



**VARIABILIDAD DE LA  
EFICIENCIA DE CRECIMIENTO  
BACTERIANA EN SISTEMAS  
MARINOS COSTEROS**

**Zuriñe Baña García  
2020**

## Tesis Doctoral

---

# VARIABILIDAD DE LA EFICIENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANA EN SISTEMAS MARINOS COSTEROS

---

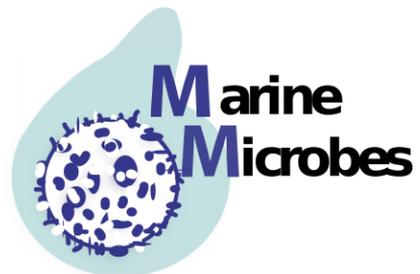
**Zuriñe Baña García**

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Directores:

**Dra. Begoña Ayo Millán**

**Dr. Juan Iriberry Ramalle**



Leioa, 2020



# Índice

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>2</b>
Los procariotas y el flujo del carbono en los sistemas acuáticos.....	3
Eficiencia de crecimiento bacteriana.....	5
Aspectos metodológicos.....	7
Factores reguladores.....	10
<i>Materia orgánica y nutrientes inorgánicos.....</i>	<i>10</i>
<i>Temperatura.....</i>	<i>11</i>
<i>Composición de la comunidad bacteriana.....</i>	<i>12</i>
<i>Nivel de actividad.....</i>	<i>13</i>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1:.....</b>	<b>19</b>
<b>Medidas precisas de respiración bacteriana mediante microsensores de oxígeno y cortos tiempos de incubación.....</b>	<b>19</b>
Resumen.....	21
Introducción.....	22
Material y métodos.....	26
<i>Estrategia experimental.....</i>	<i>26</i>
<i>Respiración bacteriana.....</i>	<i>26</i>
<i>Densidad y biomasa bacteriana.....</i>	<i>28</i>
<i>Producción bacteriana.....</i>	<i>29</i>
<i>Composición de la comunidad bacteriana.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>30</i>
Resultados.....	31
<i>Dinámicas del descenso de oxígeno.....</i>	<i>31</i>
<i>Medidas de respiración bacteriana.....</i>	<i>32</i>
<i>Cambios en la comunidad bacteriana a lo largo de la incubación.....</i>	<i>38</i>
Discusión.....	40

**CAPÍTULO 2:..... 45**

**La depredación por protozoos bacterívoros provoca cambios en la eficiencia de crecimiento bacteriana a través de alteraciones en la materia orgánica disuelta ..... 45**

Resumen .....47

Introducción.....48

Material y métodos.....51

*Muestreo y procedimiento experimental.....51*

*Densidad microbiana .....55*

*Producción bacteriana .....56*

*Respiración bacteriana .....56*

*Eficiencia de crecimiento y demanda de carbono bacteriana .....57*

*Actividades enzimáticas extracelulares .....57*

*Composición de la comunidad bacteriana.....58*

*Determinación de carbono orgánico disuelto.....59*

*Determinación de materia orgánica disuelta fluorescente.....59*

*Análisis estadístico.....60*

Resultados.....60

*Fase I: recolección y caracterización de la materia orgánica disuelta alterada .....60*

*Fase II: Tratamientos. Características de las comunidades bacterianas en el mar Cantábrico y el Mediterráneo.....63*

*Fase II: Tratamientos. Efecto de la materia orgánica disuelta biológicamente alterada en la actividad metabólica bacteriana .....66*

Discusión .....69

**CAPÍTULO 3:..... 79**

**La eficiencia de crecimiento bacteriana refleja la adaptación del bacterioplancton marino a cambios ambientales ..... 79**

Resumen .....81

Introducción.....82

Material y métodos.....85

*Estrategia de muestreo.....85*

*Densidad microbiana .....85*

<i>Composición de la comunidad bacteriana</i> .....	86
<i>Metabolismo bacteriano y actividades enzimáticas extracelulares.</i> .....	87
<i>Factores medioambientales</i> .....	90
<i>Análisis estadísticos</i> .....	92
Resultados .....	92
<i>Patrón estacional</i> .....	92
<i>Metabolismo bacteriano y actividad enzimática extracelular</i> .....	101
<i>Composición de la comunidad bacteriana</i> .....	103
Discusión .....	106
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>112</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>122</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>126</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	<b>154</b>



A decorative graphic consisting of stylized, flowing teal waves. The waves are rendered in various shades of teal, from light to dark, creating a sense of movement and depth. The graphic is positioned on the right side of the page, partially overlapping the text.

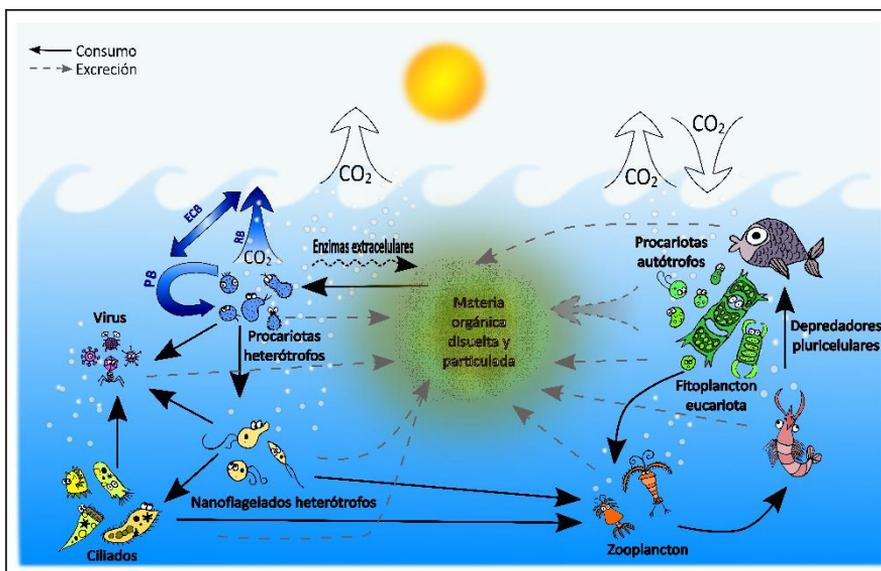
# INTRODUCCIÓN GENERAL



## Los procariotas y el flujo del carbono en los sistemas acuáticos

Los océanos ocupan el 71% de nuestro planeta y tienen una profundidad media de 4000 metros, formando una enorme masa de agua salada donde los microorganismos constituyen el grupo biológico dominante en densidad y en actividad (González *et al.*, 2008). Se estima que por cada mililitro de agua de mar podemos encontrar de media  $10^6$  procariotas,  $10^3$  nanoflagelados heterótrofos y  $10^9$  partículas víricas entre otros microorganismos (Fenchel, 2008). A pesar de su gran número, la función de los microorganismos en la columna de agua se subestimó durante mucho tiempo y se ignoró en gran medida en los modelos de cadenas tróficas marinas y flujo de carbono. Se pensaba que la mayoría de los procariotas eran metabólicamente inactivos, a pesar de que se estudiaron y cuantificaron utilizando la técnica de recuento en placas durante varias décadas (Zobell, 1946). Se consideraba que los realmente importantes en el ciclo del carbono eran solo los organismos fitoplanctónicos de gran tamaño, principalmente diatomeas y dinoflagelados, los cuales servían de alimento para el zooplancton, que a su vez servía de alimento para peces pequeños. Esta consecución de acontecimientos daba lugar a la conocida como cadena trófica clásica (Steele, 1976). Las mejoras en las técnicas aplicadas a la microbiología, como el recuento de procariotas mediante microscopía de epifluorescencia o el uso de glucosa y aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$ , mostraron que una parte sustancial de los procariotas estaban metabólicamente activos (Wright & Hobbie, 1965; Hobbie *et al.*, 1972; Meyer-Reil, 1978), y eran capaces de absorber grandes cantidades de  $\text{O}_2$  (Pomeroy, 1974). No fue hasta los años 80 cuando se reconoció el papel de los procariotas en la descomposición y remineralización de la materia orgánica y en el reciclaje de los nutrientes inorgánicos de los sistemas acuáticos (Williams, 1981; Kirchman *et al.*, 1982). Estos descubrimientos cambiaron por completo la visión que se tenía hasta entonces acerca del flujo del carbono en los sistemas acuáticos. En esta época, también se demostró que la densidad relativamente constante de los procariotas en la columna de agua era controlada principalmente por la actividad depredadora de los flagelados heterótrofos

(Fenchel, 1982) y ciliados (Borsheim, 1984). Azam y colaboradores (1983) establecieron por primera vez el término “bucle microbiano”, mostrando que la visión clásica de la estructura de las comunidades planctónicas marinas era incompleta, y colocando en el eje principal de la remineralización del carbono orgánico disuelto a la comunidad microbiana (Figura 0.1). Con el tiempo, se fueron reconociendo nuevos grupos funcionales con capacidades importantes en el bucle microbiano como, por ejemplo, la implicación de las bacterias fotosintéticas en la fijación del carbono atmosférico, los virus como causa importante de la lisis celular microbiana y el reciclaje de materia orgánica, o la presencia de protozoos mixótrofos con capacidades fotosintéticas y fagotrofas (Pomeroy *et al.*, 2007).



**Figura 0.1.** Flujo de carbono a través de la red trófica marina. PB: Producción bacteriana; RB: Respiración bacteriana; ECB: Eficiencia de crecimiento bacteriana.

Se ha demostrado que un procarionte del tamaño de un micrómetro puede alcanzar tasas metabólicas muy elevadas y que la masa total de procariontes en el océano excede la masa combinada de zooplankton y peces (Pomeroy *et al.*, 2007). Es por eso que hoy en día se reconoce que es la actividad de los procariontes heterótrofos la que determina principalmente el destino del carbono orgánico disuelto generado en los sistemas acuáticos. Por un lado, actúan como conexión con niveles tróficos superiores, incorporando la materia orgánica disuelta

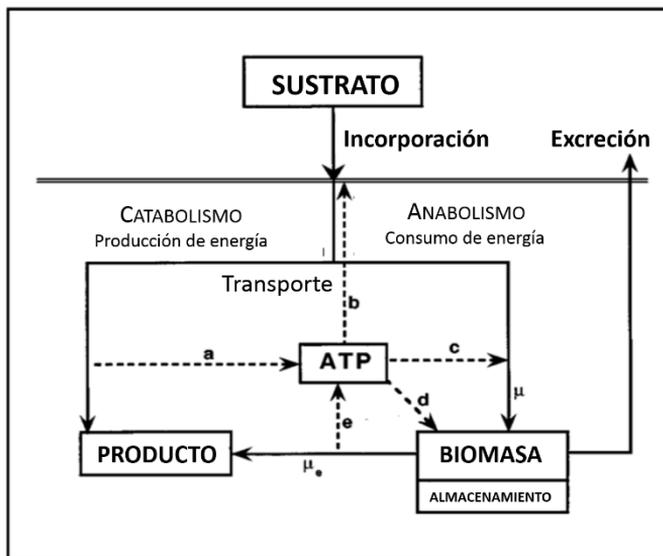
producida en gran parte por el plancton fotosintético a su biomasa, y canalizando parte de ese carbono y energía hacia los niveles tróficos superiores, compuestos por protozoos fagotrofos y mixótrofos, que posteriormente pasan al zooplancton, y finalmente a los peces y cetáceos. Por otro lado, parte del carbono disuelto incorporado por los procariotas planctónicos heterótrofos es respirado y liberado de nuevo a la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub>. Otra fracción de la materia orgánica procesada por el bacterioplancton puede liberarse al medio mediante mecanismos de excreción relacionados con su crecimiento, de tal forma que contribuyen al reciclaje del nitrógeno, fósforo y azufre. Mediante este proceso, los procariotas también colaboran en el almacenamiento a largo plazo de la materia orgánica recalcitrante en los sistemas acuáticos a través de la bomba de carbono microbiano (Buchan *et al.*, 2014). Pero a pesar de conocer la ocurrencia de estos procesos, la cuantificación de los mismos, es decir, la magnitud del flujo de carbono orgánico a través de la comunidad procariota, sigue siendo en gran medida desconocida. Es por esto por lo que para integrar el papel de los procariotas en modelos biogeoquímicos predictivos se necesita intensificar la investigación sobre cómo las actividades procariotas afectan al flujo de carbono en los sistemas acuáticos.

En el presente trabajo se utilizará el término bacteria en referencia al conjunto de procariotas, dado que este trabajo se desarrolló en aguas costeras del Cantábrico oriental donde la aportación de las arqueas a la comunidad total es muy baja (1 - 6%) (Alonso-Sáez *et al.*, 2009).

### **Eficiencia de crecimiento bacteriana**

No existen actualmente medios directos para medir el flujo del carbono orgánico disuelto a través del bacterioplancton, debido principalmente a limitaciones metodológicas. Como aproximación práctica, en su lugar se estima la eficiencia de crecimiento bacteriana (Ducklow & Carlson, 1992), definida como la fracción del carbono orgánico disuelto consumido que es incorporado en forma de biomasa. Esta variable es un reflejo del proceso en el que los sustratos orgánicos tomados por una bacteria son utilizados en parte en reacciones catabólicas para generar

ATP y en parte en reacciones anabólicas para la síntesis de biomoléculas que formarán parte de la biomasa, de los productos de almacenamiento y de los compuestos orgánicos que se liberan al medio (Figura 0.2) (del Giorgio & Cole, 1998). La eficiencia de crecimiento bacteriana es, por tanto, clave para determinar el papel ecológico y biogeoquímico de las bacterias heterótrofas en los sistemas acuáticos (del Giorgio & Cole, 1998). A pesar de su importancia ecológica, la estimación y comprensión de la eficiencia de crecimiento bacteriana está limitada por la variabilidad en las medidas y por la incertidumbre acerca de sus factores reguladores. Además, las bacterias pueden alterar el acoplamiento entre el catabolismo y el anabolismo para maximizar el crecimiento de acuerdo con las condiciones ambientales (Tempest & Neijssel, 1992; Russell & Cook, 1995), aumentando el coste energético cuando el crecimiento está limitado, lo que dificulta más aun la predicción de la eficiencia de crecimiento bacteriana en los sistemas acuáticos naturales.



**Figura 0.2.** Representación simplificada de las vías catabólicas y anabólicas que influyen en la eficiencia de crecimiento bacteriana. a: velocidad de oxidación de compuestos orgánicos y de generación a ATP; b: velocidad de consumo de ATP destinado a transporte activo de sustratos hacia el interior de la célula; c: velocidad de consumo de ATP (utilizado en reacciones anabólicas); d: velocidad de consumo de ATP (utilizado en la síntesis de moléculas orgánicas que son liberadas al exterior); e: velocidad de generación de ATP destinado a oxidación de compuestos endógenos;  $\mu$ : tasa de crecimiento;  $\mu_e$ : metabolismo endógeno, en el que  $\mu = 0$  (modificado de del Giorgio & Cole, 1998).

## Aspectos metodológicos

Los problemas metodológicos asociados a la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana son una causa muy probable de la variabilidad observada en el valor de este parámetro (Briand *et al.*, 2004; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b), por lo que aún es necesaria una metodología consistente para medir y comprender la magnitud del flujo del carbono en los sistemas acuáticos. Tradicionalmente la eficiencia de crecimiento bacteriana se calculaba de forma indirecta mediante la utilización de sustratos simples, generalmente lábiles, que generaban valores de eficiencia de crecimiento entre el 50% y el 97% (Hobbie & Crawford, 1969; Williams, 1981; Bjørnsen, 1986). Debido a que estos valores no necesariamente reflejaban la eficiencia con la que la comunidad de bacterias estaba creciendo a partir de la mezcla compleja de sustratos orgánicos que se pueden encontrar en un sistema acuático natural (Meyer *et al.*, 1987), esta metodología ha dejado de utilizarse, y en la actualidad es ampliamente admitido que los valores de eficiencia de crecimiento bacteriana en la mayoría de los sistemas acuáticos son menores que un 40% (del Giorgio & Cole, 1998; Toolan, 2001; Pradeep Ram *et al.*, 2003; Reinthaler & Herndl, 2005). La eficiencia de crecimiento bacteriana también puede estimarse indirectamente mediante los llamados experimentos de degradación del carbono orgánico disuelto (Carlson & Ducklow, 1996; Cherrier *et al.*, 1996; del Giorgio & Davis, 2003), donde su consumo (medido como desaparición de carbono orgánico disuelto) es comparado con el incremento de la biomasa bacteriana o del carbono orgánico particulado. Esta metodología requiere separar mediante filtración a la comunidad bacteriana de sus depredadores y realizar incubaciones largas (1 - 2 semanas), lo que conlleva cambios en la estructura de la comunidad a lo largo del periodo de incubación (Massana *et al.*, 2001; Gattuso *et al.*, 2002).

La metodología más ampliamente utilizada para la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana consiste en estimar simultáneamente la producción bacteriana y la respiración bacteriana. Desde los años 80 del pasado siglo, para medir la producción bacteriana la mayoría de los autores utilizan de forma

rutinaria la incorporación de compuestos radioactivos, como pueden ser la timidina que es incorporada en el DNA (Fuhrman & Azam, 1980) o la leucina que es incorporada en las proteínas (Kirchman *et al.*, 1985; Simon & Azam, 1989). Algunos autores han optado por utilizar un compuesto no radioactivo que se incorpora al DNA de las bacterias, el bromodioxuridine (BrDU) (Steward & Azam, 1999; Nelson & Carlson, 2005). Si bien estos métodos cuentan con la ventaja indudable de poder obtener resultados en periodos de incubación cortos (1 – 2 h), todos ellos requieren la utilización de factores de conversión empíricos o teóricos para calcular la producción de células o biomasa que, al no ser constantes, añaden variabilidad a los valores de eficiencia de crecimiento bacteriana (del Giorgio & Cole, 2000; Sherry *et al.*, 2002; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b).

Las medidas de respiración bacteriana han sido notablemente más escasas que las de producción bacteriana, posiblemente debido a las dificultades metodológicas asociadas a su determinación (Wikner *et al.*, 2013). La determinación de la respiración bacteriana se puede realizar de varias maneras: midiendo la tasa de producción de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub> asociados a la incorporación y degradación de un sustrato dado; mediante la cuantificación de la actividad de una enzima respiratoria; o utilizando estimaciones predictivas en base a la biomasa, la actividad o la composición de la comunidad bacteriana (Robinson & Williams, 2005). La necesidad de obtener variaciones significativas en los parámetros estimados mediante estos métodos a menudo requiere la utilización de incubaciones largas (24 - 72 h), en las que el efecto botella puede inducir cambios en la composición de la comunidad bacteriana (Massana *et al.* 2001; Gattuso *et al.* 2002) y / o agotar los recursos tróficos (Pradeep Ram *et al.*, 2003). En consecuencia, los resultados obtenidos pueden estar distorsionados en tanto que no son representativos de la comunidad bacteriana inicial. Para evitar este problema, es importante estimar la respiración con un método de alta precisión que reduzca el tiempo de incubación al mínimo posible. Además, las técnicas más comúnmente utilizadas para medir la respiración bacteriana,

generalmente las determinaciones de las tasas de consumo de oxígeno disuelto, requieren la separación de la comunidad bacteriana del resto de la comunidad planctónica, mediante inhibidores selectivos o más comúnmente mediante filtración. La separación previa a la incubación mediante filtración generalmente se realiza a través de filtros de entre 0,6 y 3  $\mu\text{m}$  (habitualmente  $\sim 0,8 \mu\text{m}$ ). Este proceso de prefiltración altera la respiración de la comunidad debido a daños en los organismos, a cambios en la disponibilidad del carbono orgánico e incluso a la interrupción de las interacciones con otras comunidades planctónicas (Gasol & Morán, 1999; Robinson, 2008). Además, y dado que existe un solapamiento de tamaños entre el bacterioplancton y los protozoos de los que se les pretende separar, la eficacia de la filtración a menudo dista de ser total: bien una parte de la comunidad procariota queda retenida en el filtro, bien los protozoos más pequeños atraviesan el filtro y pasan al filtrado, por lo que habitualmente se deben utilizar asunciones acerca de la contribución de esas bacterias a la respiración total de la comunidad bacteriana. En consecuencia, después de la filtración la comunidad bacterioplanctónica es diferente a la original, en cuanto a su composición filogenética y actividad (Pomeroy *et al.*, 1994; Robinson & Williams, 2005). Dichos problemas metodológicos pueden conducir a estimaciones erróneas de la respiración bacteriana en muestras prefiltradas (Teira *et al.* 2010).

La respiración bacteriana es el componente principal de la respiración de la comunidad planctónica en la mayoría de los sistemas acuáticos (Williams, 1981; Hopkinson *et al.*, 1989; Jahnke & Craven, 1995). Sin embargo, las estimaciones de este parámetro aportadas en diferentes investigaciones científicas son muy dispares debido, en gran parte, a las imprecisiones inherentes a la metodología empleada, y esta variabilidad en los datos condiciona la interpretación del balance general de carbono y gases en los ecosistemas acuáticos. Es por ello que en el **Capítulo 1** de esta tesis se abordan las dificultades metodológicas asociadas a la estimación de la respiración bacteriana, y se propone un método de elevada precisión para solventarlas.

## Factores reguladores

Son múltiples los procesos implicados en la actividad celular que determinan la eficiencia de crecimiento bacteriana (Figura 0.2) y cada uno de ellos puede responder a un conjunto diferente de factores ambientales, tanto físico - químicos como biológicos (del Giorgio & Cole, 1998), que contribuyen a aumentar la variabilidad de los valores de eficiencia de crecimiento estimados en los sistemas acuáticos. A continuación, se detallan aquellos aspectos que se han considerado como posibles factores reguladores de la eficiencia de crecimiento bacteriana.

### *Materia orgánica y nutrientes inorgánicos*

La eficiencia de crecimiento bacteriana está sujeta a rápidos cambios derivados de la variabilidad en la concentración de nutrientes inorgánicos (Kroer, 1993; Tortell *et al.*, 1996; Benner *et al.*, 1998), en la disponibilidad de carbono con respecto a los nutrientes disueltos (C:N) (Touratier *et al.*, 1999), así como en la cantidad, calidad y tamaño de la materia orgánica presente en el medio (Pomeroy & Wiebe, 2001; Amon & Benner, 1994 y 1996; Eiler *et al.*, 2003).

