Agència
de Gestió
d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca
AGAUR

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, INEFC i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

BP

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Diversitat bacteriana a les esponges marines.

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Andrea	Blanquer Pérez

Correu electrònic
ablanquer@gmail.com

Dades del centre d'origen

Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer (Laboratoire Arago),
UPMC
CNRS
Banyuls sur Mer, França

Agència
de Gestió
d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

AGAUR

Número d'expedient
2009 BP-A 00005

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Sponges
Symbiosis
Bacteria
Diseases
Diversity

Data de presentació de la justificació
21 de Gener de 2013

Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Vist i plau del/de la responsable de la
sol·licitud

Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia
i Coneixement

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

L'objectiu principal del projecte era aprofundir en el coneixement de les malalties de les esponges, centrant-nos en la diversitat bacteriana que acullen. Als estius 2008 i 2009 va haver episodis d'elevades temperatures de l'aigua de mar que van suposar importants mortalitats massives d'esponges a la Mediterrània. Contra tot pronòstic, els estius del projecte, el 2010 i el 2011, no van resultar especialment calorosos i no hi va haver episodis de mortalitat. És un fet molt positiu per les comunitats bentòniques però algun dels objectius específics de la meva proposta no es va poder dur a terme com havien estat platejats inicialment. Disposàvem de diferents mostres d'esponges malaltes de l'espècie *Ircinia fasciculata*, sanes i aigua circumdant recollides l'estiu 2009 i fixades per DNA, per això s'han pogut identificar i caracteritzar els canvis en la comunitat microbiològica de les esponges malaltes respecte de les sanes. Hem constatat que més que una infecció per un o pocs patògens puntuals, com havien proposat alguns autors, hi ha un canvi dràstic en la comunitat microbiològica associada a les esponges. Les esponges malaltes, on dominen els bacteris heterotròfics, presenten una major diversitat bacteriana que les sanes, on dominen els autòtrofs. Tot i que no es va poder realitzar un nou mostreig d'individus malalts, i algun objectiu específic no es va poder desenvolupar, vaig aprofitar l'estada en un centre de referència en estudis de la diversitat microbiana, per ampliar el coneixement general de les comunitats bacterianes associades a esponges. Es van realitzar nous estudis en què vam testar si totes les esponges (bacteriosponges i no) presenten simbionts reals o si les no-bacteriosponges presenten un enriquiment de les comunitats de l'aigua de mar però no una flora específica. El resultat és que totes les esponges presenten associacions molt específiques malgrat hi ha fortes diferències entre les comunitats microbianes associades a bacteriosponges i a no-bacteriosponges.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)

The project aimed to deep in the knowledge of sponge diseases, focusing on their associated bacterial diversity. On 2008 and 2009 summers, there were important warm episodes of high seawater temperatures that caused mass mortalities of Mediterranean sponges. Unexpectedly, on summers 2010 and 2011 were not extremely hot and no mass mortalities occurred. This was a positive fact for benthic communities but some of the specific objectives from my proposal could not be performed as initially planned. We had samples from diseased and healthy sponges from *Ircinia fasciculata* and from their surrounding seawater from summer 2009, thus we have been able to identify and characterize changes in the diseased sponge microbiomes with respect to the healthy ones. We stated that disease is not caused by a single pathogen infection, as suggested by some authors. On the contrary, there is a shift in the microbial communities associated to sponges. Diseased sponges, in which heterotrophic bacteria are the most abundant microbes, present a higher bacterial diversity than healthy sponges, in which autotrophic bacteria dominate. Unfortunately we could not perform a new sampling on diseased sponges, and thus some specific objectives could not be addressed properly but I took advantage of my stay in a centre, which is reference for microbial diversity studies, to enlarge the basic knowledge on bacterial communities associated to sponges. We tested whether all sponges (bacteriosponges and not) present real symbionts or if non-bacteriosponges present and enrichment of seawater bacteria and not a specific microbiota. We found that all the sponges present species-specific bacteria although there are strong differences between the communities of bacterio and non-bacteriosponges.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Durant els darreres dècades, s'ha constatat una tendència en l'escalfament de l'oceà. Les esponges marines, com els coralls, són organismes bentònics sèssils que no poden escapar davant aquest escalfament i són organismes especialment sensibles a sofrir episodis de mortalitat massiva. Les esponges són longeves, amb lent creixement i organismes claus a l'ecosistema com formadores d'hàbitat. Degut a la quantitat de relacions tròfiques i simbiòtiques que les relacionen amb pràcticament tota la resta de taxons marins, la mortalitat d'alguna espècie pot tenir efecte en cadena i afectar la resta de l'ecosistema.

