezcla de amplicones, su presencia recurrente en el set de muestras de lagos analizadas (n= 59), y su detección en muestras provenientes del colector de deposición húmeda (n=65). ND, no detectado.

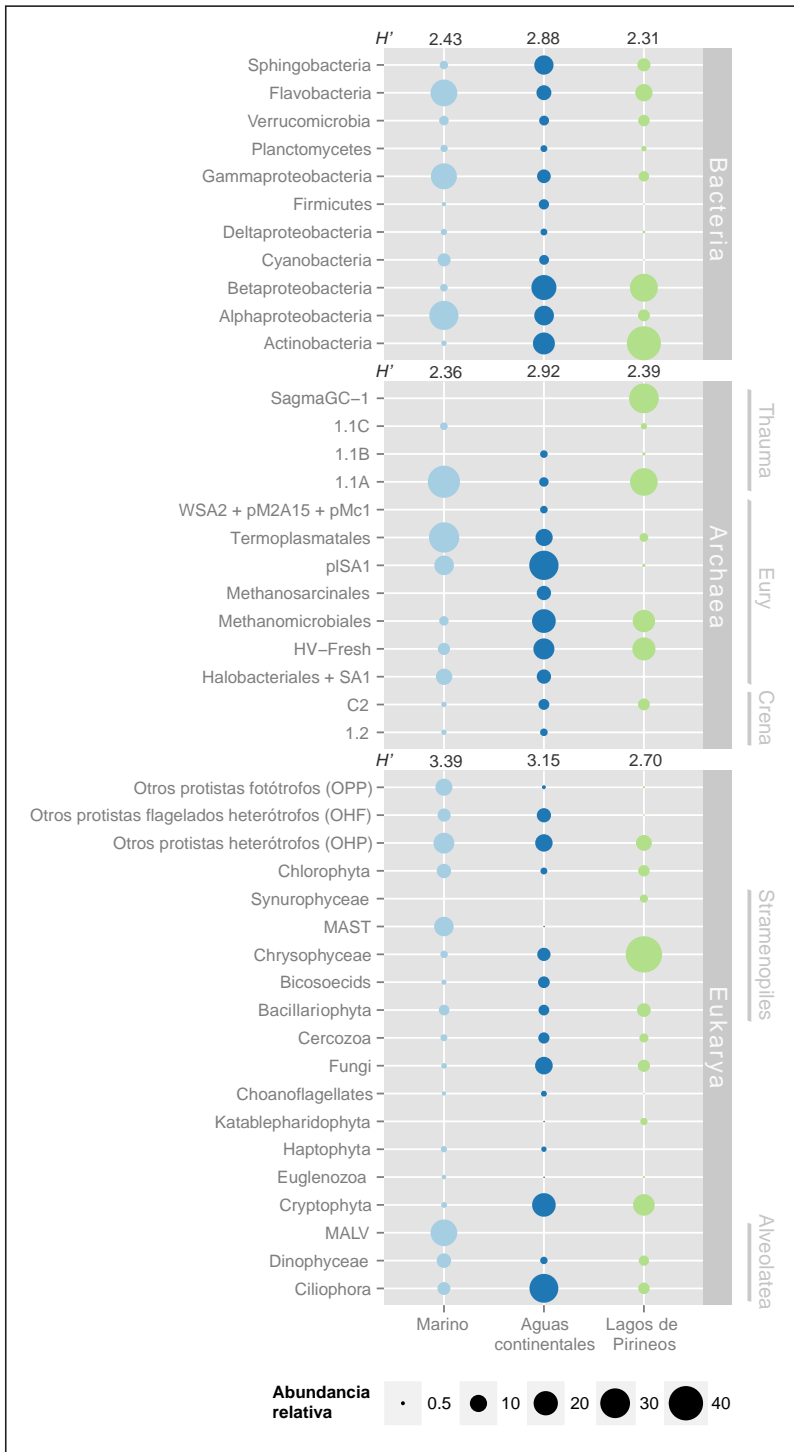
**Table 3.** Lake bacteria from the wet collector closely related to the 16S rRNA gene of bacterial pathogens. Averaged and maximum relative abundance (%) in the amplicon mixture, recurrence in lakes within the National Park (n= 59), and presence in the aerosol dataset (n=65) are shown. ND, not detected.