En estudios experimentales se ha observado una relación inversa entre la eficiencia de crecimiento bacteriana y la ratio C:N de la materia orgánica disuelta (Goldman *et al.*, 1987; Kroer, 1993; Pradeep Ram & Chandramohan, 2003). A su vez, del Giorgio & Cole (1998) mostraron una tendencia positiva de la eficiencia de crecimiento bacteriana a lo largo del gradiente en el estado trófico del ecosistema. Por el contrario, otros estudios parecen indicar que es la calidad de la materia orgánica disuelta, más que la cantidad, la impulsora de valores más altos de eficiencia de crecimiento bacteriana en los sistemas más eutróficos (Kritzberg, 2005; Apple & del Giorgio, 2007). En este sentido, los pocos estudios estacionales que incluyen valores de eficiencia de crecimiento bacteriana llevados a cabo en aguas marinas sugieren que esta variable está en gran parte determinada por la labilidad del carbono orgánico disuelto (Lemée *et al.*, 2002; Reinthaler & Herndl, 2005).

Otro factor medioambiental importante que puede afectar a la utilización de la materia orgánica disuelta por parte de las bacterias es la exposición a la luz. La irradiación de la materia orgánica disuelta puede aumentar la proporción de materia orgánica lábil y de bajo peso molecular, más accesible y favorable para ser incorporada por las bacterias, lo cual conllevaría un aumento en el crecimiento bacteriano (Miller & Moran, 1997; Moran *et al.*, 2000; Tranvik & Bertilsson, 2001; Obernosterer & Benner, 2004), así como en la eficiencia de crecimiento bacteriana (Reche *et al.*, 1998). Sin embargo, en otros trabajos se ha observado que en presencia de luz la respiración bacteriana se ve estimulada en mayor medida que la producción y, por tanto, se observan valores de eficiencia de crecimiento más bajos y demandas de carbono más altas durante la exposición a la luz con respecto a la oscuridad (Cottrell *et al.*, 2008; Pringault *et al.*, 2009).

Por otro lado, el protistoplancton bacterívoro (González *et al.*, 1990; Lebaron *et al.*, 1999) y las partículas víricas (Middelboe *et al.*, 1996), como causantes de lisis celular, liberan compuestos orgánicos de distinta naturaleza y labilidad que contribuyen a la reserva de materia orgánica disuelta (Nagata & Kirchman, 1991; Strom *et al.*, 1997; Nagata, 2000; Carlson, 2002), lo cual podría tener un impacto relevante en la eficiencia de crecimiento de la comunidad bacteriana. Pero hasta lo que conocemos, la influencia de la depredación y lisis celular en la eficiencia de crecimiento bacteriana mediada por la alteración de la materia orgánica disuelta todavía no ha sido estudiada. Este aspecto se discute en el **Capítulo 2** de esta tesis.

### *Temperatura*

De acuerdo con la ecuación de Arrhenius, la velocidad de cualquier reacción bioquímica aumenta a medida que aumenta la temperatura (Arrhenius, 1889). Sin embargo, llaman la atención los resultados contradictorios que se observan en los estudios que han analizado la relación entre la eficiencia de crecimiento bacteriana y la temperatura del agua. Rivkin & Legendre (2001) se basaron en la recopilación de datos obtenidos en diferentes sistemas acuáticos para sugerir una dependencia inversa de la eficiencia de crecimiento bacteriana frente a la temperatura. Esta misma relación se ha observado en algunos experimentos de

manipulación (Iturriaga & Hoppe, 1977; Tison & Pope, 1980; Griffiths *et al.*, 1984; Roland & Cole, 1999), mientras que en otros estudios similares no se observa tal efecto (Crawford *et al.*, 1974). En los trabajos en los que se ha analizado la variabilidad estacional de la eficiencia de crecimiento bacteriana, los resultados también han sido contradictorios; en algunos casos se ha observado un efecto negativo de la temperatura sobre la eficiencia de crecimiento bacteriana (Bjørnsen, 1986; Daneri *et al.*, 1994), en otros casos el efecto ha sido positivo (Roland & Cole, 1999; Lee *et al.*, 2002; Reinthaler & Herndl, 2005; Apple *et al.*, 2006) y en otros casos se ha detectado poco o ningún efecto (Kroer, 1993; Toolan, 2001; Pradeep Ram *et al.*, 2003). No está claro aún hasta qué punto estas discrepancias son debidas a diferencias en la metodología utilizada, o si realmente reflejan una variabilidad en el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de crecimiento bacteriana en diferentes sistemas acuáticos en función de otros parámetros no controlados. Este aspecto se analiza en el **Capítulo 3** de esta tesis.

#### *Composición de la comunidad bacteriana*

Aunque la composición de la comunidad bacteriana ha sido considerada también como un posible factor regulador del procesamiento del carbono en los sistemas acuáticos naturales, no hay demasiada información acerca de cómo podría afectar a la eficiencia de crecimiento bacteriana (Cottrell & Kirchman, 2000). En estudios realizados en laboratorio con cultivos puros de bacterias se observó que, para una combinación determinada de parámetros de crecimiento, diferentes especies de bacterias exhibían un amplio rango de valores de eficiencia de crecimiento bacteriana (Heijnen & Van Dijken, 1992). Sin embargo, en trabajos realizados con comunidades bacterianas naturales más complejas, los resultados han sido de nuevo contradictorios. Así, en un estudio realizado en la bahía de Blanes, Alonso-Sáez y colaboradores (2008) no encontraron ninguna relación entre la estructura de la comunidad y las medidas generales de metabolismo del carbono, al contrario que lo observado en otros sistemas marinos (Fuhrman *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). En el **Capítulo 3** de esta tesis se discute el grado de

implicación de la composición de la comunidad en la regulación de la eficiencia de crecimiento bacteriana.

La depredación por protozoos bacterívoros es una de los principales procesos que dan forma a la composición genotípica y fenotípica de la comunidad bacteriana en los sistemas acuáticos (Jürgens & Güde, 1994). Debido a la depredación selectiva por parte del protistoplancton, con preferencia por las células de tamaño intermedio y de vida libre más activas, se producen cambios en la distribución de tamaños y morfologías, en la composición de grupos filogenéticos y en la actividad de la comunidad bacteriana (Hahn & Höfle, 2001), que a su vez puede provocar cambios en la eficiencia de crecimiento bacteriana de la comunidad.

### *Nivel de actividad*

Es probable que no todas las bacterias contribuyan de la misma forma al flujo del carbono en los sistemas acuáticos, ya que los distintos componentes de la comunidad pueden encontrarse en diferentes grados de actividad metabólica (Warkentin, 2011). Según del Giorgio & Cole (2000), las bacterias que se encuentran en crecimiento activo incorporan gran cantidad de sustrato y su respiración es relativamente baja, mientras que cuando las bacterias utilizan los productos de almacenamiento interno para el mantenimiento del metabolismo, el consumo de sustrato es bajo o ausente, participan en menor medida en la producción bacteriana y el crecimiento y su respiración es alta, lo que disminuye la eficiencia de crecimiento bacteriana de toda la comunidad. El nivel de actividad metabólica de los distintos grupos funcionales de bacterias en comunidades naturales es poco conocido, así como la influencia que las grandes cantidades de células latentes o en estado de cambio que existen en el medio puedan tener en la incorporación y transformación del carbono y en la eficiencia de crecimiento bacteriana. Bajo esta premisa, la proporción entre la densidad de células muy activas e inactivas podría ser otro factor regulador de la eficiencia de crecimiento bacteriana en los sistemas acuáticos.

A día de hoy, existe una gran incertidumbre sobre los factores que regulan la eficiencia de crecimiento bacteriano y su importancia relativa en este proceso, lo que imposibilita predecir con precisión los valores de eficiencia de crecimiento esperables de unas condiciones ambientales concretas. Por ello, los **Capítulos 2 y 3** de esta tesis doctoral profundizan en el conocimiento de los factores reguladores de la eficiencia de crecimiento bacteriano en los sistemas marinos costeros y cuantifican su contribución real a este proceso.



## OBJETIVOS



A pesar de su importancia ecológica, es llamativa la escasez de resultados precisos de eficiencia de crecimiento bacteriana y de los factores que regulan su magnitud en los sistemas acuáticos naturales. Los problemas metodológicos asociados a su determinación y la incertidumbre acerca de los factores que pueden influir en ella, afectan directamente a nuestro conocimiento sobre el flujo de carbono en los sistemas acuáticos.

Con el objetivo general de contribuir a la comprensión y predicción del flujo del carbono en los sistemas acuáticos, en esta tesis se establece una metodología adecuada para la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana, y se profundiza en el conocimiento de los factores que regulan esta variable en sistemas marinos costeros.

Para alcanzar el objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones adecuadas para la obtención de medidas precisas y fiables de respiración bacteriana en sistemas acuáticos naturales, mediante un sistema de micro-respirometría y microsensores de oxígeno (**Capítulo 1**).
2. Determinar la influencia que ejerce la depredación por protozoos bacterívoros en la eficiencia de crecimiento bacteriana a través de la alteración que provocan en la materia orgánica disuelta (**Capítulo 2**).
3. Analizar la variación temporal de la eficiencia de crecimiento y los factores que la regulan en aguas costeras del Cantábrico oriental (**Capítulo 3**).



# CAPÍTULO 1:

Medidas precisas de respiración bacteriana  
mediante microsensores de oxígeno y cortos  
tiempos de incubación





## Resumen

El bacterioplancton es el componente biológico más importante en la transformación y mineralización de la materia orgánica en los sistemas acuáticos, por lo que es esencial para la comprensión del ciclo del carbono conocer con precisión la cantidad de carbono orgánico que estas bacterias convierten en CO<sub>2</sub> y liberan a la atmósfera. Sin embargo, las medidas de respiración bacteriana son escasas y muy variables, principalmente debido a limitaciones metodológicas. Con el fin de optimizar un método que permita obtener medidas precisas de respiración bacteriana en los sistemas acuáticos naturales, se recogieron un total de 120 muestras de agua de mar superficial en aguas costeras del Cantábrico oriental entre el 2007 y el 2009, y se monitorizó el descenso en la concentración de oxígeno disuelto mediante microsensores de oxígeno en cada muestra de forma continua durante 24 h. Se identificó una pérdida de la linealidad en la tendencia de descenso del oxígeno disuelto a partir de las 3 - 6 horas de incubación. Estos cambios en la dinámica de respiración estuvieron asociados a cambios en la densidad, la actividad y la composición de la comunidad, especialmente en aquellas muestras con bajas densidades bacterianas iniciales. La utilización de periodos de incubación superiores a 12 h contribuye a la sobrestimación de la respiración bacteriana. Los microsensores de oxígeno permiten identificar los cambios en las dinámicas de respiración y reducir el tiempo de incubación a periodos inferiores a 6 h, lo que permite obtener medidas de respiración bacteriana precisas y acordes a la realidad del ecosistema.

## Introducción

Debido a su abundancia numérica, el bacterioplancton se considera el componente biológico más importante en la transformación y mineralización de la materia orgánica (Cho & Azam, 1988; Fuhrman, 1992), y su actividad es fundamental especialmente al considerar el ciclo del carbono de los sistemas acuáticos. Conocer la tasa de mineralización o respiración llevada a cabo por el bacterioplancton resulta de gran importancia para estimar con mayor precisión la cantidad de carbono orgánico que se mineraliza a CO<sub>2</sub> y es liberado a la atmósfera. A pesar de que la respiración bacteriana representa el impulsor biológico más importante del intercambio de CO<sub>2</sub> con la atmósfera (Williams & del Giorgio, 2005) y de la importancia ecológica y biogeoquímica que esto supone, es uno de los procesos metabólicos bacterianos menos estudiados a nivel de ecosistema. Las primeras medidas de respiración se remontan a principios del siglo XX (Gaarder & Gran, 1927), pero durante décadas las medidas de respiración fueron muy escasas, y se utilizaron principalmente para corregir las medidas de fotosíntesis. No fue hasta la publicación de los trabajos de Pomeroy & Johannes (1966 y 1968) cuando la respiración comenzó a ser considerado por la comunidad científica como un proceso importante en sí mismo. Sin embargo, hasta una década más tarde no se desarrollaron técnicas que permitieran medir la respiración bacteriana utilizando períodos de incubación lo bastante reducidos para ser considerados aceptables (12 - 24 h) (Bryan *et al.*, 1976). Actualmente, las dificultades metodológicas siguen obstaculizando la obtención de medidas de respiración bacteriana precisas y fiables en los sistemas acuáticos.

Las tasas de respiración bacteriana se pueden determinar de varias maneras. La forma más directa consiste en seguir la evolución de la concentración del carbono inorgánico o del oxígeno disuelto a lo largo de la incubación, aunque esto último implica la utilización de un cociente respiratorio para convertir el oxígeno disuelto consumido en CO<sub>2</sub> producido. Debido a la alta concentración de carbono inorgánico en el agua de mar, el análisis colorimétrico para medir la generación de CO<sub>2</sub> (Johnson *et al.*, 1993; Robinson & Williams, 1999) queda restringido a

sistemas oceánicos con alta actividad planctónica. Por tanto, por razones de sensibilidad, en la mayoría de los casos se ha utilizado la medida de la concentración de oxígeno disuelto, siendo el método Winkler el más ampliamente utilizado para su determinación (Williams & Jenkinson, 1982; Culberson & Huang, 1987; Biddanda *et al.*, 1994; Smith & Praire, 2004). El método Winkler es considerado uno de los métodos más precisos para medir la concentración de oxígeno disuelto, con un límite de detección teórico de  $0,07 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , aunque la precisión reportada en la práctica experimental varía entre 0,1 y 2  $\text{mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Biddanda *et al.*, 1994; Duarte *et al.*, 2004; Maranger *et al.*, 2005). Aun así, presenta ciertas características que pueden dificultar su uso a la hora de estimar la respiración bacteriana de forma precisa en sistemas acuáticos naturales: el análisis de las muestras es discreto, necesita largos tiempos de incubación para generar una medida fiable (12 - 72 h) y asume un descenso lineal de la concentración de oxígeno disuelto, sin considerar las posibles variaciones en las velocidades de consumo que puedan darse a lo largo de la incubación por la comunidad bacterioplanctónica (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002). Además, requiere varias réplicas de volúmenes de muestra relativamente elevados (típicamente de 60 - 120 ml), y conlleva la utilización de disoluciones químicas cuya manipulación y volatilización pueden añadir variabilidad a las medidas (Helm *et al.*, 2012).

Los métodos enzimáticos, como la medida de la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) *in vitro* (Packard *et al.*, 1988), también han sido utilizados como métodos alternativos para medir respiración bacteriana. Esta metodología implica la extracción de la CTE y, por tanto, la estimación de su actividad máxima (potencial) en condiciones *in vitro*. Sin embargo, en condiciones naturales, esta actividad está controlada por la tasa de fosforilación oxidativa y no llega a su valor máximo en toda la célula, por lo que las estimaciones obtenidas con esta metodología requieren ser corregidas mediante un algoritmo que debe ser determinado empíricamente (Robinson & Williams, 2005), y limita en gran medida la aplicación de esta técnica de forma rutinaria. La utilización de estos

factores lleva asociada una tasa de error del 30% (Aristegui & Montero, 1995), lo que contribuye a aumentar la variabilidad de las medidas de respiración bacteriana. Para hacer frente a este problema, más recientemente Martínez-García y colaboradores (2009) adaptaron la técnica de la medida de la actividad de la CTE *in vivo* al estudio de la respiración de la comunidad microbiana en sistemas acuáticos. A diferencia de la técnica *in vitro*, no es necesaria la extracción de los componentes de la CTE, ya que se añade directamente a la muestra un aceptor de electrones capaz de atravesar la membrana plasmática. La principal ventaja de esta técnica reside en que permite obtener la tasa real de respiración *in vivo*. Además, permite determinar conjuntamente la respiración de la comunidad bacteriana y de la comunidad microbiana total, sin necesidad de filtrar previamente la muestra. De esta manera, se pueden aplicar simultáneamente condiciones de incubación muy diferentes en las muestras, lo que abre la puerta a la realización de estudios más complejos. Sin embargo, las sales de tetrazolio que se utilizan y la acumulación de cristales de formazán en el proceso pueden resultar tóxicos para las células (Gasol & Aristegui, 2007) y conllevar una subestimación de las medidas de respiración.

Otros métodos utilizados para medir la respiración bacteriana en los sistemas acuáticos naturales son los sensores ópticos de oxígeno (optodos) (Klimant, 1995; Warkentin *et al.*, 2007; Chipman *et al.*, 2012) o los microsensors de oxígeno basados en los electrodos Clark (Briand *et al.*, 2004). Ambos métodos permiten monitorizar el descenso en la concentración de oxígeno disuelto en la muestra de forma continua, y detectar los posibles cambios en su velocidad de consumo a lo largo de la incubación. Tanto los optodos como los microsensors de oxígeno tienen una precisión equivalente o incluso superior a la del método Winkler (0,3  $\mu\text{M O}_2$  frente a 0,1-0,5  $\mu\text{M O}_2$ , respectivamente) (Pyroscience; Briand *et al.*, 2004) y ambos tienen una alta reproducibilidad, lo que permiten obtener valores de concentración de oxígeno disuelto sin necesidad de utilizar grandes volúmenes de muestra o un gran número de réplicas. Además, la ausencia de consumo de oxígeno por el microsensor gracias a la implementación del cátodo (Revsbech,

1989) también es una ventaja considerable respecto a otros equipos de medición de oxígeno en aguas planctónicas que implican macrosondas (Griffith, 1988; Langdon, 1993), las cuales exhiben un consumo de oxígeno interno y conducen a una sobreestimación de la medida de respiración bacteriana a menos que sea corregida. La mayor desventaja que presenta la utilización de los optodos o microsensores para medir respiración bacteriana es que en ambos casos es necesario separar la comunidad bacteriana del protistoplancton y de organismos de gran tamaño mediante prefiltración.

Actualmente, las mediciones de respiración bacteriana en los sistemas acuáticos siguen siendo escasas y muy variables, debido principalmente a los problemas metodológicos anteriormente mencionados. Esta incertidumbre en las medidas de respiración es uno de los principales factores que limitan el conocimiento sobre el funcionamiento del ciclo del carbono en los sistemas acuáticos (del Giorgio & Cole, 1998; Morán *et al.*, 2007; Gasol *et al.*, 2008; Robinson, 2008). En este sentido, se hace necesario optimizar un método que permita obtener medidas precisas de respiración en los sistemas acuáticos. Dadas a las ventajas metodológicas que presentan con respecto a otros métodos, los microsensores de oxígeno se postulan como una herramienta útil para la determinación de la respiración bacteriana. Así, en este trabajo se planteó como objetivo determinar la forma más adecuada de utilizar los microsensores de oxígeno con muestras de agua de mar y definir los límites de los tiempos de incubación aplicables para obtener medidas de respiración representativas de la comunidad natural. Así mismo, se compararon los resultados obtenidos mediante los microsensores de oxígeno con las medidas de respiración bacteriana obtenidas hasta el momento por la comunidad científica mediante otras técnicas en diferentes sistemas acuáticos.

## Material y métodos

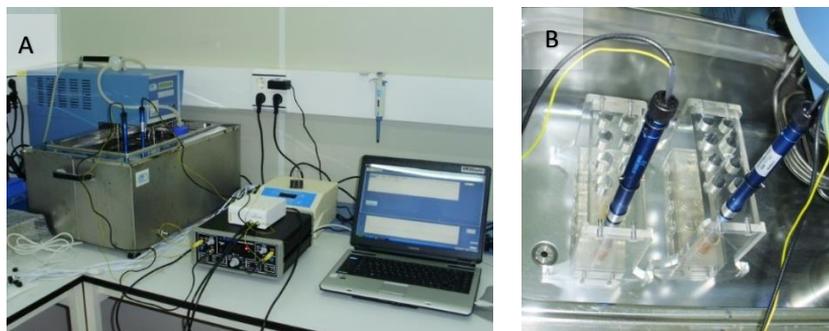
### *Estrategia experimental*

Durante los años 2007 a 2009 se recogieron un total de 120 muestras de agua de mar superficial (0,5 m de profundidad) en aguas costeras del Cantábrico oriental (43°44'N, 2°90'W, Armintza, Bizkaia). Las muestras se filtraron por filtros de fibra de vidrio Millipore AP25 (tamaño de poro nominal de 0,9  $\mu\text{m}$ ) con una eficiencia de recuperación del 89% - 100%, para separar las bacterias del resto de la comunidad planctónica. A continuación, se monitorizó de forma continua el descenso en la concentración de oxígeno disuelto en cada muestra por duplicado durante 24 h, lo que nos permitió simular los largos periodos de incubación que se utilizan habitualmente en otros métodos para medir respiración. Para identificar la posible sucesión de cambios en el tamaño, la actividad y la composición de la comunidad a lo largo de la incubación en recipientes cerrados, se realizaron medidas puntuales de densidad, biomasa y producción bacteriana a tiempo inicial en todas las muestras, y en una selección de 12 muestras se determinaron estos mismos parámetros también al cabo de  $\leq 6$  h, 12 h y 24 h de incubación. Además, se seleccionaron 10 muestras para la determinación de la composición de la comunidad bacteriana al comienzo de la incubación, así como al cabo de 12 h y 24 h de incubación.

### *Respiración bacteriana*

La respiración bacteriana se determinó mediante la estimación del descenso en las concentraciones del oxígeno disuelto en la muestra, utilizando un sistema de micro-respirometría modular (Unisense) que permite medidas continuas utilizando amperimetría, y dos microsensores de oxígeno (OX-MR) (Briand *et al.*, 2004) (Figura 1.1). Para ello, de cada una de las 120 muestras de agua de mar prefiltrada, se tomaron dos submuestras que se introdujeron cuidadosamente y evitando la formación de burbujas en sendas cámaras de vidrio de borosilicato de 4 ml selladas mediante tapones con un agujero capilar (15 x 33 mm), diseñadas para evitar el intercambio de oxígeno con el exterior. Para evitar la generación de microburbujas en el interior de las cámaras derivadas de cambios en la solubilidad

del oxígeno, las submuestras se aclimataron a la temperatura de incubación antes de ser introducidas en ellas. Las submuestras se incubaron en oscuridad dentro de un baño de temperatura controlada, a la temperatura *in situ* (desviación de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) del agua de mar en el momento del muestreo (rango de  $11^{\circ}\text{C} - 21,5^{\circ}\text{C}$ ).



**Figura 1.1.** Sistema modular de micro-respirometría de Unisense. (A) Baño de temperatura controlada, dos microsensores de oxígeno OX-MR, amperímetro AP2000 y convertidor ADC-216, unidades de control de la agitación y ordenador. (B) Dos soportes para las cámaras de medida sumergidos en el baño, y dos microsensores OX-MR introducidos en sendas cámaras de calibración.