Els estius 2008 i 2009 van ser especialment calorosos i es van engegar moltes alarmes quan es va detectar que moltes poblacions d'esponges de poblacions ubicades en àrees protegides van sofrir més d'un 95% de mortalitat (Maldonado et al 2010; Cebrian et al 2011). En aquell moment es va plantejar un projecte per tal d'aprofundir en el coneixement de les malalties de les anomenades bacteriosponges (esponges amb moltes relacions simbiòtiques amb bacteris) que eren especialment sensibles als augments de temperatura de l'aigua de mar.

Sortosament per l'ecosistema, però malauradament pel projecte, durant els estius 2010 i 2011, durant els quals el projecte es va dur a terme, les temperatures de l'aigua de mar no van estar durant molts dies seguits per sobre de 28°C i per tant no es van desencadenar mortalitats massives en esponges a la Mediterrània Occidental. L'estiu del 2009 abans de començar el projecte, vam poder mostrejar esponges de la bacteriosponja *Ircinia fasciculata* al Parc Natural de Cabrera. Vam agafar mostres d'individus malalts, d'alguns dels pocs individus que estaven sans, i de l'aigua de mar circumdant. Aquestes mostres han resultat claus per desenvolupar el projecte.

<u>Caracterització dels canvis en la comunitat microbiològica associada a individus malats per comparar-los amb sans i amb l'aigua circumdant.</u>

La caracterització de les comunitats bacterianes associades a les esponges estava prevista amb l'ús de TRFLPs, polimorfismes en mida de fragments terminals de restricció, però a l'arribada al centre receptor es va decidir fer ús de les darreres eines moleculars que s'estaven començant a emprar. Són tècniques punteres que donen molta més informació i que havien baixat considerablement de preu. Es tracta de la piroseqüenciació massiva, la qual permet seqüenciar més de 4 milions de parells de bases per hora a diferència del sistema clàssic que permet seqüenciar 67.000 bases per hora. La baixada de costos d'aquesta tecnologia puntera i l'experiència en el seu ús per part del grup del Dr Pierre E Galand, que començava emprar-la de forma regular, van determinar clarament la tria.

Es va extreure el DNA de mostres d'individus sans, malalts de l'espècie *Ircinia fasciculata* i mostres d'aigua de mar circumdant concentrades en un filtre (2μ mida de porus). Es va amplificar els gens 16S dels bacteris de les esponges i de l'aigua amb els enzebadors 28F TTTGATCNTGGCTCAG i 519R GTNTTACNGCGGCKGCTG i es va seqüenciar en un aparell 454 FLX Titanium de la casa Roche. L'afiliació de les seqüencies obtingudes es va realitzar mitjançant Greengenes i es va verificar mitjançant BLAST. L'anàlisi i tractament de les dades de piroseqüenciació (degut a l'elevat nombre de seqüències obtingudes) és la part que més temps ha necessitat del projecte. Aqueta és també, sens dubte, la part en què més coneixement he adquirit per poder retornar-lo al centre de Catalunya on em pugui incorporar en el futur.

Hi ha diferències tant quanti- com qualitatives entre tots tres grups de mostres (Fig 1-3). A les mostres d'esponges sanes, més del 50% de les mostres són bacteris fototròfics (*Cyanobacteria* i *Chloroflexi*), que a més són taxonòmicament diferent als *Cyanobacteria* i *Chloroflexi* dels individus malalts. No hi ha cap seqüència bacteriana que prèviament s'hagi associat a cap malaltia d'esponges o coralls ni a organismes sotmesos a aqüicultura. La meitat de totes les seqüències de bacteris s'havien descrit prèviament en altres espècies del mateix gènere (*Ircinia*), per tant, representen la microbiota "normal" de l'espècie.