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013



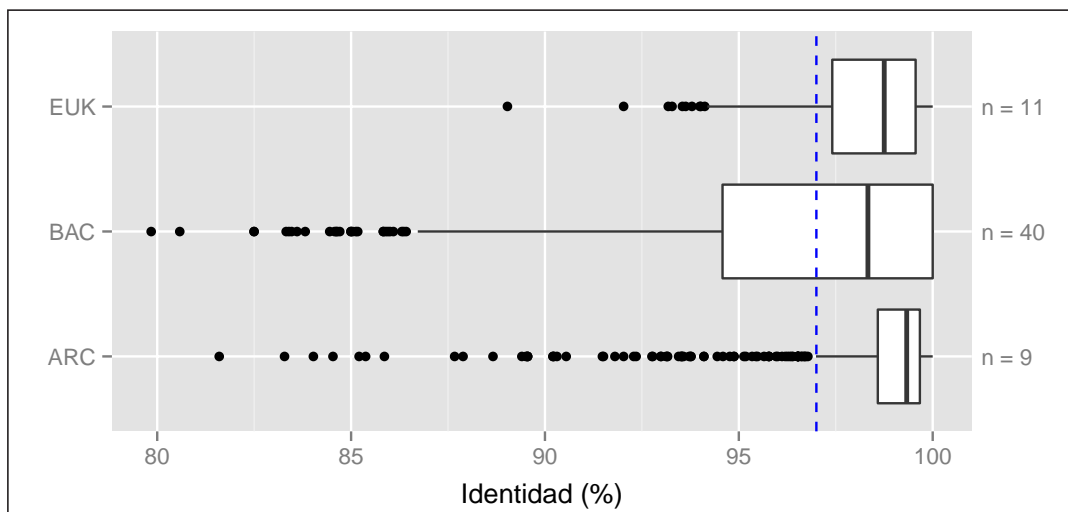
**Figura 6.** Abundancia relativa de taxones potencialmente patógenos en muestras de deposición atmosférica y lagos de Pirineos. Se presentan los datos separados estacionalmente. Los taxones se asignaron a distintas categorías de patógenos clasificados según el tipo de huésped y/o órganos afectados. Las categorías del 1 al 5 corresponden a patógenos de mamíferos, incluida la especie humana.

**Figure 6.** Relative abundance of putative pathogenic taxa found in samples from atmospheric deposition and Pyrenean lakes. Data were split seasonally. The taxa were allocated to pathogenic species affecting mammalian, humans included.



**Figura 7.** Abundancia relativa de bacteria, arqueas y eucariotas, recuperados globalmente de plancton marino y continental a partir de secuencias de los genes rRNA 16S y 18S. Índice de Shannon calculado a partir de la abundancia relativa (datos de AUGUET *et al.*, 2010, 2013; BARBERÁN y CASAMAYOR, 2010; TRIADÓ-MARGARIT y CASAMAYOR, 2012).

**Figure 7.** Relative abundance of bacteria, archaea and eukarya found in global surveys of marine and inland waters plankton using 16S and 18S rRNA genes sequences. Shannon index based on relative abundances (data from AUGUET *et al.*, 2010, 2013; BARBERÁN & CASAMAYOR, 2010; TRIADÓ-MARGARIT & CASAMAYOR, 2012).



**Figura 8.** Grado de novedad de los taxones relacionados con bacteria, arqueas y eucariotas recuperados del plancton de lagos de Pirineos según las secuencias 16S/18S rRNA presentes en GenBank (Mayo 2014).

**Figure 8.** Novelty of taxons related to bacteria, archaea and eukarya recovered from the plankton of several Pyrenees lakes according to match with 16S/18S rRNA genes sequences reported in GenBank (survey May 2014).

1.1a y los Euryarchaeota HV-Fresh (AUGUET y CASAMAYOR, 2013). Finalmente, dentro de los protistas destaca el grupo de Chrysophyceae seguido de Cryptophyta (TRIADÓ-MARGARIT y CASAMAYOR, 2012).