El descenso de la concentración de oxígeno dentro de cada cámara se monitorizó cada 30 s durante 24 h mediante un sensor de oxígeno OX-MR, que consiste en un sensor tipo Clark de  $500\ \mu\text{m}$  dentro de una guía de aluminio que termina en una punta de plástico, caracterizado por una capacidad de respuesta menor a 1 s y una precisión de  $0,1\ \mu\text{M}$ , y diseñado con un cátodo exterior que reduce al mínimo el consumo de oxígeno por parte del electrodo (aproximadamente  $2 \times 10^{-9}\ \text{mg O}_2\ \text{min}^{-1}$ ). En el sistema modular de micro-respiración, la adquisición de los datos se realizó con el picoamperímetro PA2000 y el convertidor ADC-216 de Unisense a los que estaba conectado el sensor. Las submuestras se mantuvieron con una suave homogeneización durante la incubación mediante agitadores magnéticos controlados por una unidad de control independiente. Todo el material utilizado se lavó con ácido (HCl 10%) y aclarado abundantemente con agua Milli Q antes de cada medida. El sensor de oxígeno se calibró antes de cada medida utilizando agua Milli Q estéril con concentraciones de oxígeno de 0% y 100% (saturada), que permitieron relacionar la concentración de oxígeno disuelto de sendas soluciones con la señal recibida del sensor (mV). La concentración de oxígeno en cada momento se determinó como porcentaje de saturación de

oxígeno, y se transformó en concentración ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) teniendo en cuenta la salinidad y temperatura de cada muestra.

Para cada réplica se realizó un análisis de regresión lineal entre la concentración de oxígeno y el tiempo transcurrido, y se estimaron dos medidas de consumo de oxígeno de la comunidad bacteriana, atendiendo a los cambios observados en las dinámicas del descenso en la concentración de oxígeno disuelto: la medida RB1, en la que se utilizaron periodos de incubación inferiores o iguales a 6 h; y la medida RB2, en la que se utilizaron periodos de incubación superiores o iguales a 12 h. Los consumos de oxígeno fueron transformados en respiración de carbono utilizando un coeficiente de respiración de 1 (del Giorgio *et al.*, 2006).

### *Densidad y biomasa bacteriana*

La densidad bacteriana se determinó mediante recuento directo por microscopía de epifluorescencia según la técnica descrita en Porter & Feig (1980). Las muestras se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico (concentración final 2% v/v) y filtrada (0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro), y se conservaron a 4°C en oscuridad. Se tomó 1 ml de cada muestra, se tiñeron con DAPI (concentración final 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) durante 10 min y posteriormente se filtraron a través de filtros negros de policarbonato (Whatman) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los filtros se montaron en un portaobjetos de vidrio con aceite de inmersión no fluorescente. Las muestras se analizaron por duplicado, y se contaron 20 campos seleccionados aleatoriamente para cada filtro en un microscopio Nikon Optiphot con equipamiento de epifluorescencia EF-D (aumentos 1250x).

La determinación de la biomasa de las bacterias se llevó a cabo mediante la determinación del biovolumen bacteriano por análisis de imagen semiautomático (Massana *et al.*, 1997). Las imágenes de las células procariotas teñidas con DAPI (Porter & Feig, 1980) se captaron mediante una cámara Hamamatsu C2400 conectada al microscopio Nikon Optiphot con equipamiento de epifluorescencia EF-D y mediante una tarjeta de video LG-3 (Scion Corporation) se digitalizaron para su posterior análisis por ordenador mediante el programa NIH Scion Image 1.61. En cada muestra se midieron las dimensiones de 200 - 250 procariotas. Una

vez determinado el biovolumen celular, éste se transformó en biomasa empleando el modelo alométrico de Norland (1993). Este análisis se realizó en 12 de las 120 muestras, y se determinó la biomasa bacteriana, además de en el tiempo inicial (0 h), en tres momentos durante el periodo de incubación: en el momento utilizado para medir RB1 ( $\leq 6$  h), en el momento utilizado para medir RB2 ( $\geq 12$  h), y al final de la incubación (24 h). El factor de aumento de la biomasa bacteriana se calculó dividiendo el valor obtenido en los diferentes tiempos de incubación ( $\leq 6$  h, 12 h y 24 h) con respecto al valor a tiempo inicial.

### *Producción bacteriana*

La producción bacteriana se estimó a partir de las tasas de la incorporación de timidina tritiada según el método de Kirchman *et al.* (1985). Para cada muestra se tomaron cinco submuestras de 5 ml. Dos de ellas se fijaron con ácido tricloroacético (ATC) y se utilizaron como blancos. Las 5 submuestras se incubaron a temperatura *in situ* en oscuridad durante 1 h con el isótopo ( $[^3\text{H}]$ -Timidina) a concentración saturante (concentración final 50 nM). Las incubaciones se detuvieron añadiendo ATC (concentración final 5%) y colocando las submuestras en hielo durante 5 min. A continuación, las submuestras se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa (Sartorius) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se lavaron cinco veces con 5 ml de ATC 5%. Los filtros se dejaron secar, se introdujeron en viales de centelleo y se mezclaron con 500  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo durante 20 min. Después, se añadieron 4 ml de cóctel de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR, utilizando estándares externos para la corrección de la extinción. La velocidad de producción bacteriana se estimó utilizando dos factores de conversión: para la conversión de la incorporación de timidina a número de células se utilizó un factor teórico de  $1,7 \times 10^{18}$  cél mol de timidina $^{-1}$  (Fuhrman & Azam, 1982), y para la conversión del número de células a cantidad de carbono se utilizó la biomasa procariota media en cada muestra (fgC cél $^{-1}$ ). En 12 de las 120 muestras se determinó la producción bacteriana, además de en el tiempo inicial (0 h), en tres momentos durante el periodo de incubación: en el momento

utilizado para medir RB1 ( $\leq 6$  h), en el momento utilizado para medir RB2 ( $\geq 12$  h), y al final de la incubación (24 h).

### *Composición de la comunidad bacteriana*

En 10 de las 120 muestras analizadas se determinó la composición de la comunidad bacteriana mediante la técnica CARD-FISH descrita por Pernthaler *et al.* (2002), en tres momentos del periodo de incubación: a tiempo inicial (0 h), a las 12 h de incubación y al final de la incubación (24 h). Se utilizaron sondas de oligonucleótidos marcados con HRP (horseradish peroxidase) diseñadas para detectar específicamente organismos pertenecientes al dominio *Bacteria* (mezcla de EUB I (Amann *et al.*, 1990) y EUB II-III (Daims *et al.*, 1999)) y cuatro de sus principales grupos filogenéticos: ALF968 (Neef, 1997) para las *Alfaproteobacteria*; BET42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Betaproteobacteria*; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Gammaproteobacteria*; y CF319a (Manz *et al.*, 1996) para los *Bacteroidetes*. La sonda antisentido NON338 (Wallner *et al.*, 1993) se utilizó como control negativo. Todas las hibridaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 35°C, seguidas de 15 min de amplificación con tiramida-Alexa488. La concentración de la formamida en el tampón de hibridación fue del 55%, excepto para las sondas ALF968 y NON338, que fueron de 45% y 20% respectivamente. Las secciones de los filtros en los que se llevó a cabo la hibridación fueron teñidas con DAPI (4'6'-diamidino-2phenyl-indol) para posteriormente realizar la enumeración de bacterias mediante microscopía de epifluorescencia y calcular el porcentaje de hibridación de cada sonda con respecto al total de bacterias.

### *Análisis estadístico*

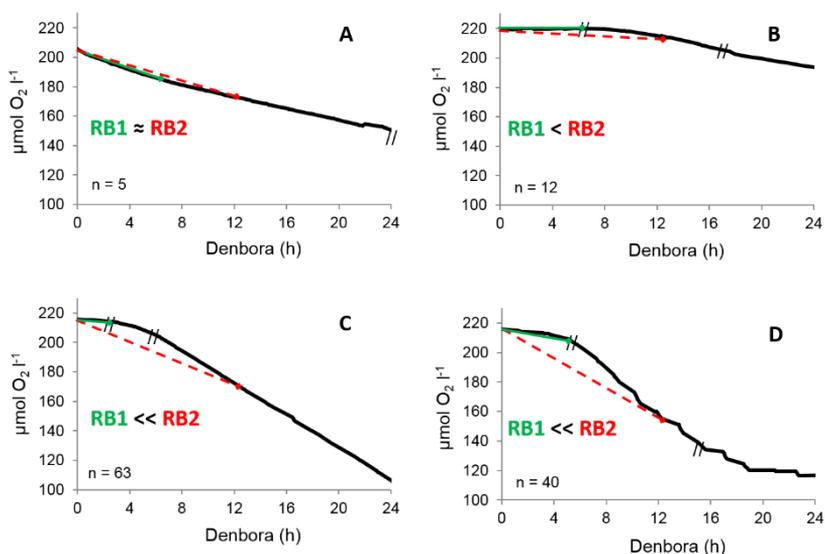
Se utilizó el test t-Student para identificar diferencias significativas entre los valores medios de dos grupos de muestras, y t-Student pareado para identificar diferencias significativas entre distintas medidas de una misma muestra. Para identificar diferencias significativas entre más de dos grupos de muestras se utilizó la prueba post hoc con contraste de Bonferroni para ANOVA de un factor. Se realizaron regresiones lineales simples para obtener la velocidad de consumo

de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo de incubación ( $p < 0,05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS (IBM).

## Resultados

### *Dinámicas del descenso de oxígeno*

En todas las muestras analizadas se observó una reducción en la concentración de oxígeno disuelto durante las 24 h de incubación, aunque las diferentes dinámicas de descenso de oxígeno permitieron definir cuatro modelos generales que se presentan en la Figura 1.2.



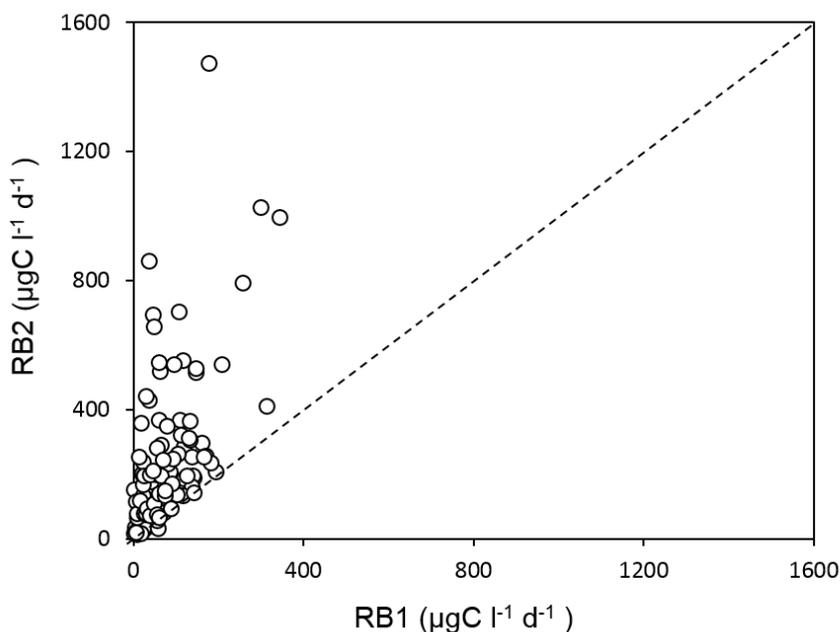
**Figura 1.2.** Modelos representativos (A, B, C, D) de las dinámicas de descenso de la concentración de oxígeno disuelto detectados con el microsensor de oxígeno a lo largo de 24 h de incubación en oscuridad. En cada uno de los gráficos están delimitadas las tres etapas que pueden diferenciarse en las dinámicas debido a cambios en las velocidades de descenso de la concentración de oxígeno disuelto. n: número de muestras; RB1: respiración bacteriana determinada en tiempos  $\leq 6$  h de incubación (línea verde); RB2: respiración bacteriana determinada en tiempos  $\geq 12$  h de incubación (línea discontinua roja).

En 5 de las 120 muestras analizadas se observó una tendencia lineal a lo largo de las 24 h de incubación (Modelo A), mientras que en el resto el descenso no fue lineal. En 12 muestras se observó un descenso lineal de la concentración de oxígeno disuelto durante las primeras 6 - 15 h, seguido de un ligero cambio en la velocidad de consumo del oxígeno disuelto (Modelo B). En las restantes 103 muestras fue posible diferenciar tres etapas: 1) una primera etapa (desde 0 h

hasta 3 - 6 h) caracterizada por un descenso constante y moderado de la concentración de oxígeno disuelto; 2) una segunda etapa (entre 3 y 10 h de duración) en la que se detectó un cambio ligero (Modelo C, 63 muestras) o brusco (Modelo D, 40 muestras) en la velocidad del consumo de oxígeno disuelto; 3) y finalmente, una tercera etapa ligada a un nuevo aumento (Modelo C) o disminución (Modelo D) en la velocidad del consumo de oxígeno disuelto. En definitiva, la linealidad del descenso del oxígeno disuelto con respecto al comienzo de la incubación sólo se mantuvo para las 120 muestras durante las primeras 3 - 6 h de incubación.

### *Medidas de respiración bacteriana*

Se obtuvieron medidas de respiración en 120 muestras de agua de mar que representaron un rango de temperatura de entre 11°C y 21,5°C, y una densidad bacteriana de entre  $4,4 \times 10^4$  cél ml<sup>-1</sup> y  $4,0 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>. Para cada muestra, se obtuvieron dos estimaciones de velocidad de respiración bacteriana a partir de la pendiente de la regresión entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo de incubación: RB1 cuando el valor de respiración se obtuvo con una incubación inferior o igual a 6 h, y RB2 cuando el valor de respiración se obtuvo con una incubación igual o superior a 12 h. En el 98,3% de las muestras analizadas, englobadas en los modelos B, C y D, los valores de respiración estimados cuando se utilizaron cortos periodos de incubación (RB1) fueron más bajos (t-Student,  $p < 0,05$ ) que cuando se utilizaron periodos largos (RB2) (Figuras 1.3 y 1.4; Tabla TS.1). Los valores medios de RB1 fueron 3 veces inferiores a los de RB2 ( $74,6 \pm 5,8$  µg C l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y  $230,7 \pm 21,2$  µg C l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) (t-Student pareado,  $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de RB1 y RB2 obtenidos en las 5 muestras que presentaron un descenso lineal en la concentración de oxígeno disuelto (Modelo A).



**Figura 1.3.** Relación entre las medidas de respiración determinadas en incubaciones  $\leq 6$  h (RB1) y en incubaciones  $\geq 12$  h (RB2). La línea recta indica la relación 1:1 entre las dos estimaciones.

Con el objetivo de comparar las medidas de respiración obtenidas en este estudio mediante micro-respirometría con respecto a las medidas de respiración obtenidas en otros sistemas acuáticos con diversas técnicas, se revisaron un total de 60 trabajos científicos en los que se determinaba la respiración bacteriana en muestras superficiales de océano abierto, aguas costeras y plataforma continental, estuarios, ríos y/o lagos (Tabla 1.1). Las estimaciones medias de respiración bacteriana recogidas en estos trabajos fueron significativamente distintas dependiendo del sistema acuático de procedencia de las muestras (pruebas post hoc Bonferroni para ANOVA de un factor,  $p < 0,01$  en todos los casos). En océano abierto la respiración bacteriana media fue de  $36,6 \pm 5,5 \mu\text{gC l}^{-1} \text{d}^{-1}$ , en aguas costeras y plataforma continental de  $141,5 \pm 12,0 \mu\text{gC l}^{-1} \text{d}^{-1}$ , y en estuarios, ríos y lagos de  $176,8 \pm 13,2 \mu\text{gC l}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Figura 1.4). Los valores medios recogidos en estos trabajos para aguas costeras, resultaron ser significativamente diferentes (t-Student,  $p < 0,05$  en ambos casos) e intermedios con respecto a los valores de RB1 ( $74,6 \pm 5,8 \mu\text{gC l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y RB2 ( $230,7 \pm 21,2 \mu\text{gC l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) obtenidos en

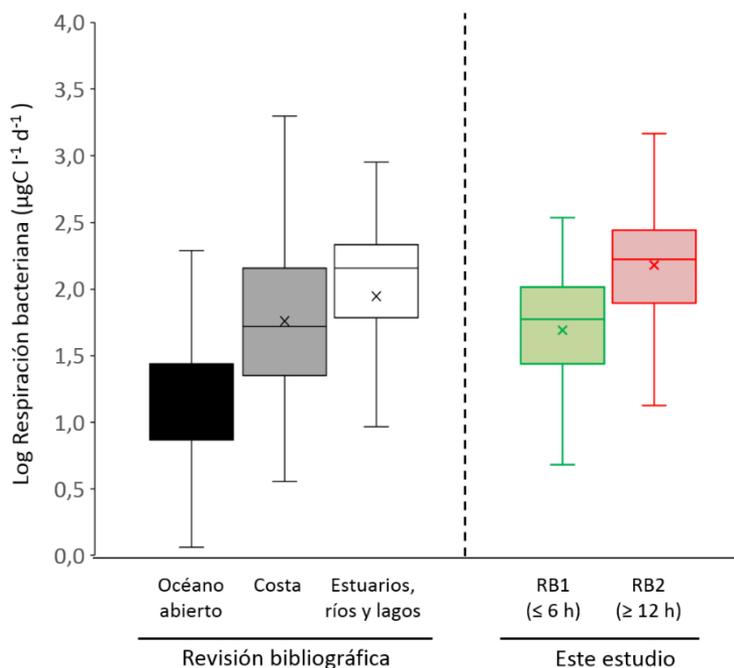
**Tabla 1.1.** Recopilación de las estimaciones de respiración bacteriana obtenidos mediante diferentes métodos en estudios llevados a cabo en océano abierto, aguas costeras y plataforma continentales, y en estuarios, rías, ríos y lagos. ECB: eficiencia bacteriana de crecimiento; RC: respiración de la comunidad; N: Norte; S: Sur; E: Este; O: Oeste. Listado de métodos: 1. Winkler, 2. Microwinkler, 3. Oxidación catalítica, 4. Carbono inorgánico disuelto mediante colorimetría, 5. Consumo del carbono orgánico disuelto mediante cromatografía HTC, 6. Cadena de transporte de electrones *in vitro*, 7. Cadena de transporte de electrones *in vivo*, 8. Electrodo de oxígeno polarigráfico, 9. Espectrometría de masas, 10. Optodos, 11. Microsensores de oxígeno, 12 Macrosondas de oxígeno. n.d.: no hay dato.

Localización	Fracción µm	Método	Tiempo de incubación	Respiración bacteriana		ECB %	Temperatura °C	Referencia
				$\bar{X} \pm ES$	Rango µgC l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>			
<b>Aguas costeras y plataforma continental</b>								
Islas Canarias	< 2	6	20 min	23,6 ± 2,8	[18-27]	n.d.	18	Aristegui & Montero (2005)
Plataforma continental Georgia	< 1	12	< 2 h	803,9 ± 116,2	[144,0-1987,2]	2-11	n.d.	Griffith <i>et al.</i> (1990)
Mar del Norte y Canal de la Mancha	< 3	1	4-18 h	65,5 ± 7,4	[8,6-227,5]	n.d.	12,5	Iriarte <i>et al.</i> (2001)
Bahía de Chesapeake	< 3	1	6-12 h	124,6 ± 16,7	[22,5-360,0]	n.d.	17,4	Smith (1998)
Canal de Santa Rosa	< 1	1	6-24 h	469,8 ± 159,8	[54-1752,3]	15 ± 11	22,4	Coffin <i>et al.</i> (1993)
Golfo de Méjico	RC	1	12 h	57,0 ± 14	[8,6-406,1]	1-28	25,5	Pomeroy <i>et al.</i> (1995)
Costa E y W de Malasia	< 0,7	1	12 h	524,0 ± 46,3	[230,4-950,4]	6-9	29,6	Lee <i>et al.</i> (2009)
Mar Báltico y Mar del Norte	RC	10	8-25 h	95,4 ± 20,1	[4,8-145,2]	n.d.	1,7 - 17,7	Wikner <i>et al.</i> (2013)
Golfo de Maine	RC	1	11-24 h	134,3 ± 22,5	[91,9-194,3]	n.d.	18,8	Packard & Williams (1981)
Golfo de Maine	< 0,7	6	11-24 h	38,9 ± 11,7	[18-71,3]	n.d.	18,8	Packard & Williams (1981)
Ártico	< 1	1	12-24 h	33,6 ± 16,6	[9,5-65,3]	n.d.	n.d.	Harrison (1986)
Mar del Norte S	< 0,8	1	12-24 h	18 ± 19,2		20 ± 10	n.d.	Reinthalder & Herndl (2005)
Plataforma de Luisiana	< 1	1	20-22 h	77,8 ± 5,3	[63,3-92,2]	38 ± 13	24,3	Biddanda <i>et al.</i> (1994)
Blanes (NW Mediterráneo)	< 200	1	20-24 h	61,6 ± 10,9	[6,6-253,8]	n.d.	17,4	Satta <i>et al.</i> (1996)
Fiordos Daneses	< 1	2	24 h	127,2 ± 12,3	[54-207]	46 ± 6	n.d.	Sand-Jensen <i>et al.</i> (1990)
Antártida	< 0,8	1	24 h	66,1 ± 12,1	[27,6-100,8]	n.d.	0	Robinson <i>et al.</i> (1999)
Antártida	< 0,8	4	24 h	60,2 ± 12	[12-152,4]	n.d.	0	Robinson <i>et al.</i> (1999)
Canal de la Ría de Vigo	RC	1	24 h	179,2 ± 23,6	[36-564]	n.d.	12 - 21	Moncoiffé <i>et al.</i> (2000)
Bahía de Blanes (NW Mediterráneo)	RC	1	24 h	47,0 ± 6,2	[13,2-78]	n.d.	12 - 24	Duarte <i>et al.</i> (2004)
NW Mediterráneo	% de activas	1	24 h	18,3 ± 4,9	[3,6-44,4]	n.d.	13,9 - 27,2	Navarro <i>et al.</i> (2004)
Blanes (NW Mediterráneo)	< 0,8	1	24 h	26,4 ± 5,9	[4-69]	2-42	17	Alonso-Sáez <i>et al.</i> (2008)
Mallorca (Mediterráneo)	< 0,8	1	24 h	18,1 ± 4,4	[0,04-3]	12-51	14,4 - 28,2	Kritzberg <i>et al.</i> (2010)
NW Mediterráneo (Bahía de Marsella)	RC	1	24 h	14,2 ± 3,1	[2,6-55,7]	17 ± 2	12,8 - 25,8	Céa <i>et al.</i> (2015)
Mediterráneo	< 0,8	1	3 días	30,5 ± 4,7	[20,7-41,8]	23,8 ± 2,7	15	Bonilla-Findji <i>et al.</i> (2008)
Golfo de Méjico N	< 1	1	2-5 días	55,3 ± 11,3	[8,9-117,6]	19-29	14,0	Chin-Leo & Benner (1992)
Costa Georgia (estuario y aguas oceánicas)	< 1	8	n.d.	367,7 ± 109,5	[162-990]	n.d.	n.d.	Hopkinson <i>et al.</i> (1989)
Costa de Chile - Océano Pacífico	RC	1	n.d.	87,0 ± 29,6	[0-400,8]	13-23,5	n.d.	Daneri <i>et al.</i> (2000)
Mar Arábigo	< 0,7	1	n.d.	385,9 ± 158,4	[129,6-610,6]	11,1 ± 4,2	29,4	Ram & Chandramohan (2003)
Mar Adriático	< 0,7	6	n.d.	18,9 ± 6,2	[0,2-417,6]	n.d.	18	La Ferla <i>et al.</i> (2006)
Pacífico - Costa de Oregón	< 1,2	9	n.d.	25,5 ± 3,33	[14,4-36]	12 ± 2	9,2	del Giorgio <i>et al.</i> (2011)