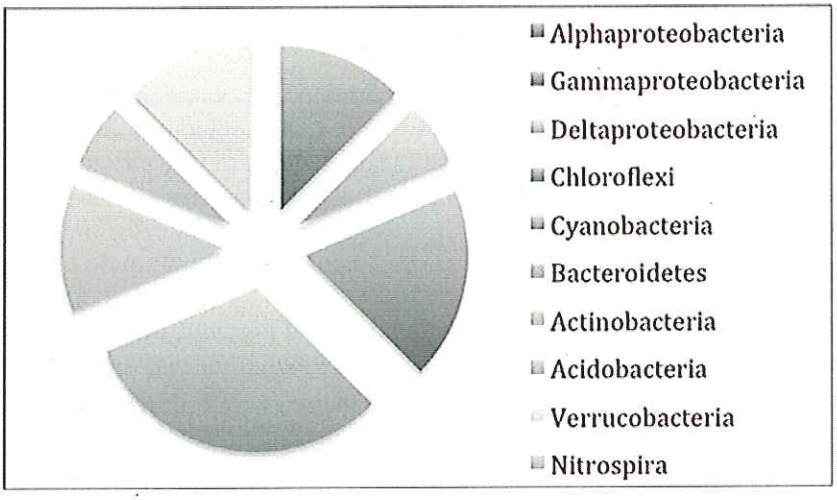

Fig 1. Afiliació de les seqüències de bacteris obtingudes de les mostres d'esponges sanes.

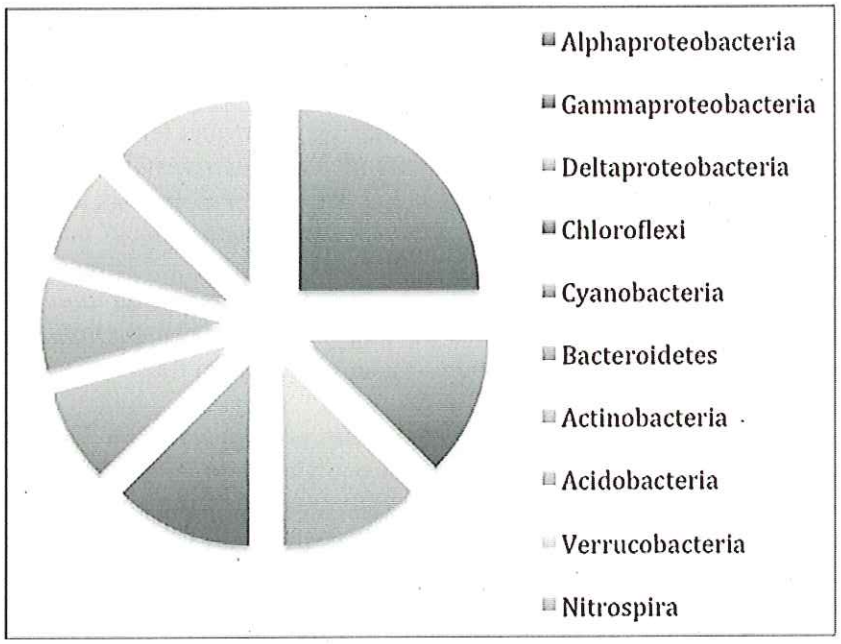

Fig 2. Afiliació de les seqüències de bacteris obtingudes de les mostres d'esponges malaltes.

A les mostres d'esponges malaltes, els proteobacteris, un 50% en total, eren els més dominants. Dintre d'aquest fílum heterotròfic bacterià, els alfaproteobacteris eren els més abundants. Un 16% del total de les seqüències s'havien trobat prèviament en esponges o coralls malalts, i un 12 % en esponges sotmeses a aqüicultura. Aquesta representa la microbiota "alterada" de l'espècie. Només un 20% de les seqüències s'havien descrit prèviament al gènere.

A les mostres de l'aigua de mar circumdant, també els alfaproteobacteris, del fílum *Proteobacteria*, eren els més abundants, tot i que taxonòmicament eren diferents als de les esponges malaltes. Aquestes mostres eren quanti- i qualitativament semblants a les d'aigua de mar d'altres localitats mediterrànies.