Estos resultados se han puesto en un contexto global utilizando un metaanálisis tentativo de la composición microbiana del plancton de superficie marino y de agua dulce recopilando los estudios disponibles en la literatura (AUGUET *et al.*, 2010; BARBERÁN y CASAMAYOR 2010; TRIADÓ-MARGARIT y CASAMAYOR, 2012). Los resultados muestran que a nivel global existe una diversidad (índice de Shannon) mayor de bacterias y arqueas en el plancton superficial de agua dulce en comparación con el marino (Figura 7). Los ambientes de agua dulce contienen un mayor número de grupos bacterianos con abundancias relativas más elevadas, representados principalmente por Beta-, Alpha- y Actinobacteria, así como también Firmicutes y Sphingobacteria (BARBERÁN y CASAMAYOR, 2010). Los ambientes marinos agruparon el 75% de las bacterias en tres grupos, Alpha-, Gammaproteobacteria y Flavobacteria, los cuales fueron significa-

tivamente más abundantes que en agua dulce. Respecto a Archaea, en los ambientes marinos el 66% de las especies se repartieron entre el grupo 1.1A de Thaumarchaeota, y los Thermoplasmatales. Las poblaciones más abundantes de microorganismos eucariontes se agruparon de forma claramente diferenciada según el ambiente analizado, con poblaciones más abundantes de MALV, MAST, Chlorophyta y otros fotosintéticos (OPP) en ambientes marinos, mientras en agua dulce dominan Ciliophora y Cryptophyta. Aunque estas proporciones puedan variar al ir añadiendo nuevos ambientes a las bases de datos, queda patente que la mayoría de grupos detectados a nivel global en los ambientes de agua dulce también se detectaron en los lagos del Parque Nacional.

Finalmente, exploramos el grado de novedad de los taxones microbianos detectados en un número limitado de masas lacustres del Parque Nacional (ver valores de *n* en Figura 8) a partir de la comparación de las secuencias correspondientes mediante BLAST (blastn) contra los genes rRNA presentes en GenBank (actualizada a Mayo 2014) y con el umbral del 97% de identidad. Estos re-

CASAMAYOR, E.O. Y COLS.

sultados indican que, además de la alta riqueza, estos ambientes contienen un nivel de novedad genética elevado, lo que acrecienta el interés por el estudio de la diversidad microbiológica de las masas de agua del Parque desde diferentes perspectivas ecológicas y evolutivas.

## CONCLUSIONES

La generación de aerosoles atmosféricos es un fenómeno creciente a escala global que se ha visto acelerado en los últimos años por efectos ligados al cambio global (MOULIN y CHIAPELLO, 2006). Este fenómeno cuenta con dos puntos calientes de emisión natural de partículas a escala planetaria: la zona del Sahara-Sahel en África y la del Gobi- Takla Makan en Asia. Aquí se generan inmensas masas de polvo en suspensión (miles de millones de toneladas), algunas de ellas equivalentes al tamaño de toda la Península Ibérica (Foto 1), que se desplazan miles de kilómetros de distancia saltándose las barreras oceánicas impulsadas por el régimen general de vientos hacia el oeste y hacia el este, respectivamente (KELLOGG y GRIFFIN, 2006) y pueden ser seguidas en tiempo real mediante satélite (PROSPERO *et al.*, 2002). Las características climatológicas regionales en la zona Atlántico-Mediterránea favorecen la entrada periódica de parte de estas masas hacia la zona continental europea, mientras que polvo del desierto del Gobi puede detectarse en Europa después de haber completado casi una vuelta completa alrededor de la Tierra.

En conjunto, nuestra línea de investigación utiliza lagos y zonas de alta montaña como biosensores de la calidad microbiológica del aire y de la salud del ecosistema. Estos lagos se encuentran relativamente poco alterados por la acción humana a escala local y son considerados relativamente libres de interferencias externas próximas. Los resultados indican que se trata de grandes colectores naturales muy útiles para estudiar la

«Control climático de la colonización bacteriana»