Capítulo 1

Localización	Fracción μm	Método	Tiempo de incubación	Respiración bacteriana		ECB %	Temperatura °C	Referencia
				$\bar{X} \pm ES$	Rango			
Océano abierto								
Atlántico N y S	RC, > 0,8 y < 0,8	7	1-4 h	9,8 ± 1,4		n.d.	15 - 30	García-Martín <i>et al.</i> (2017)
Atlántico y Pacífico	RC	7	n.d.	4,3 ± 0,7	[0,7-10,37]	21 ± 4	20,8	Martínez-García <i>et al.</i> (2013)
Antártida	RC	1	24 h	22,3 ± 2,1	[4,0-44,3]	n.d.	0,2-6	Robinson & Williams (1993)
Atlántico S	< 0,8	1	24 h	12,8 ± 5,9	[1,2-20,4]	n.d.	< 0	Boyd <i>et al.</i> (1995)
Atlántico S	< 0,8	1	24 h	36,4 ± 13,9	[1,2-134,0]	n.d.	2	Blight (1996)
Atlántico E	RC	1	24 h	29,2 ± 8,7	[12,0-57,6]	n.d.	13,2 - 28,9	Robinson <i>et al.</i> (2002)
Bahía de Bizkaia	< 0,8	1	24 h	20,9 ± 6,1	[1,2-60]	1 ± 8	12,5	González <i>et al.</i> (2003)
Pacífico N	RC	1	24 h	9,5 ± 0,8	[7,6-13,8]	n.d.	n.d.	Williams <i>et al.</i> (2004)
Atlántico (Azores-Portugal)	RC	1	24 h	11,2 ± 2,4	[4,8-20,4]	n.d.	16,6	Maixandeu <i>et al.</i> (2005)
Mar del Norte	< 0,8	1	24 h	17,5 ± 2,6	[8,4-28,8]	5-42	13,0	Reinthalter <i>et al.</i> , (2005)
NW África y Giro Subtropical del Atlántico N	< 0,6-0,8	1	24 h	23,7 ± 4,6	[2,2-63,9]	1-56	13 - 25	Alonso-Sáez <i>et al.</i> (2007)b
Giro Subtropical del Atlántico N y E	RC	1	24 h	14,7 ± 1,5	[3,5-28,5]	5,8		Morán <i>et al.</i> (2007)
Atlántico E y Mediterráneo O	< 0,8	1	24 h	183,1 ± 64,1	[3,6-801,6]	3 ± 1,8	26,0	Reinthalter <i>et al.</i> (2008)
Atlántico N y S	RC, > 0,8 y < 0,8	1	24 h	11,3 ± 0,9	[4,8-27,6]	n.d.	15 - 30	García-Martín <i>et al.</i> (2017)
NE Pacífico Subártico	< 1	2	1-2 días	14,0 ± 7,9	[1-100]	5-65	12	Sherry <i>et al.</i> (1999)
NW Mediterráneo	< 0,8	1	1-2 días	17,1 ± 3,3	[0,12-30]	0,1-43	1,5	Lemée <i>et al.</i> (2002)
Pacífico N	< 0,7	3	3 días	79,9 ± 22,4	[20,9-148,8]	3,2 ± 0,6	11 - 13	Cherrier <i>et al.</i> (1996)
Atlántico N	< 0,8	3	3-4 días	153,7 ± 15,7	[124,0-177,1]	5 ± 1	14	Kirchman <i>et al.</i> (1991)
Mar Sargasso	< 0,8	5	4-8 días	15,0 ± 13,8	[1,2-28,8]	7-19	24	Carlson & Ducklow (1996)
Mar Ross	< 0,8	4	11 días	6,0 ± 0,2	[6,2-5,8]	11	1	Carlson <i>et al.</i> (1999)
Mar Sargasso	< 0,8	4	101 días	5,4 ± 0,0	[5,3-5,4]	7 ± 3	20	Hansell <i>et al.</i> (1995)
Estuarios, Rías, Ríos y Lagos								
Lago Nueva Caledonia	< 0,6	11	5 h	183,0 ± 17,7	[6-345,6]	6 ± 6	26,8	Briand <i>et al.</i> (2004)
Ría de Vigo	RC	11	3-6 h	10,3 ± 1,6	[7,3-12,6]	n.d.	18	García-Martín <i>et al.</i> (2011)
Estuario de la bahía de Chesapeake	< 1	9	6-8 h	65,0 ± 4,3	[2,4-324]	6-68	n.d.	Apple & del Giorgio (2007)
Estuario de la Bahía de Delaware	< 0,9	9	< 8 h	148 ± 12	[60,7-267,8]	9-41	16 - 26	del Giorgio & Newell (2012)
Lago Nueva Caledonia	RC	11	8-10 h	204,5 ± 16,4	[138,2-265]	2-45	n.d.	Pringault <i>et al.</i> (2009)
Estuario E y W de Malasia	< 0,7	1	12 h	366,9 ± 38,8	[129,6-892,8]	11-18	29,6	Lee <i>et al.</i> (2009)
Estuario del Mar Báltico	< 1,2	10	12-24 h	32,3 ± 16,5	[5,5-77,2]	6 ± 5	3-14	Vikström & Wikner (2019)
Lago Cadagno,- Suiza	< 1,2	1	12-55 h	10,6 ± 9,2	[0-28,8]	n.d.	14,7	Gatusso <i>et al.</i> (2002)
Estuario del Río Hudson	< 2,7	1	24 h	152,0 ± 13,2	[36-216]	4-66	n.d.	Roland & Cole (1999)
Estuario del Río Hudson	< 2,7	1	> 24 h	118,0 ± 8,5	[48-196,8]	15-40	14 - 24	Maranger <i>et al.</i> (2005)
Ría de Vigo	RC	1	24 h	67,2 ± 5,9	[39,8-111,2]	n.d.	18	García-Martín <i>et al.</i> (2011)
Estuario del Río Pearl	< 1	1	24 h	52,5 ± 13,5	[19-149]	20,9 ± 5,4	26 - 31	Xu <i>et al.</i> (2019)
Estuario de Zuari (India)	< 0,7	1	n.d.	273,6 ± 51,84	[193,0-385,9]	18,0 ± 7,8	28,3	Ram & Chandramohan (2003)

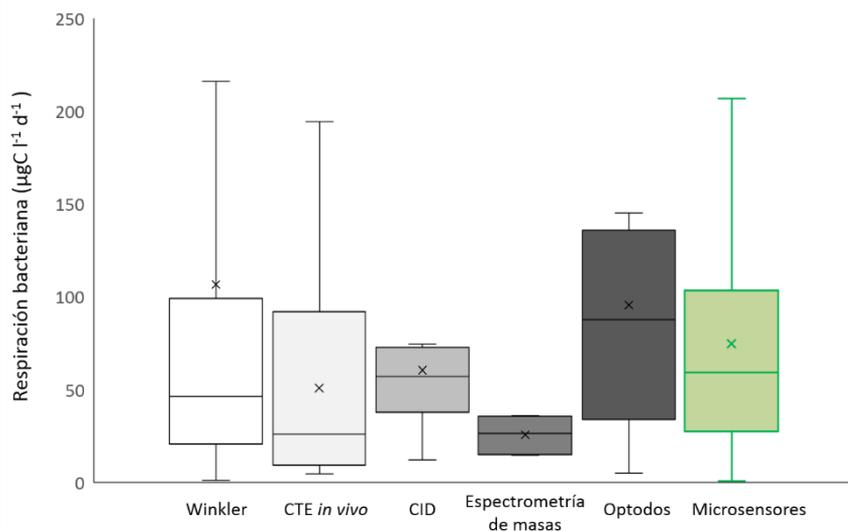
aguas costeras del Cantábrico oriental en este estudio (Figura 1.4). De las estimaciones de respiración analizadas que se han obtenido en aguas costeras, sólo el 5,8% fueron realizadas utilizando periodos de incubación inferiores a 6 horas. Este porcentaje aumenta al 7,4% si se considera el total de las estimaciones analizadas para los tres sistemas acuáticos.



**Figura 1.4.** Comparativa entre las medidas de respiración bacteriana en diferentes sistemas acuáticos (océano abierto, aguas costeras, estuarios y ríos) y las medidas obtenidas en tiempos de incubación  $\leq 6$  h (RB1) y  $\geq 12$  h (RB2) en este estudio. Las x indican los valores medios de cada grupo de datos.

El método más ampliamente utilizado por la comunidad científica fue el método Winkler (68% del total de trabajos analizados; 75% en el caso de aquellos trabajos realizados en sistemas costeros), mientras que la utilización de los microsensors de oxígeno como método de rutina para medir respiración bacteriana no está aún muy extendido y está limitado a sistemas de agua dulce (5% de los trabajos analizados). A pesar de la variedad de técnicas utilizadas en el campo de la ecología microbiana para medir respiración, y al contrario de lo esperado, no se observaron diferencias significativas de las medidas de respiración bacteriana en función del método utilizado (pruebas post hoc Bonferroni para ANOVA de un

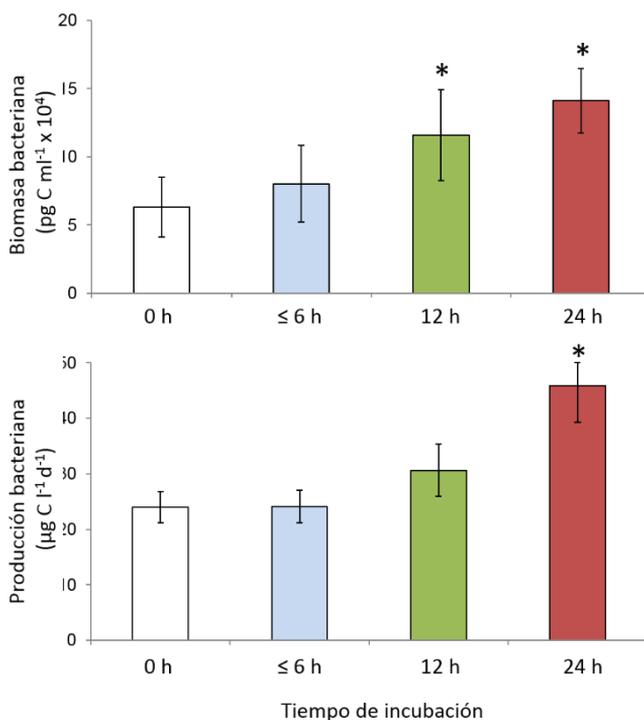
factor,  $p > 0,01$ ) (Figura 1.5). La comparativa fue realizada con medidas obtenidas en diferentes sistemas costeros con diferentes comunidades y en distintas épocas del año, lo cual pudo resultar en desviaciones muy altas y en una amortiguación de las posibles diferencias entre técnicas. Sin embargo, en una comparativa realizada en nuestro laboratorio con una misma muestra, en la que se monitorizó la evolución del oxígeno disuelto a lo largo de 48 h de incubación mediante el método Winkler (medida cada 8 horas, viales de 130 ml) y mediante los microsensores de oxígeno (medida continua, cámaras de 4 ml), sí se observaron diferencias significativas entre las medidas de respiración, obtenidas utilizando 48 h y  $\leq 6$  h de incubación, respectivamente. Además, confirmamos que la dinámica de descenso de la concentración de oxígeno disuelto en ambas botellas siguió el mismo patrón no lineal de 3 etapas, a pesar de la diferencia de volumen entre ambos recipientes (datos no mostrados).



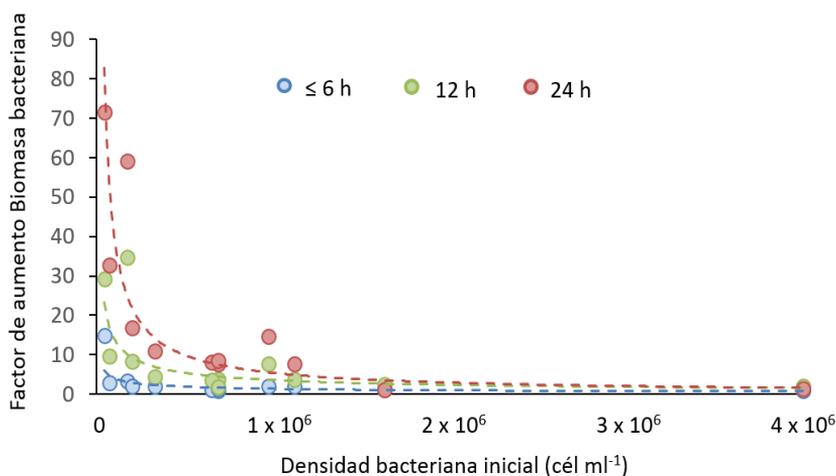
**Figura 1.5.** Comparativa entre las medidas de respiración bacteriana recogidas en la literatura determinadas mediante diferentes técnicas en sistemas costeros y las medidas de respiración bacteriana obtenidas mediante microsensores de oxígeno en tiempos de incubación inferiores a 6 h (RB1) en este estudio (verde). CTE: cadena de transporte de electrones; CID: carbono inorgánico disuelto. Las x indican los valores medios de cada grupo de datos

*Cambios en la comunidad bacteriana a lo largo de la incubación*

Si bien las evoluciones de la biomasa bacteriana y de la producción bacteriana no fueron significativamente distintas entre la muestra inicial y la muestra con  $\leq 6$  h de incubación, (t-Student pareado,  $p > 0,05$ ), los valores tanto de la biomasa como de la producción de la comunidad bacteriana aumentaron exponencialmente a partir de ese momento (Figura 1.6). De esta forma, se detectaron diferencias significativas entre la biomasa inicial (0 h) y la biomasa a 12 h y a 24 h, y entre la producción inicial y la producción a 24 h de incubación (t-Student pareado,  $p < 0,01$ ). En el caso de la biomasa bacteriana, los cambios detectados fueron más bruscos cuanto menor fue la densidad bacteriana inicial, sobre todo a partir de las 6 horas de incubación (Figura 1.7). En muestras con densidades menores a  $2 \times 10^5$  cél ml<sup>-1</sup> se llegaron a observar aumentos en la biomasa de la comunidad de hasta el 34,6 y el 71,5 veces con respecto a la biomasa inicial tras 12 h y 24 h de incubación, respectivamente.

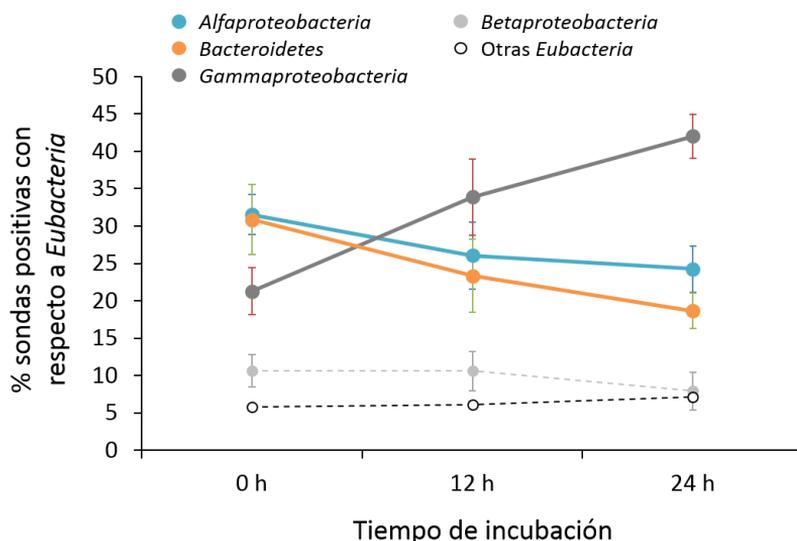


**Figura 1.6.** Valor medio  $\pm$  desviación estándar de la producción y la biomasa de la comunidad bacteriana en diferentes momentos de la incubación en cámaras selladas de 4 ml (0 h, 3-6 h, 12 h y 24 h). El asterisco indica valores medios significativamente diferentes con respecto a los valores iniciales (0 h) (t-Student,  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.7.** Factor de aumento de la biomasa bacteriana a las 3 o 6 h, 12 h y 24 h de incubación con respecto a la densidad bacteriana inicial de la muestra. n = 12.

Tampoco la composición de la comunidad bacteriana se mantuvo constante a lo largo de las 24 h de incubación (Figura 1.8). Si bien no se observaron cambios significativos en el porcentaje de las *Betaproteobacteria* y otras *Eubacteria* a lo largo de la incubación, las *Alfaproteobacteria* y los *Bacteroidetes* presentaron evoluciones diferenciadas. Las *Alfaproteobacteria* y los *Bacteroidetes* fueron los grupos predominantes ( $31,5 \pm 2,7\%$  y  $30,8 \pm 4,7\%$ , respectivamente) en las comunidades iniciales, pero disminuyeron su peso específico al  $26,0 \pm 4,5\%$  y  $23,3 \pm 4,9\%$  tras 12 h, y hasta  $24,2 \pm 3,1\%$  y  $18,7 \pm 2,3\%$  tras 24 h de incubación. De modo inverso, las *Gammaproteobacteria* aumentaron significativamente su contribución a la comunidad pasando de un  $21,3 \pm 3,1\%$  a un  $33,9 \pm 5,1\%$  tras 12 h de incubación, y hasta  $42,0 \pm 2,9\%$  al cabo de 24 h. Por lo tanto, se dio un cambio significativo en la composición de la comunidad bacteriana antes de las 12 h de incubación.



**Figura 1.8.** Evolución de la composición de la comunidad bacteriana analizada mediante CARD-FISH y calculada como el porcentaje de sondas positivas con respecto al total de *Eubacteria* detectadas en diferentes momentos de la incubación en cámaras de 4 ml (0 h, 12 h, 24 h). n = 10.

## Discusión

Los métodos tradicionalmente utilizados para medir respiración en los sistemas acuáticos, como por ejemplo el método Winkler, requieren medidas discontinuas de la concentración de oxígeno disuelto de la muestra, varias réplicas y periodos de incubación en muchos casos superiores a 24 h para poder detectar descensos significativos en la concentración de oxígeno (Bryan *et al.*, 1976; Hartwig & Michael, 1978; Williams & Jenkinson, 1982). Así, la respiración ha sido muchas veces estimada mediante la diferencia entre la concentración de oxígeno disuelto a tiempo inicial y final, asumiendo un descenso lineal del mismo a lo largo de la incubación y, por tanto, asumiendo que la comunidad microbiana se mantiene estable, tanto en número como en actividad y composición. De hecho, aproximadamente el 70% de los estudios llevados a cabo en este campo asumieron que el consumo de oxígeno durante la incubación fue lineal (ver revisión en Robinson, 2008), aunque hay pruebas suficientes para dudar de la veracidad de esta asunción. Por ejemplo, Pomeroy y colaboradores (1994)

midieron la concentración de oxígeno de forma discontinua en puntos intermedios entre el inicio y el final de la incubación en muestras de aguas subtropicales y tropicales del Atlántico, y detectaron que en la mayoría de las muestras analizadas el descenso de oxígeno no era lineal a partir de las 12 h de incubación. También Briand y colaboradores (2004), en un estudio realizado con muestras del suroeste de la laguna de Nueva Caledonia, diferenciaron tres tendencias no lineales y dependientes del estado trófico de la muestra monitorizando el descenso de la concentración de oxígeno de forma continua.

En este trabajo observamos un descenso lineal a lo largo de 24 h de incubación sólo en 5 de las 120 muestras analizadas. En las 115 muestras restantes el descenso de oxígeno se mantuvo a una velocidad constante y similar a la inicial durante las primeras 3 o 6 h de incubación, y posteriormente se perdió la linealidad, antes en aquellas muestras con baja densidad bacteriana inicial. Estos tiempos de incubación son muy inferiores a los utilizados hasta ahora para medir la respiración, posiblemente porque los períodos de incubación inferiores a 6 horas no permiten obtener diferencias significativas entre las determinaciones de concentración de oxígeno inicial y final en la mayoría de las muestras procedentes de sistemas acuáticos (Pomeroy *et al.*, 1994). En aguas costeras del Cantábrico oriental, la utilización de periodos largos de incubación, iguales o superiores a 12 h, supuso en casi la totalidad de las muestras analizadas un incremento de la respiración bacteriana con respecto a los valores obtenidos con periodos cortos de incubación ( $\leq 6$  h). Teniendo en cuenta que el 92,6% de las estimaciones de respiración bacteriana realizadas en distintos sistemas acuáticos fueron obtenidas tras tiempos de incubación superiores a 12 h, estos resultados podrían indicar que una gran parte de las medidas de respiración bacteriana han podido ser sobrestimadas.