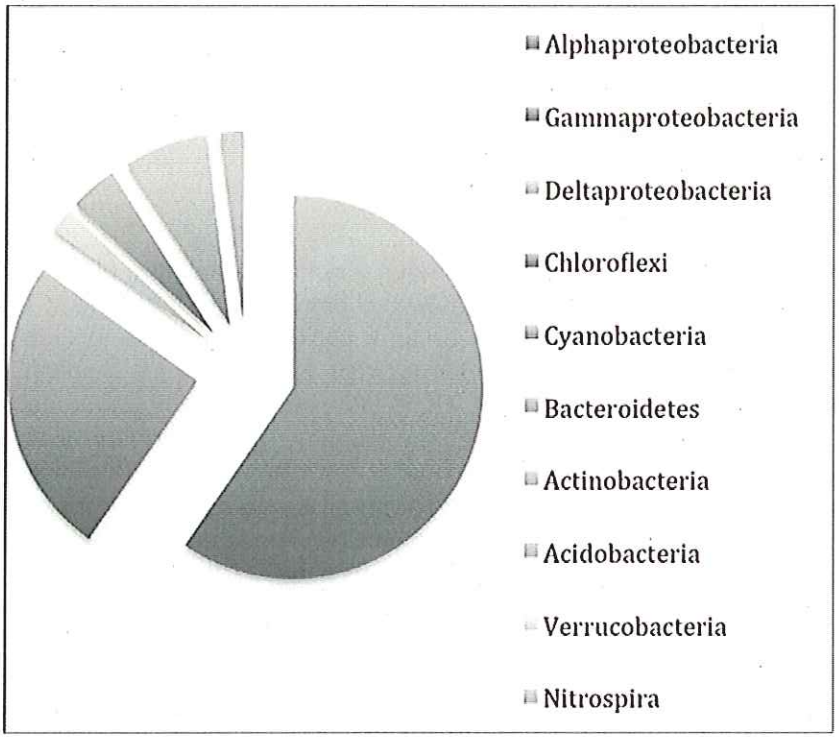

Fig 3. Afiliació de les seqüències de bacteris obtingudes de les mostres de l'aigua de mar circumdant.

Hi havien dues hipòtesis respecte a l'origen de les malalties que causaven mortalitat massiva a l'espècie *Ircina fasciculata:* d'una banda alguns autors suggerien com agent etiològic un bacteri específic (observat amb microscòpia) que infectava les esponges des de l'exterior matant les cèl·lules de l'ectosoma fins penetrar al teixit de l'esponja (Maldonado et al 2009). D'altra banda, altres autors observaven, també mitjançant un estudi estructural amb microspopia electrònica, un descens en els Cianobacteris en els individus malats (Cebrian et al 2010). Els estudis moleculars sobre les microbiotes d'individus sans i malalts ens han confirmat la segona hipòtesi, ja que no s'ha detectat cap bacteri específic especialment abundant però sí un canvi dràstic de la composició quanti- i qualitativa afectant involucrant especialment els cianobacteris, que cauen en nombre dràsticament i són taxonòmicament diferents als de les esponges sanes.

D'altra banda hi ha una major diversitat bacteriana a les mostres d'esponges malaltes respecte de les sanes. Això podria ser degut a la debilitat de les defenses dels individus malalts, que serien més susceptibles a diferents bacteris que aprofitarien nou nínxols per degradar el teixit de les esponges. Els bacteris observat en microscòpia electrònica per Maldonado i col·laboradors podrien ser degradadors del col·làgen, els quals s'han observat freqüentment en altres processos infecciosos d'esponges.

Per tant, les bacteriosponges i aquelles esponges amb moltes relacions simbiòtiques amb cianofícies són molt més sensibles a l'escalfament dels oceans. Degut a les elevades temperatures, sostingudes durant varis dies seguits, hi ha un canvi quanti- i qualitatiu dels cianobacteris i cloroflexis que són substituïts per bacteris més oportunistes, associats a aquaris i malalties. Aquests canvis poden ser irreversibles causant la mort de la pròpia esponja i afectant així en cadena, a la resta de l'escosistema.

Bacteris vertaders en esponges marines: eliminant variacions ambientals per discernir entre simbionts i bacteris accidentals.

Degut a la impossibilitat de realitzar nous mostrejos d'esponges malaltes, el meu projecte es va readreçar cap a l'estudi de les relacions simbiòties entre bacteris i esponges. Dins de les esponges marines hi ha una gran diversitat de bacteris, però es desconeix si tots ells mantenen relacions simbiòtiques amb les esponges, en són aliment o estan presents simplement perquè hi són a l'aigua circumdant que estan filtrant. Hi ha la hipòtesi, mai adreçada específicament, de que les bacteriosponges o esponges HMA (de l'anglès, *High Microbial Abundant*) amb grans concentracions de bacteris que poden arribar al 40% del volum de l'esponja, presenten vertaderes relacions simbiòtiques, mentre que les esponges no-bacteriosponges o esponges LMA (*Low Microbial Abundant*), les quals presenten concentracions de bacteris similars a les de l'aigua del mar, presenten un enriquiment de bacteris de l'aigua però no simbionts específics.