incidencia de microbios invasores de origen remoto transportados por el viento ya que ofrecen datos integradores de alto valor diagnóstico. Además, se encuentran presentes en todas las latitudes del planeta permitiendo la extrapolación de estudios locales y regionales a una escala planetaria. En este contexto, el valor de estos ecosistemas reside en su potencial para seguir procesos ecológicos que sobrepasan sus fronteras y que tienen un carácter global. Estos datos resultan imprescindibles para avanzar en el conocimiento de las estrategias ecológicas de dispersión en el mundo de las bacterias y su aplicación a la comprensión de fenómenos como plagas y transmisión de enfermedades.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se ha realizado gracias a las instalaciones del Observatorio Limnológico de Pirineos dentro de la red LTER (Long Term Ecological Research)-Aiguestortes y las del Centre de Recerca d'Alta Muntanya-CRAM de la Universitat de Barcelona, junto a la colaboración de las autoridades y guardería del Parque Nacional de AiguësTortes i Estany de Sant Maurici y el apoyo logístico y de campo de Lluís Camarero y personal del CRAM en la recogida periódica de muestras. Este estudio ha sido financiado por los proyectos AERBAC2 178-2010 del Ministerio de Medio Ambiente-Red de Parques Nacionales y GRACCIE CSD2007-00067 del programa CONSOLIDER del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN). Los datos obtenidos de [www.callima.ws](http://www.callima.ws) han sido generados a partir del Acuerdo de Encomienda de Gestión entre el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM) y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (a través del Instituto de Ciencias de la Tierra «Jaume Almera») para la realización de trabajos relacionados con el estudio y evaluación de la contaminación atmosférica por material particulado y metales en España.



*Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUET, J.C., & CASAMAYOR, E.O. 2013. Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in alpine lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 84: 154-164.
- AUGUET, J.C., BARBERÁN, A. & CASAMAYOR, E.O. 2010. Global ecological patterns in uncultured archaea. *ISME Journal* 4: 182-190.
- BARBERÁN, A. & CASAMAYOR, E.O. 2010. Global phylogenetic community structure and beta-diversity patterns of surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.
- BARBERÁN, A., HENLEY, J., FIERER, N. & CASAMAYOR, E.O. 2014. Structure, inter-annual recurrence, and global-scale connectivity of airborne microbial communities. *Science of the Total Environment* 487: 187-195.
- BARNOSKY, A.D., HADLY, E.A., BASCOMPTE, J. *et al.* 2012. Approaching a state shift in Earth's biosphere. *Nature* 486: 52-58.
- CASAMAYOR, E.O. 2011. Diversidad bacteriana en lagos de alta montaña: Biogeografía y mecanismos de dispersión por aerosoles atmosféricos en el contexto del cambio global. Ramirez, L. & Asensio, B. (eds.) «Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2007-2010», Serie Investigación en la Red. Organismo Autónomo de Parques Nacionales-Ministerio de Medio Ambiente ISBN 978-84-8014-805-4, pp: 77-90.
- GRIFFIN, D.W., KELLOGG, C.A., GARRISON, V.H. & SHINN, E.A. 2002. The global transport of dust. An intercontinental river of dust, microorganisms and toxic chemicals flows through the Earth's atmosphere. *American Scientist* 90: 228-235.
- HERVÁS, A., CAMARERO, L., RECHE, I. & CASAMAYOR, E.O. 2009. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. *Environmental Microbiology* 11: 1612-1623.
- KELLOGG, C.A. & GRIFFIN, D.W. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecology & Evolution* 21: 638-644.
- MOULIN, C. & CHIAPELLO, I. 2006. Impact of human-induced desertification on the intensification of Sahel dust emission and export over the last decades. *Geophysical Research Letters* 33: L18808.
- PROSPERO, J.M., GINOUX, P., TORRES, O., NICHOLSON, S. & GILL, T. 2002. Environmental characterization of global sources of atmospheric soil dust identified with the NIMBUS 7 Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS) absorbing aerosol product. *Review of Geophysics* 40: 1002.
- ROCKSTRÖM, J., STEFFEN, W., NOONE, K. *et al.* 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461: 472-475.
- SARMENTO H., CASAMAYOR, E.O., AUGUET, J.C., VILA-COSTA, M., FELIP, M., CAMARERO, L. & GASOL, J.M. 2014. Environmental harshness shapes microbial food web components, bulk metabolism, and single-cell physiology of piconeuston in the surface microlayer of high-altitude lakes. *Limmology of Oceanography*, enviado.
- TRIADÓ-MARGARIT, X. & CASAMAYOR, E.O. 2012. Genetic diversity of planktonic eukaryotes in high mountain lakes (Central Pyrenees, Spain). *Environmental Microbiology* 14: 2445-2456.
- VILA-COSTA, M., BARBERAN, A., AUGUET, J.C., SHALABH, S., MORAN, MA. & CASAMAYOR, E.O. 2013. Bacterial and archaeal community structure in the surface microlayer of high mountain lakes examined under two atmospheric aerosol loading scenarios. *FEMS Microbiology Ecology* 84: 387-397.