Se ha demostrado que el tiempo de incubación influye en la densidad, en la biomasa, en la actividad o incluso en la composición de la comunidad bacteriana, un efecto que también han observado muchos otros autores (Biddanda *et al.*, 1994; Gasol & Morán, 1999; Massana *et al.*, 2001; Gattuso *et al.*, 2002; Briand *et*

*al.*, 2004; Calvo-Díaz *et al.*, 2011). La necesidad de separar las bacterias de los otros componentes de la comunidad planctónica para medir respiración bacteriana cuando se utilizan medidas directas del consumo de oxígeno, conlleva la inclusión de artefactos potenciales: eliminación de los suministros de materia orgánica por separación de las comunidades autótrofas, eliminación de los competidores y depredadores (Fuhrman & Bell, 1985; Hopkinson *et al.*, 1989; Gasol & Morán, 1999; Robinson, 2008), el efecto botella debido a la adsorción y concentración de materia orgánica en la pared de la cámara, el enriquecimiento del medio debido a la ruptura de células a través de la filtración o el aumento de la cantidad y cambio en la calidad de los nutrientes y el carbono orgánico (Fuhrman & Bell, 1985; Gasol & Morán, 1999; Kiene & Linn, 1999; Sherr *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 2000; Massana *et al.*, 2001). En aquellas comunidades bacterianas que estén fuertemente influenciadas por los bacterívoros y por la competitividad nutricional que ejerce el fitoplancton, la separación física de las bacterias puede favorecer su crecimiento, aumentando así la cantidad de oxígeno consumido, activando la respiración de la comunidad artificialmente y, como consecuencia, provocando la sobrestimación de la respiración bacteriana.

Además, los cambios en la cantidad y calidad de la materia orgánica implicarían a su vez cambios en las respuestas metabólicas de la comunidad bacteriana, aumentando y/o disminuyendo la actividad de determinados grupos de bacterias en función de las nuevas condiciones, y podría favorecer cambios en la composición de la comunidad bacteriana. Algunos estudios han demostrado que una larga incubación posterior al fraccionamiento de la comunidad planctónica favorece el crecimiento de bacterias con alto contenido en ADN (Gasol & Morán, 1999; Massana *et al.*, 2001) y la aparición de genotipos de bacterias con un alto potencial de crecimiento (Sherr *et al.*, 1999). Así, la composición inicial de grupos dominantes podría ser sustituida a lo largo de la incubación, viéndose favorecido el crecimiento de bacterias oportunistas como las *Gammaproteobacteria*. En consecuencia, durante incubaciones superiores a 12 h después del fraccionamiento de la muestra, la comunidad bacteriana evoluciona de forma

diferente a como lo haría en el medio natural, y las mediciones de su actividad dejan de ser representativas de las condiciones iniciales. Es por ello que la utilización de tiempos de incubación lo más cercanos posibles al tiempo inicial puede ser crucial para reducir al mínimo el posible la diferencia entre la tasa de respiración observada después del fraccionamiento de la muestra y la tasa de respiración real de la comunidad bacterioplanctónica en los sistemas acuáticos naturales.

Dada la relación superficie volumen que supone utilizar cámaras de 4 ml, en lugar de viales de mayor volumen como los utilizados para otras técnicas, la adsorción de la materia orgánica a las paredes de las cámaras podría ser mayor y, consecuentemente, provocar una mayor activación de la comunidad y una mayor sobrestimación de la respiración bacteriana. Sin embargo, Hammes *et al.* (2010) no encontraron evidencias de la existencia de dicho efecto volumétrico. Además, el control de los cambios en la dinámica del descenso de oxígeno disuelto al ser monitorizado de forma continua y la reducción de los tiempos de incubación permite la obtención de la medida de respiración antes de que sucedan los cambios en la comunidad bacteriana, sea cual sea el volumen del recipiente utilizado para la medida.

La respiración bacteriana es, en sí misma, un parámetro que nos informa sobre la actividad de las comunidades bacterianas. Pero además es necesaria para determinar la eficiencia de crecimiento bacteriana, la cual requiere además de la estimación de la producción bacteriana. La producción bacteriana se obtiene habitualmente mediante la incorporación de compuestos radioactivos, y con el fin de obtener un valor próximo a las condiciones *in situ*, se realiza en cortos tiempo de incubación (habitualmente 1 - 2 h). Tradicionalmente, por tanto, las medidas de producción bacteriana y respiración bacteriana se han realizado en diferentes escalas de tiempo, y dado los cambios observados a lo largo del tiempo de incubación, probablemente con comunidades diferentes a nivel tanto de actividad como de composición. Es decir, la discrepancia temporal en los periodos de incubación mínimos necesarios para determinar la respiración y la producción

bacterianas puede derivar en estimaciones de eficiencias de crecimiento que no representen la realidad del ecosistema. Una alternativa para medir ambos parámetros en la misma escala de tiempo consiste en estimar la producción neta de la comunidad a partir de los cambios en la densidad o biomasa bacterianas durante la incubación (24 h) (Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). Sin embargo, en este estudio hemos observado que mientras que el aumento de la densidad bacteriana a lo largo de 24 h se da de forma exponencial, los cambios en las dinámicas de respiración bacteriana son variables. Por tanto, la utilización de esta metodología no haría más que añadir incertidumbre a las medidas de eficiencia de crecimiento. Como alternativa proponemos la reducción del tiempo de incubación a un tiempo inferior a 6 horas, lo que permite estimar la producción y la respiración bacterianas en el mismo intervalo de tiempo y obtener medidas de eficiencia de crecimiento bacteriana más precisas y cercanas a las condiciones iniciales.

En definitiva, la utilización de periodos de incubación superiores a 12 h contribuye a la sobrestimación de la respiración bacteriana y a la obtención de estimaciones de eficiencias de crecimiento alteradas, debido a que se producen cambios significativos en la densidad, en el tamaño, en la actividad y/o en la composición de la comunidad bacteriana. Los microsensores de oxígeno permiten monitorizar de modo preciso la evolución del descenso de oxígeno de manera continua, de tal forma que pueden identificarse los cambios en las dinámicas de respiración en cada muestra de forma individual, delimitar el tiempo en el que la velocidad de consumo de oxígeno disuelto es lineal y similar a la inicial, y reducir así considerablemente el tiempo de incubación a periodos inferiores a 6 h. Esta metodología genera medidas de respiración bacteriana precisas con las que calcular valores de eficiencia de crecimiento acordes a la realidad del ecosistema, y que permiten mejorar nuestro conocimiento acerca del reciclaje del carbono en los sistemas acuáticos naturales.

## CAPÍTULO 2:

La depredación por protozoos bacterívoros provoca cambios en la eficiencia de crecimiento bacteriana a través de alteraciones en la materia orgánica disuelta

Publicación:

Baña, Z., Ayo, B., Marrasé, C., Gasol, J.M. and Iriberry, J. (2014) Changes in bacterial metabolism as a response to dissolved organic matter modification during protozoan grazing in coastal Cantabrian and Mediterranean waters. *Environmental Microbiology*, **16**: 498–511.





## Resumen

En este capítulo, exploramos cómo la materia orgánica disuelta marina alterada por el crecimiento bacteriano y por la depredación de protozoos bacterívoros provoca cambios en el metabolismo de las comunidades bacterianas costeras del sudeste del Mar Cantábrico y el noroeste del Mar Mediterráneo. Las principales características metabólicas de la comunidad bacterioplanctónica se midieron en muestras que contenían la mitad del agua natural reemplazada por agua con diferente calidad de materia orgánica disuelta (“tratamientos”), caracterizada por el análisis de materia orgánica disuelta fluorescente, y recolectada en momentos clave de la curva depredador-presa. La utilización de la materia orgánica disuelta alterada por depredación provocó aumentos de más del 200% en la demanda de carbono bacteriana en los dos sistemas, y disminuciones de la eficiencia de crecimiento bacteriana, del 56% en el Mar Cantábrico y del 46% en el Mar Mediterráneo. Estas bajas eficiencias de crecimiento fueron debidas a similares producciones bacterianas pero muy superiores tasas de respiración bacteriana, que a su vez estuvieron positivamente relacionadas con la actividad enzimática extracelular aminopeptidasa. Sin embargo, en la comunidad bacteriana del Mar Cantábrico dominada por *Bacteroidetes* (41% de la comunidad), el aumento de la actividad hidrolítica se produjo con un menor coste metabólico que en el Mar Mediterráneo, dominado por SAR11 (47% de la comunidad), lo cual sugiere una mejor adaptación de *Bacteroidetes* a la materia orgánica disuelta alterada durante la depredación por protozoos bacterívoros. Estos resultados posicionan a la depredación por protozoos bacterívoros como un factor relevante que influye en la eficiencia de crecimiento bacteriana en ecosistemas costeros, y relaciona la composición de la comunidad bacteriana con los principales procesos metabólicos que resultan después de un cambio en la calidad de la materia orgánica disuelta marina.

## Introducción

La materia orgánica disuelta representa una fracción importante del total de materia orgánica en el océano (Sharp, 2002) y las bacterias heterótrofas y las arqueas sus principales consumidores planctónicos (Pomeroy, 1974). La disponibilidad de materia orgánica disuelta para las bacterias heterótrofas depende de su composición bioquímica y tamaño molecular y, por lo tanto, cualquier transformación estructural o composicional de la materia orgánica disuelta afectará a varios aspectos del metabolismo bacteriano, incluyendo el consumo de carbono, la tasa de crecimiento, la tasa de respiración, la degradación enzimática y la demanda de nutrientes inorgánicos (Findlay, 2003). Los cambios en la actividad bacteriana derivados de la variabilidad en los recursos tienen el potencial de alterar procesos del ecosistema tales como el equilibrio entre la fracción de materia orgánica que es respirada y la fracción que permanece disponible para ser transferida a niveles tróficos superiores (Smith & Kemp, 2003; Lennon & Cottingham, 2008). La eficiencia de crecimiento bacteriana es una variable que refleja este equilibrio y, por tanto, estima el destino de los suministros de carbono orgánico, determinando si las bacterias actúan como enlace (recicladores) o sumidero (mineralizadores) en los ecosistemas acuáticos (Sherr & Sherr, 1996; del Giorgio & Cole, 1998; Carlson *et al.*, 2007).

La materia orgánica disuelta marina sufre continuas transformaciones, tanto por la acción de factores abióticos como la luz ultravioleta (Moran & Zepp, 1997; Schmitt-Kolpin *et al.*, 1998), como también por los procesos biológicos llevados a cabo por las bacterias, los protozoos y los virus (Nagata, 2000; Ogawa *et al.*, 2001; Motegi *et al.*, 2009). Los cambios en las características bioquímicas y en la calidad de la materia orgánica disuelta pueden ser vinculados a sus propiedades ópticas (Stedmon *et al.*, 2003), como la fluorescencia, que proporciona información fiable sobre el estado redox, la calidad (materiales húmicos y proteicos), y la reactividad biológica y fotoquímica de la materia orgánica disuelta (Miller *et al.*, 2006; Fellman *et al.*, 2010). La materia orgánica disuelta fluorescente marina ha sido considerada un subproducto del metabolismo bacteriano principalmente (Chen &

Bada, 1992; Kramer & Herdl, 2004; Nieto Cid *et al.*, 2006; Yamashita & Tanoue, 2008), pero algunos estudios han demostrado que también puede ser producida por las células eucariotas (Steinberg *et al.*, 2004; Urban-Rich *et al.*, 2006; Ortega Retuerta *et al.*, 2009; Romera-Castillo *et al.*, 2010). Varias especies moleculares derivadas de bacterias, incluyendo porinas (Yamada & Tanoue, 2003), D-aminoácidos (McCarthy *et al.*, 1998; Kaiser & Benner, 2008), ácido murámico (Benner & Kaiser, 2003; Kaiser & Benner, 2008) y lipopolisacáridos (Wakeham *et al.*, 2003) se consideran componentes de la materia orgánica disuelta marina refractaria, de tal forma que aunque pueden excretarse directamente durante el crecimiento bacteriano (Jiao *et al.*, 2010), son moléculas que no son fácilmente utilizables por otras bacterias. La depredación por protozoos bacterívoros y la lisis celular provocada por los virus, situaciones a los cuales generalmente les siguen períodos de intenso crecimiento bacteriano, pueden tener un impacto relevante en la composición de la materia orgánica disuelta (Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; Boras *et al.*, 2010). La actividad depredadora de los protozoos bacterívoros libera componentes bacterianos sin digerir, así como compuestos orgánicos disueltos de alto y bajo peso molecular (Taylor *et al.*, 1985), que producen cambios en la composición química de la materia orgánica disuelta (Nagata & Kirchman, 1991; Strom *et al.*, 1997; Nagata, 2000; Carlson, 2002). Entre otros compuestos, los investigadores han identificado aminoácidos disueltos libres y combinados (Nagata & Kirchman, 1991), material coloidal (Koike *et al.*, 1990) y enzimas (Nagata, 2000). Además, es de esperar que la liberación de este tipo de materia orgánica disuelta, diferente con respecto a la situación inicial, aumente en microambientes donde el crecimiento del bacterioplancton es fuerte y existe una intensa presión por depredación y lisis viral (Artolozaga *et al.*, 2002). Este aumento en la materia orgánica disuelta alterada podría resultar en una microheterogeneidad en la labilidad de las fuentes de carbono y es de esperar que tenga un impacto en el metabolismo y en el comportamiento fisiológico de otras bacterias que se acercan a estos microambientes. Pero hasta lo que conocemos actualmente, la influencia de la depredación por protozoos

bacterívoros en la eficiencia de crecimiento bacteriana mediada por la alteración de la materia orgánica disuelta todavía no ha sido estudiada.

A corto plazo, cualquier alteración en la calidad o la cantidad del carbono disponible para las bacterias es probable que cause cambios fenotípicos en las bacterias a través de la regulación de la expresión genética, pero a largo plazo, la presencia de materia orgánica disuelta alterada microbiológicamente también puede causar cambios en la composición de la comunidad (Findlay *et al.*, 2003). Es bien sabido que diferentes grupos de bacterias son responsables de la mineralización de diferentes fracciones de materia orgánica disuelta (Cottrell & Kirchman, 2000; Elifantz *et al.*, 2007) y, por lo tanto, la respuesta metabólica de una determinada comunidad bacteriana ante una nueva y alterada materia orgánica disuelta dependerá de su composición filogenética. En este sentido, Comte y del Giorgio (2011) afirmaron que el factor determinante para esta respuesta fenotípica podría ser la propiedad intrínseca de las comunidades, específicamente la relacionada con el nivel de plasticidad funcional y metabólica de los filotipos dominantes.

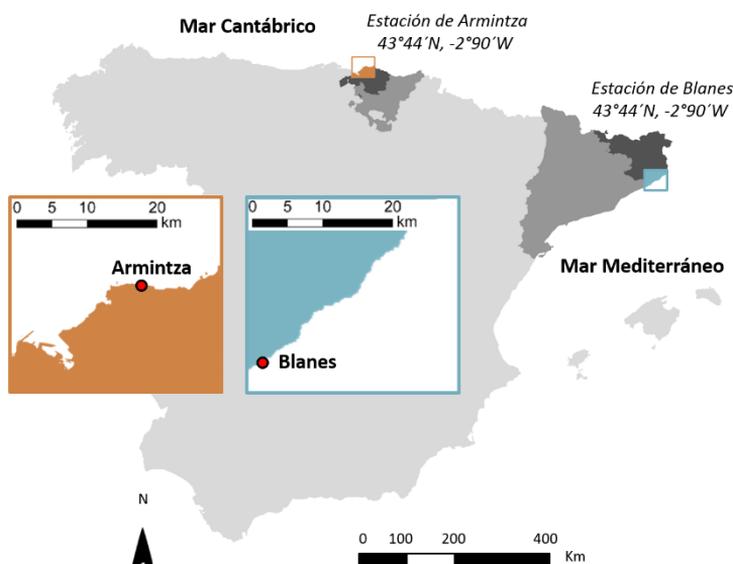
El objetivo de este trabajo fue determinar cómo la alteración de la materia orgánica disuelta causada por el crecimiento bacteriano y la depredación bacterívora de los protozoos afecta a la eficiencia de crecimiento bacteriana y, en consecuencia, a la retención neta de materia orgánica disuelta en el ecosistema. La respiración bacteriana, la producción bacteriana y la eficiencia de crecimiento bacteriana se midieron en comunidades bacterianas costeras que tenían parte de su materia orgánica disuelta sustituida por materia orgánica disuelta procedente de distintos momentos de un sistema en el que se ha forzado la convivencia depredador-presa. Consideramos que los cambios fenotípicos resultantes del uso de materia orgánica disuelta con diferentes cualidades generan un gran coste metabólico para las bacterias, que se reflejará en una disminución de las eficiencias de crecimiento bacterianas. Para determinar el papel que juega la composición de la comunidad en estas respuestas fenotípicas, se realizó este estudio en dos ecosistemas costeros muy diferentes entre sí: la estación de

muestreo situada en Armintza, en el sudeste del Mar Cantábrico, y la situada en el Observatorio microbiano de la bahía de Blanes, en el noroeste del Mar Mediterráneo.

## Material y métodos

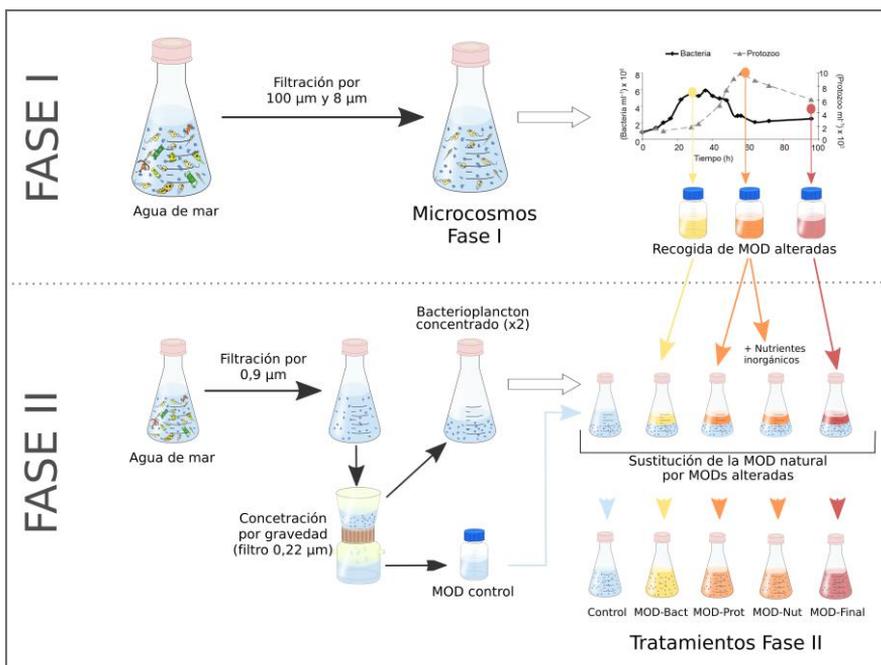
### *Muestreo y procedimiento experimental*

Se llevaron a cabo cinco experimentos con agua de mar superficial (0,5 m de profundidad) provenientes de dos ambientes marinos costeros: se realizaron tres experimentos en el Mar Cantábrico (estación de Armintza, 43°44'N, -2°90'W) durante mayo (C1) y junio (C2 y C3) del 2007, y dos experimentos en el Mar Mediterráneo (Observatorio microbiano de la bahía de Blanes, 41°40'N, 2°48'W) en julio del 2008 (M1) y julio del 2009 (M2) (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Localización de las estaciones de muestreo situadas en el Mar Cantábrico (Armintza) y en el Mar Mediterráneo (Blanes).

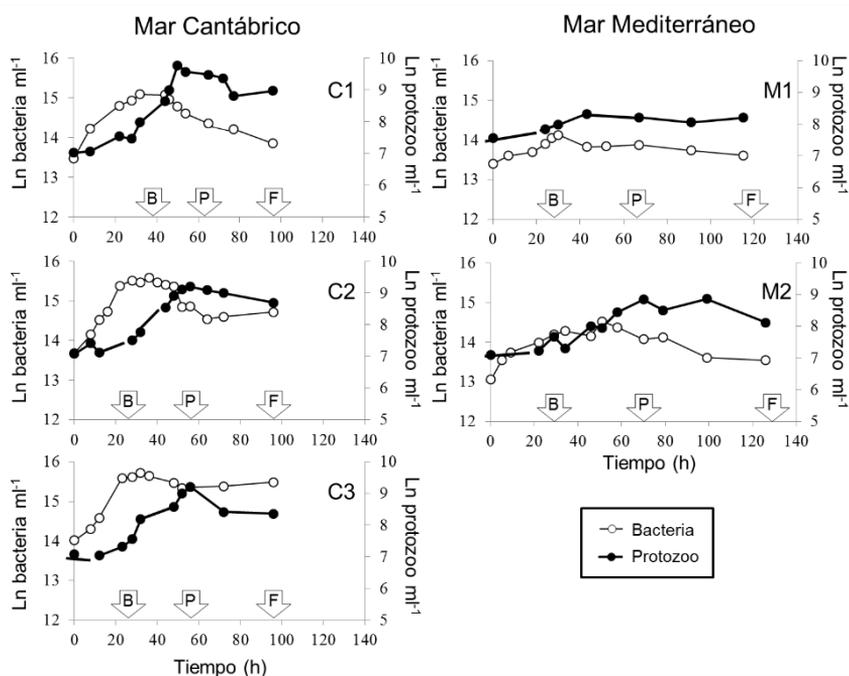
El diseño experimental (Figura 2.2) se realizó en dos fases, la primera de ellas para obtener materia orgánica disuelta alterada por las comunidades microbianas (Fase I) y la segunda para describir los efectos de esa materia orgánica disuelta alterada en el bacterioplancton marino (Fase II).



**Figura 2.2.** Esquema del diseño experimental llevado a cabo en el Mar Cantábrico y en el Mar Mediterráneo, y realizado en dos fases: Recogida de la materia orgánica disuelta (MOD) alterada por las comunidades microbianas (*Fase I*) y sustitución de la MOD natural (*Fase II*).

**Fase I.** El agua de mar se prefiltró a través de filtros de membrana de policarbonato de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para eliminar el micro- y mesozooplankton. Tras recoger una submuestra para determinar la composición de la materia orgánica disuelta inicial (MOD-inicial), para cada experimento se incubó un microcosmos de 5 litros a 20°C durante 96 - 120 h y se monitorizaron las densidades de bacterias y protozoos cada 4 horas. La evolución de estas dos comunidades en cada uno de los experimentos se presenta en la Figura 2.3. Durante la incubación, se consideraron tres tipos de materia orgánica disuelta presumiblemente alterada respecto a la materia orgánica disuelta del agua de mar original: 1) MOD-Bact, correspondiente al momento en que la densidad bacteriana fue máxima; 2) MOD-Prot, correspondiente al momento en que la densidad de protozoos fue máxima; 3) MOD-Final, correspondiente al momento final de la incubación o decadencia del sistema.