A partir d'aquesta idea, es va dissenyar un mostreig en què es tractava de minimitzar la variabilitat ambiental. Es van mostrejar en una única immersió i en una zona molt restringida, una barra rocosa a 29 metres de profunditat d'1 m d'alçada, 10 d'amplada i 25 de llarg i envoltada per bancs de sorra, individus de totes les espècies que hi vivien. Hi havia representació de la major part dels Ordres de les Classes Demospongiae i Homoscleromorha. Les espècies incloïen varies esponges HMA (*Petrosia ficiformis*, *Chondrosia reniformis* i *Agelas oroides)* i vàries esponges HMA (*Cliona viridis*, *Hemimycale columella*, *Hexadella racovitzae*, *Axinella polypoides,* i *Pleraplysilla spinifera* (Demospongiae), i *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha). Tanmateix es va mostrejar l'aigua circumdant.

Es va extreure el DNA de totes les mostres i dels filtres on s'havia filtrat l'aigua i es va amplificar els gens 16S dels bacteris de les esponges i de l'aigua amb els enzebadors 28F TTTGATCNTGGCTCAG i 519R GTNTTACNGCGGCKGCTG i es va seqüenciar en un aparell 454 FLX Titanium de la casa Roche. L'afiliació de les seqüencies obtingudes es va realitzar mitjançant Greengenes i es va verificar mitjançant BLAST. Una vegada més, l'anàlisi i tractament de les dades de piroseqüenciació (degut a l'elevat nombre de seqüències obtingudes) és la part que més temps ha necessitat del projecte.

Quan analitzem la semblança entre les comunitats bacterianes associades a cada individu d'esponja (anàlisi Bray-Curtis), les mostres s'agrupen per espècies (fig. 4). Hi ha poca variació intra-específica (molta igualtat entre individus de la mateixa espècie) i elevada variació inter-específica (pocs bacteris compartits entre espècies). No hi ha un patró filogenètic, però sí hi ha diferències pel que fa a la quantitat de bacteris que presenten. Les esponges HMA queden agrupades entre sí junt amb l'aigua de mar, mentre que les LMA formen un altre grup clarament diferenciat.

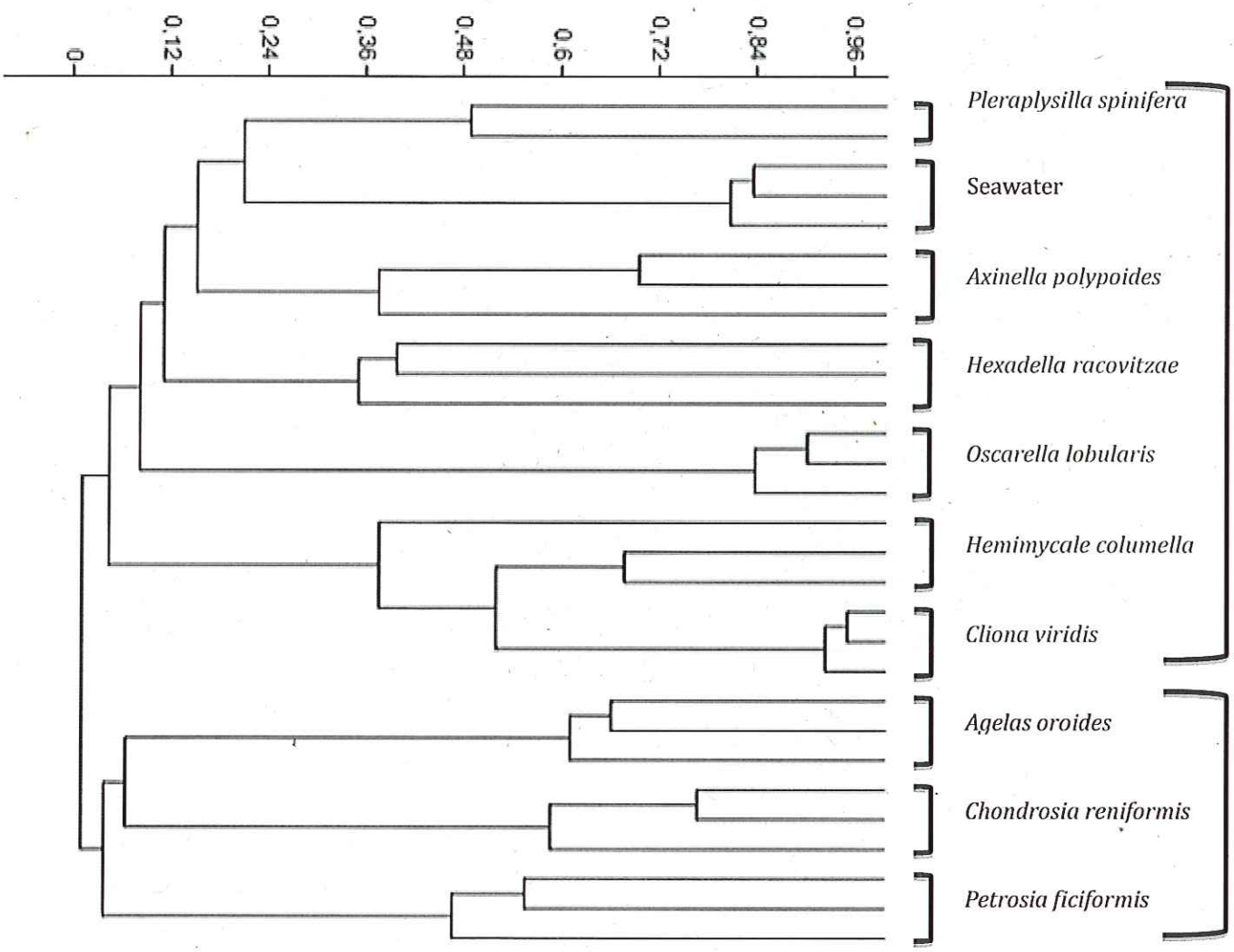

Fig 4. Cluster de Bray-Curtis de semblança entre els microbiomes dels diferents individus d'esponges estudiats. En color taronja les esponges HMA o no-bacteriosponges i en marró les HMA o bacteriosponges.

Pel que fa als índexs de diversitat i dominància. En general les esponges HMA presenten una major diversitat (Índex de Shannon) i una menor dominància. Hi ha bacteris més variats i cap o pocs molt més abundant que els altres, al contrari del que succeeix a les esponges LMA.

Respecte a les diferències taxonòmiques, a l'aigua de mar (Fig 5.) hi ha dominància d'alfaproteobacteris. En concret el grup SAR11 representa el 67% dels bacteris seqüenciats. A les esponges LMA (Fig 6) també hi ha dominància de bacteris alphaproteobacteris, però el Grup SAR 11, dominant l'aigua de mar, en les esponges LMA només representa el 3% del total, en canvi el grup SAR116 és el més abundant (46% del total) a les esponges LMA. Per tant, malgrat que les microbiotes de les mostres d'aigua són més semblants a les de les esponges LMA (Fig 4) i filogenèticament les comunitats són més semblants (Fig 5-6) són microbiotes diferents. Els bacteris de les esponges LMA no són un enriquiment directe de les comunitats bacterianes de l'aigua de mar.