En cada uno de estos momentos, se filtró un volumen de agua del microcosmos a través de filtros de membrana de éster de celulosa quemados (Whatman) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y se preservaron 500 ml de este material a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La calidad y variabilidad de la materia orgánica original (en la muestra de agua recién cogida) y de estas tres materias orgánicas disueltas alteradas se caracterizaron mediante el análisis de materia orgánica disuelta fluorescente.



**Figura 2.3.** Evolución temporal de las comunidades de bacterias y protozoos en los microcosmos de la *Fase I* en los tres experimentos llevado a cabo en el Mar Cantábrico (C1, C2 y C3) y en los dos experimentos realizados en el Mar Mediterráneo (M1 y M2). Las flechas indican cuándo se tomaron muestras de la MOD-Bact (B), MOD-Prot (P) y MOD-Final (F).

**Fase II.** En esta fase se obtuvieron suspensiones de bacterioplancton (denominadas “tratamientos”) en las que materia orgánica disuelta original de la muestra había sido reemplazada parcialmente por materia orgánica alterada procedente de los microcosmos desarrollados en la *Fase I*. Para ello, tan pronto como fue posible (entre 2 y 4 días después de la última recogida de materia orgánica disuelta alterada de la *Fase I*), se recogió de nuevo agua de mar

superficial de la estación de muestreo. Se analizaron la densidad microbiana y la composición de la comunidad bacteriana. El agua de mar recién recogida se filtró a través de filtros de fibra de vidrio de 0,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro nominal (Millipore AP25), para separar las bacterias del resto de la comunidad planctónica, y posteriormente el bacterioplancton se concentró por gravedad mediante un filtro de membrana de éster de celulosa quemado (Whatman) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro hasta conseguir aproximadamente una densidad dos veces superior a la densidad de bacterias en la muestra de agua de mar. Para componer el tratamiento control, se filtraron 500 ml de la muestra inicial de la Fase II por filtros de membrana de éster de celulosa quemados (Whatman) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. El concentrado de bacterioplancton se utilizó, junto las muestras que contenían materia orgánica disuelta de distinta naturaleza, para establecer los 5 tratamientos que se detallan en la Tabla 2.1. La suplementación con nutrientes inorgánicos (0,5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 0,05  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^-$  y 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ ) en el tratamiento MOD-Nut que contenía concentrado bacteriano y MOD-Prot se realizó con el fin de comprobar la no limitación de nutrientes.

**Tabla 2.1.** Composición de los tratamientos utilizados para el experimental. MOD: materia orgánica disuelta.

Tratamiento	Concentrado de bacterioplancton	Volumen y tipo de MOD añadida	Procedencia MOD añadida	Suplementación con nutrientes inorgánicos
Control	500 ml	500 ml MOD inalterada	Fase II	No
MOD-Bact	500 ml	500 ml MOD-Bact	Fase I	No
MOD-Prot	500 ml	500 ml MOD-Prot	Fase I	No
MOD-Nut	500 ml	500 ml MOD-Prot	Fase I	Sí
MOD-Final	500 ml	500 ml MOD-Final	Fase I	No

Una vez constituido cada uno de los 5 tratamientos, y con el fin de detectar el consumo o producción del carbono orgánico disuelto y / o de los diferentes compuestos fluorescentes en la Fase II, se tomaron submuestras a tiempo 0 h y tras 24 h. Asimismo, las medidas de actividad microbiana como la respiración bacteriana, la producción bacteriana y las actividades enzimáticas extracelulares se determinaron inmediatamente después de constituir cada tratamiento.

#### *Densidad microbiana*

La densidad de bacterias, de protozoos y de las partículas víricas se determinaron mediante microscopía de epifluorescencia (Porter & Feig, 1980; Noble & Fuhrman, 1998). Las muestras se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico en el caso de bacterias y virus y con formalina tamponada con tetraborato sódico en el caso de los protozoos (concentración final 2% v/v en todos los casos). Las muestras se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta el análisis, que se realizó siempre en las 24 h siguientes a la fijación. Para realizar los recuentos, se tomaron submuestras de volumen conocido (1 ml para el recuento de bacterias y 4 ml para el recuento de protozoos), se tiñeron con DAPI (4'6'-diamidino-2-phenyl-indol) (concentración final 2 µg ml<sup>-1</sup>) durante 10 min y se filtraron a través de filtros negros de policarbonato de 0,22 µm y 0,8 µm de tamaño de poro (Whatman) para el recuento de bacterias y protozoos, respectivamente. Para el recuento de partículas víricas, se filtraron submuestras de 1 ml a través de filtros Acrodisc de 0,02 µm de tamaño de poro (Whatman), y se colocaron en una gota de 0,2% de SYBR Green I, se tiñeron durante 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada filtrada por 0,02 µm. Finalmente, todos los filtros se montaron en portaobjetos de vidrio, se colocaron bajo el microscopio de epifluorescencia equipado con luz UV para DAPI y con luz azul para SYBR Green (Nikon Optiphot) y se establecieron campos microscópicos seleccionados al azar por filtro para los recuentos de las tres comunidades microbianas. Se contaron un mínimo de 20 campos para estimar la densidad de bacterias y virus, y un mínimo de 100 campos para estimar la densidad de protozoos.

### *Producción bacteriana*

La producción bacteriana se estimó a partir de la velocidad de síntesis de proteínas, utilizando el método de incorporación de leucina tritiada (Kirchman *et al.*, 1985). Se adicionó el isótopo ( $[^3\text{H}]$ -Leucina) a concentración saturante (concentración final 40 nM) a tres submuestras de 5 ml, y se incubaron a temperatura *in situ* y en oscuridad durante 1 h en las muestras del Mar Cantábrico y 2 h en las del Mar Mediterráneo. Paralelamente se repitió el mismo procedimiento con 2 blancos de 5 ml, previamente fijados con ácido tricloroacético (ATC) (concentración final 50%). La incubación se detuvo mediante la adición de ATC (concentración final 5%) y la introducción de las muestras en hielo durante 5 min. A continuación, las muestras se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa (Sartorius) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se lavaron cinco veces con 5 ml de ATC al 5%. Los filtros se dejaron secar al aire, se introdujeron en viales de centelleo y se mezclaron con 500  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo durante 20 min. Finalmente, se añadieron 4 ml de cóctel de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR, utilizando estándares externos para la corrección de la extinción. La producción de biomasa bacteriana se estimó usando un factor de conversión teórico de 1,55 kg C mol leu<sup>-1</sup> que asume que no hay dilución interna del isótopo (Simon & Azam, 1989). La producción bacteriana de la comunidad total se calculó considerando la proporción de bacterias que se retuvieron en el filtro de 0,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y su biomasa. La actividad específica se calculó dividiendo el valor de la producción bacteriana por la densidad bacteriana de esa muestra.

### *Respiración bacteriana*

Para estimar la respiración bacteriana, se introdujeron dos submuestras de cada tratamiento y dos submuestras del control en cámaras de vidrio de 4 ml diseñadas para evitar el intercambio de oxígeno con el exterior. La disminución de la concentración de oxígeno dentro de las cámaras se monitorizó utilizando un sistema de micro-respiración y un microsensor de oxígeno (OX-MR) (Unisense), que permite mediciones continuas (Briand *et al.*, 2004). Las cámaras de vidrio se

introdujeron en un baño a temperatura *in situ* controlada para evitar cambios en la determinación de oxígeno debido a los cambios de temperatura. La respiración bacteriana se determinó a partir de la pendiente negativa de la regresión entre la concentración de oxígeno y el tiempo durante incubaciones inferiores a 6 h. El oxígeno respirado se transformó en velocidad de respiración de carbono utilizando un cociente respiratorio de 1 (del Giorgio *et al.*, 2006). La respiración bacteriana de la comunidad total se calculó considerando la proporción de bacterias que se retuvieron en el filtro de 0,9 µm de tamaño de poro y su biomasa. La actividad específica se calculó dividiendo el valor de la respiración bacteriana por la densidad bacteriana de esa muestra.

#### *Eficiencia de crecimiento y demanda de carbono bacteriana*

La demanda de carbono bacteriana (DCB) y la eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$DCB = RB + PB$$

$$ECB = \frac{PB}{PB + RB} * 100$$

donde RB corresponde a la respiración bacteriana y PB a la producción bacteriana.

La actividad específica de la demanda de carbono bacteriana se calculó dividiendo el valor de esa variable por la densidad bacteriana de esa muestra.

#### *Actividades enzimáticas extracelulares*

Las actividades enzimáticas extracelulares α-glucosidasa (α-Glu), β-glucosidasa (β-Glu) y leucina-aminopeptidasa (LAP) fueron estimadas mediante fluorimetría de acuerdo con el método de Hoppe (1983). Se disolvieron en metilcelosolve las cantidades apropiadas de los análogos de sustratos fluorogénicos (4-metilumbeliferil-α-D-glucósido (MUF-α-Glu), 4- metilumbeliferil-β-D-glucósido (MUF-β-Glu), y L-leucina-7-amido-4-metil-cumarina (MCA-Leu)), y se añadieron a tres submuestras de 3 ml en concentración saturante para cada actividad (250 µM para los sustratos MUF-α-GLU y MUF-β-GLU y 350 µM para el sustrato MCA-Leu). Las concentraciones saturantes de los tres sustratos se determinaron en

experimentos previos realizados con un rango de concentraciones de entre 0 y 1,5  $\mu\text{M}$ , y se determinaron en función de la velocidad máxima obtenida para cada enzima. Las muestras se incubaron a temperatura *in situ* durante incubaciones inferiores a 6 h. La hidrólisis de los sustratos se detectó utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS50B en el Mar Cantábrico y LS55B en el Mar Mediterráneo) a longitudes de onda de excitación/emisión de 342 nm / 453 nm para las glucosidasas y de 360 nm / 445 nm para la actividad LAP. El incremento lineal en la fluorescencia se transformó en actividad utilizando una recta estándar establecida para cada muestra con diferentes concentraciones de los fluorocromos MUF (0 - 0,5  $\mu\text{M}$ ) y MCA (0 - 1  $\mu\text{M}$ ). Las actividades específicas se calcularon dividiendo el valor de cada actividad enzimática extracelular por la densidad bacteriana de esa muestra.

#### *Composición de la comunidad bacteriana*

La composición de la comunidad bacteriana se determinó mediante la técnica CARD-FISH descrita por Pernthaler *et al.* (2002), utilizando sondas de oligonucleótidos marcados con HRP (horseradish peroxidase) diseñadas para detectar específicamente organismos pertenecientes al dominio *Bacteria* (mezcla de EUB I (Amann *et al.*, 1990) y EUB II-III (Daims *et al.*, 1999)) y cuatro de sus principales grupos filogenéticos: ALF968 (Neef, 1997) para las *Alfaproteobacteria*, incluyendo *ROS537* (Eilers *et al.*, 2001) y *SAR11-441R* (Morris *et al.*, 2002) para los grupos *Rhodobacteraceae* y *SAR11* respectivamente; BET42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Betaproteobacteria*; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Gammaproteobacteria*; y CF319a (Manz *et al.*, 1996) para los *Bacteroidetes*. La sonda antisentido para *Eubacteria* NON338 (Wallner *et al.*, 1993) se utilizó como control negativo. Todas las hibridaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 35°C, seguidas de 15 min de amplificación con tiramida-Alexa488. La concentración de la formamida en el tampón de hibridación fue del 55%, excepto para las sondas ALF968 y NON338, que fueron de 45% y 20% respectivamente. Las secciones de los filtros en los que se llevó a cabo la hibridación fueron teñidas con DAPI para posteriormente realizar la enumeración de bacterias mediante microscopía de

epifluorescencia y calcular el porcentaje de hibridación de cada sonda con respecto al total de bacterias.

#### *Determinación de carbono orgánico disuelto*

El carbono orgánico disuelto se determinó de acuerdo con el método de Benner y Strom (1993). Las muestras se filtraron a través de filtros GF / C (Whatman) previamente quemados (a 450°C 4 h) utilizando un sistema de filtración lavado con HCl 10% y lavado abundantemente con agua Milli Q. Después de descartar una primera fracción del filtrado, se tomaron submuestras por triplicado de 10 - 15 ml de agua de mar filtrada, en ampollas de vidrio quemadas y se acidificaron a pH ~ 2 con ácido ortofosfórico antes de ser selladas térmicamente y almacenadas en la oscuridad a 4°C hasta el análisis. El carbono orgánico disuelto se midió en un analizador de carbono orgánico Shimadzu TOC-CVS, con una precisión de  $\pm 0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ . El equipo se estandarizó diariamente con un estándar de ftalato de hidrógeno y potasio. La concentración del carbono orgánico disuelto se determinó restándole el área del pico del blanco preparado con agua Milli-Q (Merck) al área del pico promedio de la muestra y dividiéndolo por la pendiente de la curva estándar.

#### *Determinación de materia orgánica disuelta fluorescente*

La materia orgánica disuelta fluorescente de la MOD inicial, MOD-Bact, MOD-Prot y MOD-Final de la *Fase I*, así como de los tratamientos y los controles de la *Fase II*, se determinó según lo descrito por Nieto-Cid *et al.* (2006). Las mediciones individuales se llevaron a cabo con un espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS50B en los experimentos del Mar Cantábrico y LS55B en los del Mar Mediterráneo) en una célula de fluorescencia de cuarzo de 1 cm no fluorescente. El ancho de banda para las longitudes de onda de excitación y emisión fue de 10 nm y la velocidad de exploración fue de 250 nm min<sup>-1</sup>. Las longitudes de onda de excitación / emisión utilizadas fueron las establecidas por Coble (1996): 280 nm / 350 nm para obtener el pico T utilizado como indicador de sustancias proteicas, y 340 nm / 440 nm y 320 nm / 410 nm para obtener los picos C y M, respectivamente, considerados como indicadores de sustancias húmicas. Las medidas de

fluorescencia se transformaron en unidades de sulfato de quinina (USQ), utilizando como curvas estándar sulfato de quinina dihidrato disuelto en 0,05 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> l<sup>-1</sup>, a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm / 440 nm, y donde 1 USQ fue equivalente a la emisión de fluorescencia de 1 µg l<sup>-1</sup>. La fluorescencia del blanco, generado con agua Milli-Q (Merck) se restó a todas las muestras.

### *Análisis estadístico*

Se utilizaron las pruebas no paramétricas de U-Mann Whitney y las pruebas pareadas de Wilcoxon para identificar diferencias significativas entre ecosistemas y muestras relacionadas o tratamientos. Se realizaron regresiones lineales simples para obtener la velocidad de consumo de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo de incubación ( $p < 0,05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS Versión 20 (IBM).

## **Resultados**

### *Fase I: recolección y caracterización de la materia orgánica disuelta alterada*

El crecimiento de las comunidades microbianas mostró la evolución típica de un sistema depredador-presa (Figura 2.3). La comunidad bacteriana comenzó a crecer exponencialmente en las primeras horas de incubación, con una tasa media de crecimiento de  $1,45 \pm 0,28 \text{ d}^{-1}$  en el Mar Cantábrico y en un rango de entre 0,55 y  $0,82 \text{ d}^{-1}$  en aguas del Mar Mediterráneo, logrando su máxima abundancia ( $4,9 \times 10^6 \pm 9,0 \times 10^5 \text{ cél ml}^{-1}$  en el Mar Cantábrico y en un rango de entre  $1,4 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^6 \text{ cél ml}^{-1}$  en el Mar Mediterráneo) en las primeras 28 - 40 h de la incubación. En el punto de máxima densidad bacteriana, antes de que la densidad de protozoos fuera máxima, se recogió la MOD-Bact. En respuesta al aumento en el número de presas, los protozoos comenzaron a crecer exponencialmente hasta las 56 - 70 h de incubación, momento en el cual se recolectó la MOD-Prot. Los protozoos mostraron tasas de crecimiento específicas de  $1,65 \pm 0,49 \text{ d}^{-1}$  en el Mar Cantábrico y de  $0,72 \text{ d}^{-1}$  en el Mar Mediterráneo (rango de  $0,63 - 0,80 \text{ d}^{-1}$ ), y

alcanzaron densidades de  $1,4 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup> en el Mar Cantábrico y un rango de entre  $3,7 \times 10^3$  y  $7,0 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup> en los experimentos del Mar Mediterráneo. Finalmente, la MOD-Final se recogió cuando no se detectó crecimiento en ninguna de las dos comunidades, después de 96 - 120 h de incubación.

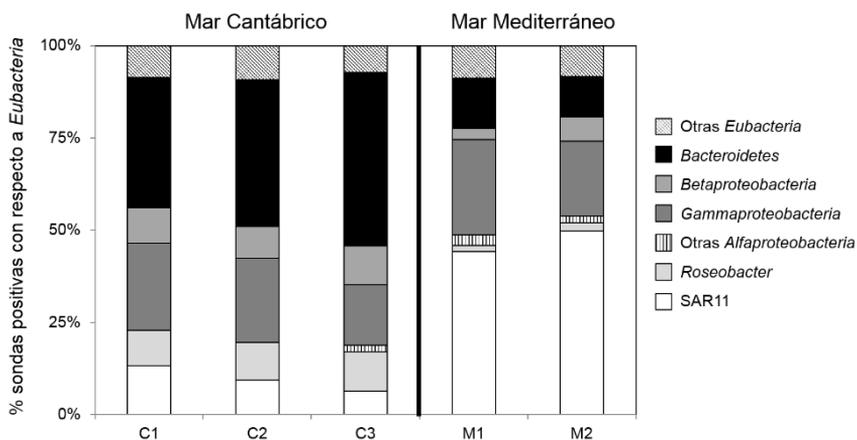
Para caracterizar la materia orgánica disuelta, se determinó la fluorescencia del pico T, indicador de la presencia de sustancias proteicas, así como la fluorescencia de los picos C y M, indicadores de la presencia de sustancias húmicas. Dado que las fluorescencias de los picos C y M mantuvieron la misma tendencia y no fueron significativamente diferentes entre sí (datos no mostrados), las sustancias húmicas se analizaron mediante la adición de los dos picos. La materia orgánica disuelta inicial de los microcosmos del Mar Cantábrico tenía una mayor cantidad de sustancias húmicas y proteicas que la materia orgánica disuelta inicial de los microcosmos del Mar Mediterráneo (Tabla 2.2A). Sin embargo, en ambos ecosistemas, la materia orgánica disuelta alterada obtenida en la *Fase I* después de la depredación por protozoos bacterívoros contenía de media una mayor cantidad de sustancias húmicas y proteicas que la materia orgánica disuelta inicial (prueba de Wilcoxon,  $p = 0,028$  para ambos). La concentración de los compuestos húmicos aumentó durante el crecimiento bacteriano y posteriormente siguió aumentando hasta el momento de máxima abundancia de protozoos, siendo este aumento mucho mayor en los experimentos del Mar Mediterráneo: las sustancias húmicas aumentaron con respecto a los valores iniciales de media un 4,8% y 5,1% en la MOD-Bact y la MOD-Prot en el Mar Cantábrico y en 21,3% y 72,1% en el Mar Mediterráneo. También aumentó la concentración de las sustancias proteicas (pico-T de Coble) en las primeras 70 h de incubación, especialmente durante el crecimiento de los protozoos (de media un 26,2% en el Mar Cantábrico y un 24,9% en el Mar Mediterráneo). Por lo tanto, la MOD-Prot se caracterizó por una mayor cantidad de sustancias húmicas y proteicas que la MOD-Bact y la MOD-Final en ambos ecosistemas.

**Tabla 2.2.** (A) Compuestos húmicos (pico-M y pico-C) y proteicos (pico-T) (unidades de sulfato de quinina, USQ) detectados en los microcosmos de la *Fase I* en el Mar Cantábrico y en el Mar Mediterráneo. Las muestras se midieron a tiempo inicial, en el máximo de densidad bacteriana (MOD-Bact), en el máximo de densidad de protozoos (MOD-Prot) y a tiempo final del microcosmos (MOD-Final). (B) Consumo (-) o producción (+) relativas (%) de compuestos húmicos y proteicos en los tratamientos de la *Fase II* en los dos sistemas marinos. Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar y rango de valores para el Mar Cantábrico (muestreado 3 veces) y como media y rango de valores para el Mar Mediterráneo (muestreado 2 veces); n. d.: no hay datos.

<b>A) Caracterización de la materia orgánica disuelta fluorescente (microcosmos de la Fase I)</b>								
	MAR CANTÁBRICO (n = 3)				MAR MEDITERRÁNEO (n = 2)			
	Inicial	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final	Inicial	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final
<b>Húmicos (USQ)</b>	3,74 $\pm$ 1,51 [2,77 – 6,41]	3,92 $\pm$ 1,20 [2,86 – 5,83]	3,93 $\pm$ 1,64 [2,99 – 6,84]	n. d.	1,22 [1,03 – 1,40]	1,48 [1,40 – 1,55]	2,1 [1,92 – 2,28]	1,75 [1,43 – 2,06]
<b>Proteicos (USQ)</b>	1,95 $\pm$ 0,36 [1,48 – 2,31]	2,23 $\pm$ 0,45 [1,56 – 2,50]	2,46 $\pm$ 0,68 [1,69 – 3,32]	n. d.	1,81 [1,15 – 2,48]	1,37 [1,09 – 1,65]	3,38 [1,76 – 5,01]	2,26 [1,17 – 3,34]
<b>Pico T/(M+C)</b>	0,52	0,57	0,62	n. d.	1,48	0,93	1,61	1,29
<b>B) Consumo (-) o producción (+) de la materia orgánica disuelta fluorescente (tratamientos de la Fase II)</b>								
	MAR CANTÁBRICO (n = 3)				MAR MEDITERRÁNEO (n = 2)			
	CONTROL	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final	CONTROL	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final
<b><math>\Delta</math> Húmicos (%)</b>	74,3 $\pm$ 33,8 [50,4 – 98,2]	n. d.	96,3 $\pm$ 0,0 [96,3 - n.d.]	n. d.	40,4 [30,1 – 50,6]	83,7 [10,0 – 157,4]	42,9 [33,1 – 52,6]	72,8 [30,1 – 115,5]
<b><math>\Delta</math> Proteicos (%)</b>	- 25,4 $\pm$ 8,1 [(-31,1) - (-19,6)]	n. d.	- 49,3 $\pm$ 0,0 [(-49,3) - n.d.]	n. d.	104,9 [18,8 – 191,0]	78,1 [33,4 – 122,8]	121,7 [118,4 – 125,0]	134,9 [114,4 – 155,4]

*Fase II: Tratamientos. Características de las comunidades bacterianas en el mar Cantábrico y el Mediterráneo*

En ninguno de los 5 experimentos se encontraron diferencias significativas en la densidad de bacterias o en la proporción relativa de los principales grupos bacterianos entre la comunidad natural y el control. Después de la concentración por filtración y posterior reemplazo de la materia orgánica disuelta, las densidades bacterianas fueron  $2,4 \times 10^6 \pm 9,2 \times 10^5$  cél ml<sup>-1</sup> en el Mar Cantábrico y variaron entre  $5,4 \times 10^5$  y  $5,9 \times 10^5$  cél ml<sup>-1</sup> en el Mar Mediterráneo (niveles de recuperación del  $80,3 \pm 10,8\%$  y  $94,8 \pm 5,4\%$ , respectivamente). Se detectaron diferencias significativas en la composición de la comunidad bacteriana inicial entre los dos ecosistemas (Figura 2.4). Mientras que en el Mar Cantábrico el grupo dominante fue *Bacteroidetes* ( $41,0 \pm 3,3\%$ ), con una contribución baja de SAR11 ( $9,7 \pm 2,0\%$ ), en el Mar Mediterráneo SAR11 fue el grupo más abundante ( $47,0 \pm 2,8\%$  de las *Eubacteria*).