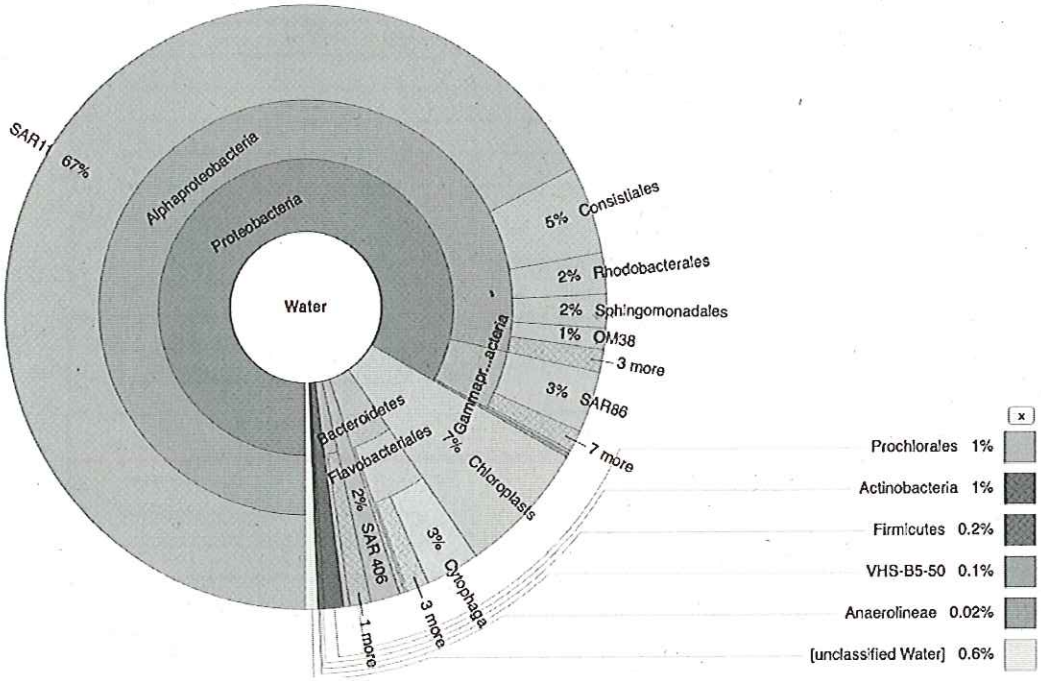

Fig 5. Composició taxonòmica de la microbiota de les mostres de l'aigua de mar circumdant.

Pel que fa a les esponges HMA, els *Chloroflexi* són els bacteris més abundants (44%). Aquests no apareixien a ales esponges LMA. Els alfaproteobacteris, els més abundants a l'aigua de mar i ales esponges LMA només representen un 10% de les seqüències de les HMA. I els cianobacteris i acidobacteris també són importants quantitativament.

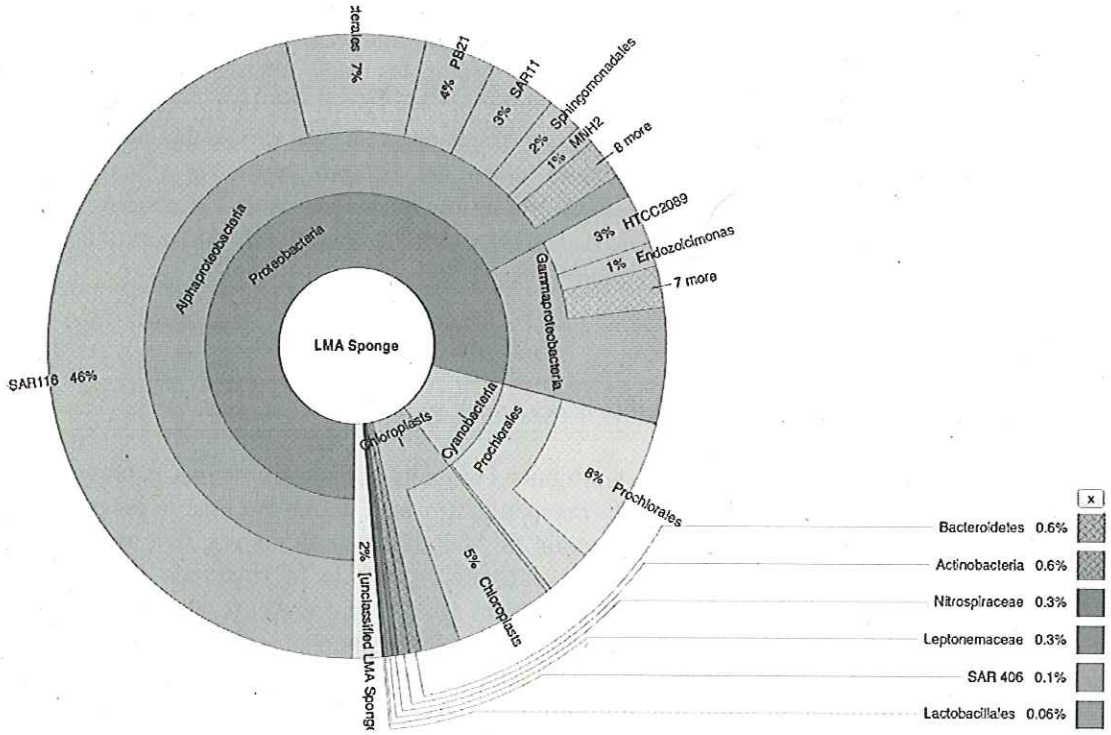

Fig 6. Composició taxonòmica de la microbiota de les mostres d'esponges LMA.