**Figura 2.4.** Composición de la comunidad bacteriana inicial medida mediante CARD-FISH en las muestras recogidas para desarrollar los tratamientos de la Fase II en el Mar Cantábrico (C1, C2 y C3) y el Mar Mediterráneo (M1 y M2).

Los resultados de las actividades bacterianas se presentan en la Tabla 2.3. En los controles, la respiración bacteriana específica fue de media 4,5 veces inferior en

el Mar Cantábrico que en el Mar Mediterráneo, mientras que la producción bacteriana específica fue de media 2,8 veces superior en el Mar Cantábrico. Como resultado, la demanda de carbono específica en el Mar Cantábrico fue inferior a la del Mar Mediterráneo, aunque la eficiencia de crecimiento bacteriana de media fue 10,3 veces mayor en el Mar Cantábrico (28,9%) que en el Mar Mediterráneo (2,8%). Sin embargo, y debido al bajo número de muestras analizadas (3 para el Mar Cantábrico y 2 para el Mar Mediterráneo), no se observaron diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% para cualquiera de los tres parámetros (U-Mann Whitney,  $p = 0,083$  en los tres).

La actividad enzimática extracelular LAP fue predominante en ambos ecosistemas. La LAP específica fue de media 1,6 veces superior en el Mar Cantábrico ( $181,6 \times 10^{-8} \pm 87,7 \text{ nmol cél}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) que en aguas del Mar Mediterráneo ( $115,3 \times 10^{-8} \text{ nmol cél}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , rango 106,2 - 124,3  $\text{nmol cél}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). En cambio, la suma de las actividades específicas de las glucosidasas fue 1,3 veces menor en el Mar Cantábrico que en el Mar Mediterráneo. Como resultado, la proporción de LAP:Glu detectada fue alrededor de dos veces más alta en el Mar Cantábrico (20,9) que en el Mar Mediterráneo (10,1).

La concentración del carbono orgánico disuelto fue de media 1,3 veces más alta en el Mar Cantábrico ( $146,7 \pm 39,0 \mu\text{M}$ ) que en el Mar Mediterráneo (109,2  $\mu\text{M}$ ; de 100,9 a 117,4  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 2.4) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 2.3.** Datos de la actividad bacteriana en los controles y en los tratamientos (MOD-Bact, MOD-Prot y MOD-Final) de la *Fase II*. Respiración bacteriana específica (RB sp), producción bacteriana específica (PB sp), demanda de carbono bacteriana específica (DCB sp), eficiencia de crecimiento bacteriano (ECB), actividad aminopeptidasa específica (LAP sp), actividad  $\alpha$ -glucosidasa específica ( $\alpha$ -Glu sp) y actividad  $\beta$ -glucosidasa específica ( $\beta$ -Glu sp). Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar y rango de valores para el Mar Cantábrico (muestreado 3 veces) y como media y rango de valores para el Mar Mediterráneo (muestreado 2 veces). \*Glu se refiere a la suma de las actividades  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa.

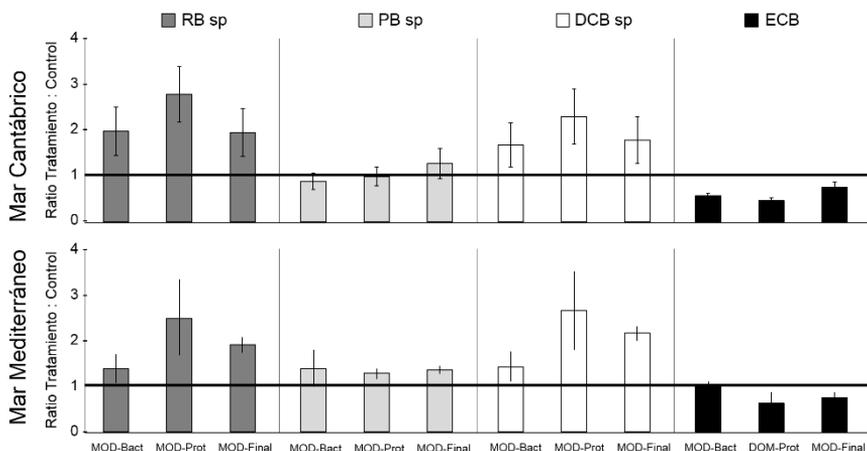
	MAR CANTÁBRICO (n = 3)				MAR MEDITERRÁNEO (n = 2)			
	CONTROL	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final	CONTROL	MOD-Bact	MOD-Prot	MOD-Final
<b>RB sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C cé}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	42,1 $\pm$ 20,5 [18,9 – 57,7]	83,6 $\pm$ 69,6 [34,5 – 163,2]	121,5 $\pm$ 92,0 [41,1 – 221,8]	77,2 $\pm$ 71,2 [20,2 – 162,5]	188,5 [133,5 – 243,6]	234,5 [217,8 – 251,2]	406,9 [389,0 – 424,8]	338,4 [264,6 – 412,2]
<b>PB sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C cé}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	14,8 $\pm$ 2,3 [13,1 – 17,4]	12,2 $\pm$ 2,8 [9,8 – 15,3]	14,1 $\pm$ 5,1 [8,2 – 16,6]	18,5 $\pm$ 10,0 [8,2 – 28,2]	5,3 [4,9 – 5,6]	6,1 [4,7 – 7,5]	6,1 [5,8 – 6,4]	6,3 [6,0 – 6,6]
<b>DCB sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C cé}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	56,9 $\pm$ 21,1 [32,6 – 70,8]	95,8 $\pm$ 72,1 [45,9 – 178,5]	135,5 $\pm$ 95,7 [49,3 – 238,5]	95,7 $\pm$ 76,9 [28,3 – 181,7]	193,5 [138,5 – 248,4]	241,1 [226,4 – 255,9]	413,0 [395,4 – 430,6]	344,9 [270,9 – 418,8]
<b>ECB (%)</b>	28,9 $\pm$ 12,1 [18,6 – 42,2]	16,4 $\pm$ 8,2 [8,6 – 25,0]	12,8 $\pm$ 5,1 [7,0 – 16,6]	25,3 $\pm$ 9,5 [10,6 – 28,8]	2,8 [2,0 – 3,6]	2,8 [1,8 – 3,8]	1,5 [1,3 – 1,6]	2,0 [1,6 – 2,3]
<b>LAP sp</b> ( $\times 10^{-8}$ nmol cé $^{-1}$ d $^{-1}$ )	181,6 $\pm$ 87,7 [80,4 – 235,1]	185,8 $\pm$ 54,0 [148,5 – 247,7]	306,1 $\pm$ 206,6 [158,1 – 542,1]	204,4 $\pm$ 48,2 [153,4 – 249,2]	115,3 [106,2 – 124,3]	118,1 [113,9 – 122,2]	145,3 [111,4 – 179,2]	128,8 [118,9 – 138,6]
<b><math>\alpha</math>-Glu sp</b> ( $\times 10^{-8}$ nmol cé $^{-1}$ d $^{-1}$ )	3,4 $\pm$ 2,0 [2,0 – 4,8]	1,6 $\pm$ 2,2 [0,0 – 3,1]	3,1 $\pm$ 0,3 [2,9 – 3,3]	4,3 $\pm$ 1,9 [3,0 – 5,6]	4,0 [3,4 – 4,6]	3,7 [2,1 – 5,3]	6,4 [6,2 – 6,6]	4,5 [3,0 – 6,0]
<b><math>\beta</math>-Glu sp</b> ( $\times 10^{-8}$ nmol cé $^{-1}$ d $^{-1}$ )	5,3 $\pm$ 5,3 [1,5 – 9,1]	1,5 $\pm$ 1,1 [0,7 – 2,3]	3,0 $\pm$ 0,2 [2,9 – 3,1]	2,8 $\pm$ 0,2 [2,6 – 2,9]	7,4 [5,7 – 9,0]	7,2 [4,5 – 9,9]	7,2 [5,4 – 8,9]	8,0 [5,5 – 10,5]
<b>LAP/*Glu</b>	20,9	59,9	50,2	28,8	10,1	10,8	10,7	10,3

**Tabla 2.4.** Concentración ( $\mu\text{M}$ ) del carbono orgánico disuelto de los controles y de los tratamientos (MOD-Bact, MOD-Prot y MOD-Final) de la *Fase II* de los experimentos en el Mar Cantábrico (C1, C2, C3) y de los experimentos en el Mar Mediterráneo (M1, M2). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar.

<b>MAR CANTÁBRICO (n=3)</b>				
	<b>CONTROL</b>	<b>MOD-Bact</b>	<b>MOD-Prot</b>	<b>MOD-Final</b>
<b>C1</b>	112,6 $\pm$ 0,6	105,7 $\pm$ 0,5	103,7 $\pm$ 0,3	97,9 $\pm$ 0,5
<b>C2</b>	138,2 $\pm$ 0,3	130,3 $\pm$ 0,5	132,1 $\pm$ 0,4	132,0 $\pm$ 0,2
<b>C3</b>	135,2 $\pm$ 0,2	128,7 $\pm$ 0,4	127,1 $\pm$ 0,5	120,4 $\pm$ 0,3
<b>MAR MEDITERRÁNEO (n=2)</b>				
	<b>CONTROL</b>	<b>MOD-Bact</b>	<b>MOD-Prot</b>	<b>MOD-Final</b>
<b>M1</b>	117,4 $\pm$ 0,2	103,4 $\pm$ 0,0	102,8 $\pm$ 0,5	89,0 $\pm$ 0,5
<b>M2</b>	100,9 $\pm$ 1,1	84,8 $\pm$ 0,4	88,8 $\pm$ 0,5	82,9 $\pm$ 0,5

*Fase II: Tratamientos. Efecto de la materia orgánica disuelta biológicamente alterada en la actividad metabólica bacteriana*

La comparativa entre cada tratamiento y su control correspondiente de los valores medios específicos de la respiración, la producción, la demanda de carbono y la eficiencia de crecimiento bacteriana en los dos sistemas se muestran en la Figura 2.5. El análisis de las diferencias detectadas sugiere la existencia de importantes cambios metabólicos en las bacterias como respuesta a la presencia de la materia orgánica disuelta alterada. Una característica común de las comunidades bacterianas de ambos ecosistemas fue que su respiración bacteriana específica fue significativamente superior en los tratamientos con materia orgánica disuelta alterada que en los controles (prueba de Wilcoxon,  $p < 0,05$ , para los tres tratamientos). Cabe destacar que las mayores diferencias se



**Figura 2.5.** Ratio tratamiento:control de la respiración bacteriana específica (RB sp), producción bacteriana específica (PB sp), la demanda de carbono bacteriana específica (DCB sp) y la eficiencia de crecimiento bacteriano (ECB) en presencia de las diferentes materias orgánicas disueltas alteradas microbiológicamente (MOD-Bact, MOD-Prot y MOD-Final). Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar para el Mar Cantábrico (muestreado 3 veces) y como media y rango de valores para el Mar Mediterráneo (muestreado 2 veces) (barras verticales). La línea horizontal indica el mismo valor para los tratamientos y su respectivo control. Las columnas por debajo de la línea horizontal indican que el valor del tratamiento fue menor que en el control, y las columnas por encima de la línea indican que el valor para el tratamiento fue superior que en el control.

detectaron en los tratamientos que contenían MOD-Prot (valores 2,7 y 2,4 veces superiores que sus controles en aguas del Mar Cantábrico y Mar Mediterráneo, respectivamente). En estas comunidades, sin embargo, no se observaron cambios en la producción bacteriana específica en la misma medida: los valores obtenidos en los tratamientos fueron sólo ligeramente superiores o inferiores que los obtenidos en sus controles. El mismo resultado se obtuvo en el tratamiento adicional que contenía MOD-Prot enriquecido con nutrientes inorgánicos (MOD-Nut). Las tres materias orgánicas disueltas alteradas (MOD-Bact, MOD-Prot y MOD-Final) causaron una mayor demanda de carbono bacteriana específica y una eficiencia de crecimiento bacteriana menor en los dos ecosistemas, con la única excepción de la eficiencia en el tratamiento de MOD-Bact en el Mar Mediterráneo. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas en la demanda de carbono bacteriana específica en el tratamiento con MOD-Prot (prueba de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) y en la eficiencia de crecimiento bacteriana en los tratamientos con MOD-Prot y MOD-Final (prueba de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) con los

datos normalizados con respecto al control. Las inferiores eficiencias observadas fueron debidas a la mayor respiración bacteriana específica en presencia de la materia orgánica disuelta alterada por la actividad microbiana.

La presencia y utilización de las diferentes materias orgánicas disueltas alteradas también conllevó cambios en las actividades enzimáticas extracelulares bacterianas, aunque fueron diferentes en los dos ecosistemas marinos costeros (Tabla 2.3). En ambos sistemas se observó un aumento notable en la LAP específica en presencia de la MOD-Prot: aumento del 68,5% respecto a los controles en el Mar Cantábrico y 26% en aguas del Mar Mediterráneo. Sin embargo, la suma de las actividades específicas de las glucosidasas se redujo en un 30% en el Mar Cantábrico mientras que en la Mar Mediterráneo aumentó en 20%. Así, en aguas del Mar Cantábrico el ratio LAP:Glu de las comunidades bacterianas en presencia de la materia orgánica disuelta alterada por depredación aumentó 2,4 veces, mientras que en aguas del Mar Mediterráneo este ratio se mantuvo muy similar al observado en los controles.

A pesar de estos cambios en las actividades enzimáticas, las bacterias no parecieron ser capaces de generar un consumo neto de las sustancias húmicas, o por lo menos no a mayor velocidad de lo que las producían, ya que éstas se acumularon en los dos ecosistemas, tanto en los controles como en los tratamientos (Tabla 2.2B). Con respecto a las sustancias proteicas, mientras que en el Mar Mediterráneo se acumularon en los tratamientos que contenían MOD-Prot y MOD-Final, en el Mar Cantábrico las comunidades bacterianas fueron capaces de consumir estas sustancias eficientemente: hasta el 25,4% y el 49,3% de las sustancias proteicas presentes en el control y en los tratamientos de MOD-Prot fueron consumidas durante las 24 h de incubación.

En ambos ecosistemas, el contenido de carbono orgánico disuelto en los tratamientos con MOD-Bact fue menor que en los controles; de media un 5,5% menos en el Mar Cantábrico y 5,9% menos en el Mar Mediterráneo (Tabla 2.4). Las concentraciones de carbono orgánico disuelto fueron similares en los tratamientos con MOD-Bact y MOD-Prot, mientras que en los tratamientos con

MOD-Final se observó una leve disminución en ambos ecosistemas en relación con la MOD-Prot (4,2% y 9,9% en el Mar Cantábrico y en el Mar Mediterráneo, respectivamente).

## **Discusión**

Los resultados obtenidos muestran claramente que, en los dos ecosistemas marinos, la actividad microbiana (el crecimiento bacteriano, pero sobre todo el posterior crecimiento y depredación de los protozoos bacterívoros) causa alteraciones en la composición de la materia orgánica disuelta marina, que a su vez desencadena cambios metabólicos importantes en las comunidades bacterianas. El uso de la materia orgánica disuelta marina microbiológicamente alterada, y especialmente de la materia orgánica disuelta alterada durante la acción depredadora de los protozoos (MOD-Prot), conlleva un aumento en la demanda de carbono bacteriana específica de más del 200%, así como una disminución en la eficiencia de crecimiento de hasta un 56% y 46% para las comunidades bacterianas del Mar Cantábrico y del Mar Mediterráneo, respectivamente. Estas disminuciones en la eficiencia de crecimiento bacteriana no fueron debidas a menores tasas de producción, que se mantuvieron similares a las del control, sino a que se generaron tasas mucho más altas de respiración, que explican el aumento del consumo de carbono. La concentración de carbono orgánico disuelto en los tratamientos fue ligeramente inferior a la disponible en los controles, probablemente debido a su consumo y transformación en biomasa microbiana y CO<sub>2</sub> durante la *Fase I* de los experimentos. Sin embargo, no se encontró una clara relación entre estas pequeñas diferencias en la concentración de carbono orgánico disuelto y los cambios en la eficiencia de crecimiento bacteriana en ninguno de los dos ecosistemas. En este sentido, las diferencias en la concentración de carbono orgánico disuelto entre el control y los tratamientos con MOD-Bact observados en el Mar Mediterráneo no estuvieron relacionadas con diferencias en la eficiencia de crecimiento bacteriana. Por el contrario, la eficiencia de crecimiento en los tratamientos con MOD-Prot fue significativamente más bajo que en los tratamientos con MOD-Bact, aunque no

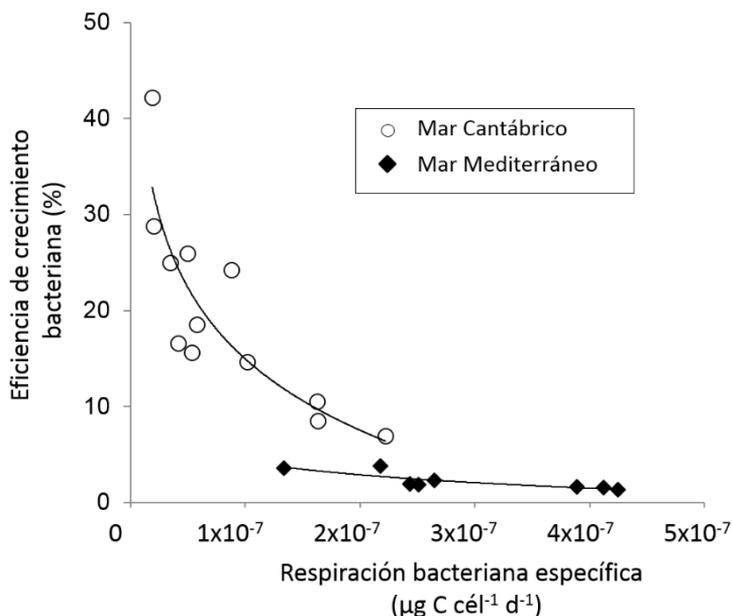
se encontraron diferencias en la concentración de carbono orgánico disuelto. Tampoco se encontró ninguna relación en los experimentos realizados en el Mar Cantábrico. Por lo tanto, consideramos que los efectos observados en el metabolismo bacteriano son principalmente atribuibles a la calidad y no a la cantidad de la materia orgánica disuelta añadida. Por otra parte, cualquier limitación de nutrientes que pudiera enmascarar los cambios metabólicos provocados por la materia orgánica disuelta alterada en los tratamientos fue probada mediante la incorporación de nutrientes inorgánicos en un tratamiento adicional que contenía MOD-Prot; no se encontraron diferencias significativas en la respiración, la producción o la eficiencia de crecimiento bacteriana en relación con el mismo tratamiento sin nutrientes (datos no mostrados).

La gran similitud de las respuestas metabólicas en los dos sistemas fue reseñable, dado que las comunidades bacterianas de los controles del Mar Cantábrico y del Mar Mediterráneo eran completamente diferentes, tanto en composición como en actividad metabólica. La comunidad de bacterias del Mar Cantábrico fue ligeramente más numerosa, dominada por *Bacteroidetes* y hasta diez veces más eficiente en el procesamiento del carbono (mayor eficiencia de crecimiento bacteriana) que la comunidad del Mar Mediterráneo. En cambio, la comunidad bacteriana del Mar Mediterráneo, dominada por SAR11 (casi el 50% del total de bacterias), consumió tres veces más carbono, produjo casi tres veces menos carbono y respiró cuatro veces y media más carbono que las bacterias del Mar Cantábrico. Todas estas diferencias condujeron a una eficiencia de crecimiento media del 28,9% para el Mar Cantábrico, diez veces más alta que la eficiencia de crecimiento media del 2,8% obtenida para la comunidad bacteriana del Mar Mediterráneo. Es muy probable que los cambios en la estructura y densidad relativa de los principales grupos de la comunidad bacteriana que han sido detectados durante todo el año, tanto en el Mar Cantábrico (**Capítulo 3**) como en el Mar Mediterráneo (Schauer *et al.*, 2003; Alonso-Sáez *et al.*, 2007a), estén implicados en las acentuadas diferencias entre estos dos ecosistemas respecto al procesamiento del carbono y en la eficiencia de crecimiento bacteriana. Cottrell

y Kirchman (2003) encontraron cambios sustanciales en el porcentaje de células activas (en la incorporación de leucina y timidina) entre diferentes grupos bacterianos a través de un gradiente de salinidad en el estuario de Delaware, donde las *Alfaproteobacteria* presentaron una asimilación de  $^3\text{H}$ -leucina tres veces superior a la de los *Bacteroidetes*. Sin embargo, en este trabajo encontramos que la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina fue 3 veces superior en el Mar Cantábrico que en el Mar Mediterráneo.