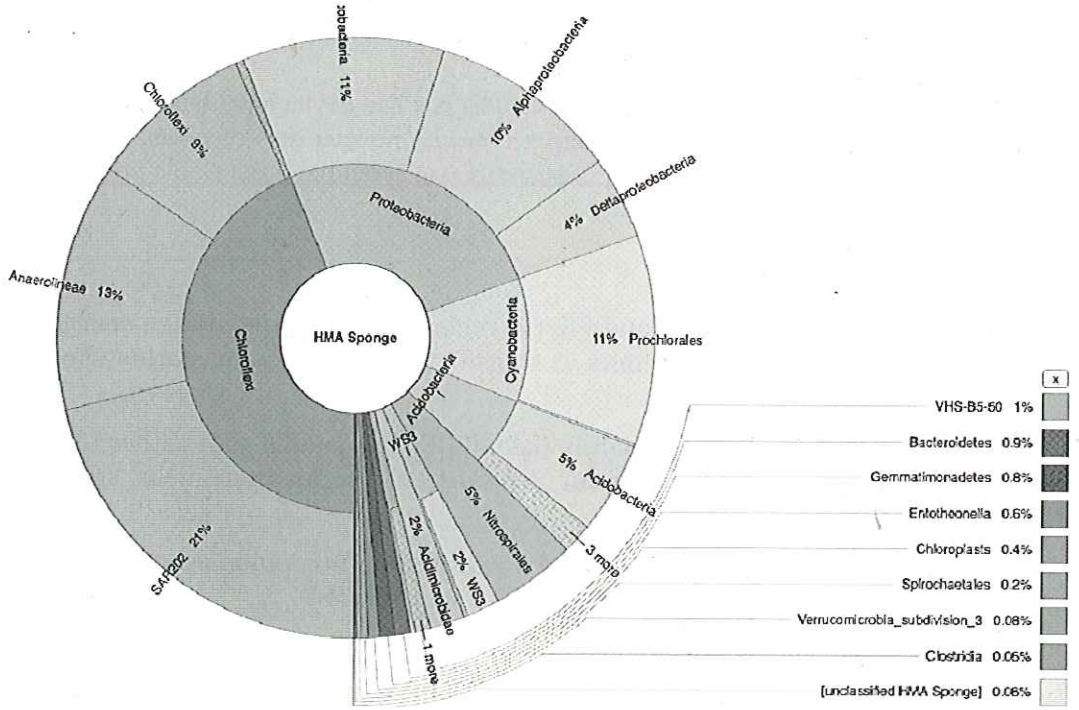

Fig 7. Composició de la microbiota de les mostres d'esponges HMA.

Malgrat ser un mostreig puntual en el temps i en l'espai, en què podríem esperar bacteris compartits entre espècies, no hi ha cap seqüència bacteriana compartida per totes les espècies. La major part de les seqüències, sobretot les més abundants, són especies-específiques, tant per a esponges HMA com també per les LMA. Per tant, totes les esponges presenten relacions simbiòtiques vertaderes transmeses a la descendència i fixades evolutivament. Però no hi ha cap relació entre els bacteris associats i les relacions filogenètiques dels seus hostes, les esponges, i sí hi ha clares i marcades diferències entre les comunitats bacterianes d'esponges HMA i LMA. Aquest estudi ens ha portat a revelar informació bàsica sobre les relacions simbiòtiques entre bacteris i esponges.

Estudi metodològic. Podem conèixer tota la diversitat real?

A l'estudi sobre els bacteris simbionts i aquells transitoris de les esponges, vam treballar amb l'espècie de bacteriosponja *Petrosia ficiformis*, ja que era una de les presents al lloc d'estudi. Uns col·legues de la Universitat de Würzburg, a Alemanya, han aplicat també piroseqüenciació en individus de la mateixa espècie però de la riba més oriental de la Mediterrània. Ells han utilitzat altres enzebadors (*primers*), diferents als nostres, i hem contactat amb ells per tal d'unir esforços i fer un recull de tots els resultats. La idea és fer un estudi comparatiu de les diferències que podem obtenir en funció dels enzebadors emprats. És un estudi molt interessant i que pensem farà palesa la dependència dels resultats en alguns aspectes metodològics que encara a hores d'ara no podem controlar.

Publicacions científiques previstes dels resultats descrits a la memòria

Alguns dels resultats de tots aquests estudis ja s'han enviat a publicar mentre que altres, en avançat estat de redacció, s'enviaran en breu. La novetat dels resultats, així com el seu interès per diversos àmbits científics, fa preveure que seran publicats en els propers mesos en revistes d'impacte científic.

Blanquer A, Uriz MJ, Galand PE. (In review) Removing variation sources to gain insight on true symbionts *vs* transient microbiomes in marine sponges. The ISME Journal

Blanquer A, Uriz MJ, Cebrian E, Galand PE Microbiome shift rather than a single pathogen is responsible for a disease of the Mediterranean sponge *Ircinia fasciculata.*

Blanquer A, Schmidtt S, Galand PE Different microbiomes depending on the primers used. Can we trust blindly in our results?