El procedimiento experimental utilizado en este estudio ha permitido determinar, en un corto periodo de tiempo (menos de 6 horas), las respuestas metabólicas de una determinada comunidad bacteriana a una variación en la materia orgánica disuelta disponible. A pesar de las grandes diferencias existentes en composición y en función entre las comunidades bacterianas de los dos ecosistemas, ambas mostraron cambios metabólicos similares después de ser suplementados con materia orgánica disuelta alterada por el crecimiento bacteriano y el posterior crecimiento y actividad bacterívora de los protozoos. En todos los casos, la respuesta más llamativa fue la generada por la materia orgánica disuelta recogida durante y después de la depredación de los protozoos, y el cambio más relevante fue el aumento de la respiración bacteriana específica, que a su vez afectó a la eficiencia de crecimiento bacteriana. De hecho, se observó una relación semilogarítmica negativa (Figura 2.6) entre estas dos variables tanto en el Mar Cantábrico (Eficiencia =  $-10,71 \ln(\text{Respiración}) - 157,61$ ;  $r^2 = 0,80$ ,  $p < 0,001$ ), como en el Mar Mediterráneo (Eficiencia =  $-2,01 \ln(\text{Respiración}) - 28,07$ ;  $r^2 = 0,75$ ,  $p = 0,006$ ). Estas relaciones indican que el aumento de la respiración bacteriana específica explicaría el 70% de la disminución en la eficiencia de crecimiento en las dos comunidades bacterianas. Sin embargo, la pendiente de la curva y el rango de valores de la respiración bacteriana específica fueron muy diferentes en los dos sistemas marinos. Asumiendo que la eficiencia de crecimiento bacteriana refleja el grado de optimización de uso de los recursos disponibles, estos resultados indicarían que la comunidad del Mar Cantábrico,

dominada por *Bacteroidetes*, estaría mejor preparada para enfrentarse a cambios que implican variaciones en las tasas de respiración, y estas adaptaciones se



**Figura 2.6.** Relación entre la respiración bacteriana específica (RB) y la eficiencia de crecimiento bacteriano (ECB) en los tratamientos de la Fase II del Mar Cantábrico ( $ECB = -10,71 \ln(RB \text{ específica}) - 157,61$ ;  $r^2 = 0,80$ ,  $p < 0,001$ ) y del Mar Mediterráneo ( $ECB = 2,01 \ln(RB \text{ específica}) - 28,07$  ( $r^2 = 0,75$ ,  $p = 0,006$ )).

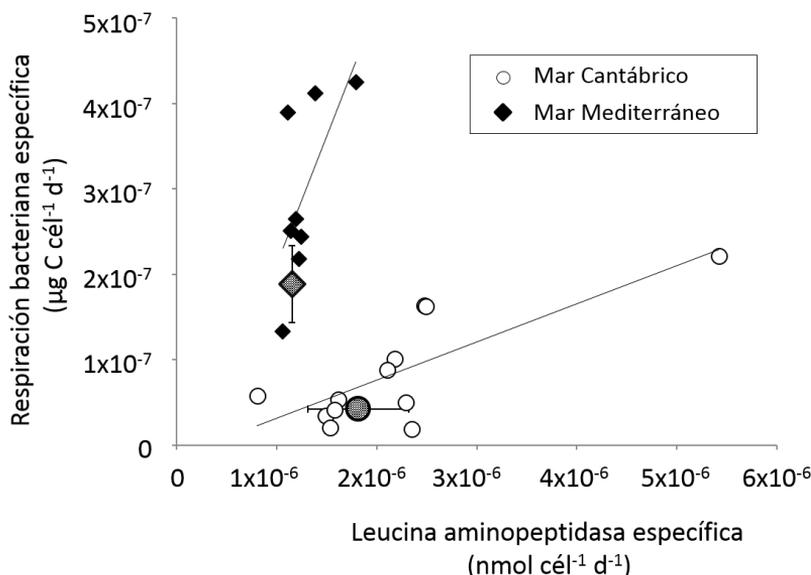
verían reflejadas en los valores cambiantes de la eficiencia de crecimiento. Sin embargo, la comunidad bacteriana del Mar Mediterráneo, dominada por SAR11, presentó tasas de respiración específicas muy variables correspondientes a unas eficiencias de crecimiento bajas relativamente homogéneas. Estos resultados son consistentes con la tendencia conocida de que la eficiencia de crecimiento bacteriana suele ser mayor en los sistemas más eutróficos (del Giorgio & Cole, 1998), en los que el aporte de *Bacteroidetes* a la composición de la comunidad es habitualmente muy elevado (Rappé *et al.*, 2002; Lefort & Gasol, 2013).

Además, debe considerarse el hecho de que en este estudio se ha medido la producción bacteriana mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-leucina. Incluso teniendo en cuenta la poca contribución de la producción bacteriana en la variabilidad de

los valores de eficiencia de crecimiento, las diferencias encontradas en la capacidad para asimilar la  $^3\text{H}$ -leucina entre *Bacteroidetes* y SAR11 (Cottrell & Kirchman, 2003) podría contribuir a incrementar las diferencias encontradas en este estudio en la eficiencia de crecimiento bacteriana de las comunidades bacterianas del Mar Cantábrico y del Mar Mediterráneo.

Nuestros resultados también mostraron mayor actividad enzimática extracelular específica del tipo LAP en las dos comunidades cuando estaban en presencia de materias orgánicas disueltas alteradas, que en confinamiento asumimos que están asociadas a mayores tasas de producción de este enzima. La síntesis de enzimas es costosa para las bacterias (Middelboe & Søndergaard, 1993; Sinsabaugh *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 2007), y requiere un aporte energético que se refleja en unas elevadas tasas de respiración bacteriana específica (del Giorgio & Cole, 1998; Baltar *et al.*, 2009). De hecho, al comparar la actividad específica del enzima extracelular dominante (LAP) y la respiración específica de las comunidades bacterianas en ambos ecosistemas costeros encontramos una relación positiva entre ambas variables (Figura 2.7), pero de nuevo se observaron notables diferencias entre los dos ecosistemas costeros: por una parte, la pendiente fue más de 6 veces menor en las comunidades del Mar Cantábrico que en las comunidades del Mar Mediterráneo; por otra, los rangos de los valores de ambas variables fueron muy diferentes entre las dos comunidades. El amplio rango de valores de LAP específica, junto con las bajas pendientes encontradas en la comunidad bacteriana del Mar Cantábrico, dominado por *Bacteroidetes*, indican una buena adaptación de estas bacterias frente a un entorno cambiante. En comparación, la elevada pendiente encontrada en el Mar Mediterráneo (notable variación de la respiración bacteriana específica frente a pequeños cambios en la actividad LAP específica) sugiere que, en esta comunidad, dominada por SAR11, el coste metabólico para hidrolizar una cierta cantidad de sustrato polimérico es muy elevado, lo que se refleja en bajas eficiencias de crecimiento. Middelboe y Søndergaard (1993) sugirieron que la demanda energética asociada a la actividad enzimática extracelular implica una disminución en la eficiencia de

utilización del carbono. Dado que los cambios en actividades enzimáticas extracelulares se producen tan rápido como el recambio celular (Findlay & Sinsabaugh, 2003), su efecto puede reflejarse inmediatamente en la eficiencia de crecimiento bacteriana.



**Figura 2.7.** Relación entre la actividad leucina aminopeptidasa específica y la respiración bacteriana específica en los tratamientos de la Fase II ( $RB = 0,044LAP - 2 \times 10^{-8}$ ,  $r^2 = 0,564$ , en el Mar Cantábrico y  $RB = 0,265LAP - 8 \times 10^{-8}$ ,  $r^2 = 0,383$ , en aguas del Mar Mediterráneo). Los puntos más grandes y sombreados indican los valores medios y las desviaciones estándar de los controles en el Mar Cantábrico (redondo) y en el Mar Mediterráneo (diamante).

Por lo tanto, la necesidad de producir enzimas hidrolíticos puede ser un factor importante que explicaría la alta demanda energética observada en las dos comunidades bacterianas. Además de las condiciones fisicoquímicas del ecosistema marino, los principales factores que influyen en la expresión de un determinado perfil de enzimas extracelulares son la composición de la comunidad bacteriana, porque determina el potencial genético o la capacidad de la comunidad, y la composición de la materia orgánica como regulador de la expresión o síntesis de los enzimas hidrolíticos (Chróst & Siuda, 2002; Hoppe *et al.*, 2002). Con respecto a la composición de la comunidad, el menor coste energético asociado a la mayor expresión de la actividad LAP por parte de las bacterias del Mar Cantábrico (ver valores de los controles en la Figura 2.7) podría

estar relacionado con la dominancia de *Bacteroidetes* en verano en esta área. Las bacterias del grupo *Bacteroidetes* son consideradas especialistas en la utilización de materia orgánica de alto peso molecular (Cottrell & Kirchman, 2000; Elifantz *et al.*, 2005), que contiene una cantidad significativa de proteínas y polipéptidos (Coffin, 1989; Rosenstock & Simon, 1993; Kroer *et al.*, 1994; Keil & Kirchman, 1999). Así, la comunidad del Mar Cantábrico estaría preparada a corto plazo para procesar la materia orgánica resultante del crecimiento bacteriano y de la depredación por protozoos bacterívoros.

En cambio, la composición de la comunidad bacteriana de la costa del Mar Mediterráneo en verano fue notablemente diferente: la presencia de *Bacteroidetes* fue escasa (aproximadamente un 11% de media), mientras que las bacterias dominantes fueron las pertenecientes al grupo SAR11 (47% de media), de las que se sabe que prefieren compuestos de bajo peso molecular como la glucosa (Alonso & Pernthaler, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2012) o los aminoácidos libres disueltos y el dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Malmstrom *et al.*, 2004). Esta composición bacteriana en el Mar Mediterráneo encaja bien con los mayores costes energéticos asociados a la expresión de la actividad LAP. Otra diferencia en los perfiles de actividad del enzima en las dos comunidades es la ratio entre la actividad aminopeptidasa y la suma de glucosidasas ( $\alpha$ -glucosidasa +  $\beta$ -glucosidasa), que fue dos veces superior en el Mar Cantábrico (20,9) que en las comunidades bacterianas del Mar Mediterráneo (10,1). Es bien sabido que diferentes grupos de bacterias pueden expresar diferentes niveles de actividades enzimáticas hidrolíticas (Martínez *et al.*, 1996; Pinhassi *et al.*, 1999). De esta manera, estos diferentes ratios podrían estar determinados por la composición de la comunidad, y variar de diferente manera en presencia de las materias orgánicas disueltas alteradas. Mientras que la ratio aumentó en la comunidad del Mar Cantábrico (entre 1,4 y 2,9 veces), en la comunidad del Mar Mediterráneo permaneció estable.

La composición de la materia orgánica también tiene una gran influencia en la expresión enzimática extracelular de una comunidad bacteriana (Chróst & Siuda,

2006), en la posterior absorción de compuestos orgánicos (Apple & del Giorgio, 2007) y en el coste energético correspondiente. En este estudio la caracterización de la materia orgánica disuelta se basó en la cuantificación de los compuestos húmicos y proteicos de la fracción fluorescente, que puede suponer hasta el 70% del carbono orgánico disuelto en ecosistemas costeros (Chen & Bada, 1992; Chen *et al.*, 2002; Kowalczyk *et al.*, 2010). Aunque la composición inicial de la materia orgánica en los microcosmos desarrollados en la *Fase I* fue diferente, su evolución fue similar en los dos ecosistemas. Las aguas del Mar Cantábrico fueron ligeramente más ricas en compuestos húmicos y ligeramente más pobres en compuestos proteicos (ratio Proteicos/Húmicos 0,52) que las del Mar Mediterráneo (ratio 1,48). Sin embargo, se detectó una acumulación progresiva de compuestos húmicos y proteicos durante el crecimiento bacteriano y durante la depredación por protozoos bacterívoros en ambos ecosistemas, aunque en mayor medida en el Mar Mediterráneo. Las bacterias pueden liberar gran cantidad de compuestos húmicos, tanto cuando crecen exponencialmente como cuando permanecen en las fases estacionaria y senescente (Romera-Castillo *et al.* 2011). En el caso de los compuestos proteicos, se ha documentado que sus concentraciones aumentan durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, pero posteriormente disminuye después de que las poblaciones bacterianas han alcanzado la fase de crecimiento estacionario (Kawasaki & Benner, 2006; Romera-Castillo *et al.*, 2011). Por lo tanto, la acumulación progresiva de compuestos húmicos y proteicos derivarían principalmente de los procesos de egestión y excreción ejecutados por los protozoos. Basándonos en los estudios previos mencionados, esperábamos mayores incrementos en compuestos húmicos y proteicos en el caso de los microcosmos del Mar Cantábrico en comparación con los microcosmos del Mar Mediterráneo, dado que en el Mar Cantábrico las bacterias y los protozoos crecieron más rápido, alcanzaron densidades más altas, y la ratio protozoo : bacteria, utilizada como un indicador de presión por depredación, también fue mayor que en el Mar Mediterráneo ( $4,4 \times 10^{-3}$  vs.  $1,8 \times 10^{-3}$ ). Sin embargo, cuando las dos comunidades estuvieron en presencia de las materias orgánicas disueltas alteradas, la

comunidad del Mar Cantábrico fue capaz de consumir la fracción proteica de la materia orgánica disuelta fluorescente tanto en los controles como en los tratamientos con MOD-Prot, mientras que en el caso de la comunidad del Mar Mediterráneo sólo se observó una acumulación de compuestos orgánicos. Por tanto, se debe considerar que la acumulación es el resultado de un desequilibrio entre la liberación y el consumo, porque una fracción de la materia orgánica que se está constantemente liberando se consume de forma continua por la comunidad bacteriana. Como los diferentes grupos bacterianos presentan diferentes estrategias de consumo de carbono (por ejemplo, Alonso Sáez & Gasol, 2007), la composición de la comunidad bacteriana resulta ser un factor clave en la regulación de la producción y la dinámica de la materia orgánica disuelta refractaria.

En resumen, este estudio muestra que el crecimiento bacteriano, pero particularmente el posterior crecimiento y acción depredadora de los protozoos, provoca alteraciones en la materia orgánica disuelta marina, lo que a su vez desencadena cambios metabólicos importantes en la comunidad bacteriana. A corto plazo, esta respuesta metabólica consiste en un aumento de la actividad enzimática extracelular que implica un coste energético, un aumento en el consumo de carbono no relacionado con la producción bacteriana y, como consecuencia final, una disminución notable en la eficiencia de crecimiento bacteriano. La composición de la comunidad bacteriana influye en la velocidad y extensión de estos procesos.



## CAPÍTULO 3:

La eficiencia de crecimiento bacteriana refleja la adaptación del bacterioplancton marino a cambios ambientales

Publicación:

Baña, Z., Abad, N., Uranga, A., Azúa, I., Artolozaga, I., Unanue, M., Iriberrí, J., Arrieta, J. M. & Ayo, B. (2020) Recurrent seasonal changes in bacterial growth efficiency, metabolism and community composition in coastal waters. *Environmental Microbiology*, **22**(1): 369–380.





## Resumen

La respuesta microbiana a los cambios ambientales en las aguas costeras del mar Cantábrico oriental se exploró analizando a lo largo de cuatro años un amplio conjunto de variables ambientales, junto con el metabolismo y la composición de las comunidades bacterianas. Se observó un ciclo estacional recurrente, consistente en dos situaciones estables, caracterizadas por una baja actividad metabólica bacteriana (invierno) de octubre a marzo, y una alta actividad metabólica bacteriana (verano) de mayo a agosto. Estas dos situaciones se enlazaron a través de cortos periodos de transición en abril y septiembre. Los grupos filogenéticos *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron dominantes durante el invierno y el verano, respectivamente, y su alternancia fue impulsada principalmente por la floración del fitoplancton eucariota antes de la transición de abril y la floración del fitoplancton procariota antes de la transición de septiembre. La eficiencia de crecimiento bacteriana se mantuvo alta y estable durante los periodos de invierno y verano, pero fue baja durante los dos periodos de transición. Nuestros resultados sugieren que la eficiencia de crecimiento bacteriana debe considerarse una propiedad muy elástica que refleja diferentes etapas en la adaptación de la composición de la comunidad bacteriana a los cambios ambientales que ocurren a lo largo del ciclo estacional en este ecosistema costero.

## Introducción

La eficiencia de crecimiento bacteriana indica la fracción del carbono consumido que las bacterias destinan a la producción de biomasa. Este rasgo fisiológico es funcionalmente relevante, porque refleja directamente el metabolismo de la comunidad bacteriana. Además, la eficiencia de crecimiento bacteriana también ofrece información significativa sobre la influencia del bacterioplancton en la dinámica biogeoquímica de los sistemas acuáticos: las bacterias pueden actuar como un sumidero, cuando mineralizan la materia orgánica disuelta, o como intermediario dentro de la red trófica, cuando transfieren parte de la materia orgánica disuelta del sistema a los niveles tróficos superiores (Sherr & Sherr, 1996; del Giorgio & Cole, 1998; Carlson *et al.*, 2007). La importancia de este parámetro se evidencia al constatar los muchos estudios centrados en la relación de la eficiencia de crecimiento bacteriana con diversos factores físicos, químicos y biológicos, como son la temperatura (Rivkin & Legendre, 2001; Apple *et al.*, 2006), la irradiación (Cottrell *et al.*, 2008; Hörtnagl *et al.*, 2011), la disponibilidad de nutrientes (Biddanda *et al.*, 2001; Lemée *et al.*, 2002; Pradeep Ram *et al.*, 2003), la concentración y la calidad de la materia orgánica disuelta (Eiler *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2005; Apple & del Giorgio, 2007; Lee *et al.* 2009), la estructura y la composición de la comunidad bacteriana (Comte & del Giorgio, 2011; Warkentin *et al.*, 2011) o la mortalidad bacteriana debida a la depredación y/o a la lisis viral (Middelboe *et al.*, 1996 ; ver **Capítulo 2**).

Sin embargo, los resultados obtenidos a la hora de determinar qué factores controlan la eficiencia de crecimiento bacteriana y cómo se produce este control han sido a menudo contradictorios. Estos resultados discordantes pueden deberse a diferencias importantes en la estrategia experimental, así como en la metodología utilizada. A menudo se ha determinado la influencia de un solo factor en la eficiencia de crecimiento bacteriana a partir de manipulaciones experimentales en micro- o mesocosmos (del Giorgio & Cole, 1998 y sus referencias; Eiler *et al.*, 2003; Eichinger *et al.*, 2010), en los que la alteración artificial de algunas propiedades relevantes de la comunidad bacteriana como son

la estructura, la composición y el metabolismo, puede probablemente sesgar las deducciones finales (Bier *et al.*, 2015). Por otra parte, al analizar la variabilidad natural de la eficiencia de crecimiento bacteriana, la mayoría de los estudios abordan la variabilidad espacial, mientras que el análisis de la sucesión temporal está menos estudiado (Lemée *et al.* 2002; Reinthaler & Herndl, 2005; Eichinger *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Bonilla-Fidji *et al.* 2010). Además, la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana se basa en la producción de biomasa bacteriana y la respiración bacteriana, cuyas mediciones requieren el uso de factores de conversión, que muestran una gran y controvertida variabilidad (del Giorgio & Cole, 2000; Sherry *et al.*, 2002; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b; del Giorgio *et al.*, 2011), tal y como se indica en el **Capítulo 1**. Por último, las mediciones de respiración bacteriana con los métodos tradicionales requieren el uso de incubaciones largas que a menudo superan las 48 h, lo que puede causar un sesgo adicional debido a la alteración de la comunidad bacteriana (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002).

Como la actividad metabólica de los diferentes miembros de la comunidad es diferente (Alonso-Sáez & Gasol, 2007), la composición de la comunidad bacteriana y sus variaciones a lo largo del ciclo estacional pueden ser relevantes para explicar los cambios metabólicos en el sistema. De hecho, se han detectado vínculos entre la composición y la función de los principales grupos filogenéticos de la comunidad bacteriana (Findlay *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2006; Langenheder *et al.*, 2006; Comte & del Giorgio, 2009). Aun así, Comte & del Giorgio (2010) sugirieron que la conexión entre la composición bacteriana y la función de la comunidad solo puede detectarse en ciertos momentos en el espacio y el tiempo y en ciertas condiciones ambientales. Debido a su gran plasticidad metabólica (Meyer *et al.*, 2004; Mou *et al.*, 2008), el metabolismo bacteriano se puede adaptar a pequeños cambios ambientales, sin que se generen cambios significativos en la composición o función a nivel comunitario. Sin embargo, cuando los factores ambientales o los impulsores cambian y superan la capacidad de adaptación de los diferentes miembros de la comunidad

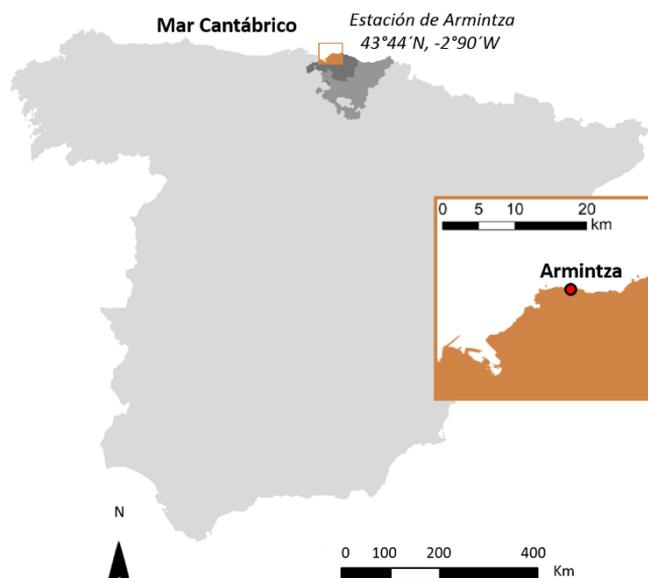
microbiana se pueden esperar cambios en la composición de la comunidad bacteriana, lo que resulta en un acoplamiento más estrecho entre la composición y la función de la comunidad (Comte & del Giorgio, 2010 y 2011). A este respecto, el Golfo de Bizkaia muestra un marcado ciclo estacional, resultado principalmente de la estratificación y mezcla de las aguas superficiales a lo largo del año (Serret *et al.*, 1999). La estratificación comienza alrededor de marzo-abril con el calentamiento de las aguas superficiales, lo que genera en una pycnoclina estival estable que se extiende hasta septiembre-octubre, cuando la temperatura de la superficie comienza a disminuir y se produce una mezcla con aguas más profundas (Serret *et al.*, 1999). Por lo tanto, en la zona marina estudiada, es razonable esperar cambios importantes en la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo del año en respuesta a estas perturbaciones ambientales cíclicas.

El propósito de este estudio fue detectar la variabilidad de la eficiencia de crecimiento bacteriana e identificar aquellos factores que pueden afectarla. Para cumplir este objetivo general, se analizó la variabilidad anual de la eficiencia de crecimiento bacteriana, el metabolismo bacteriano, la composición de la comunidad bacteriana y un conjunto de variables ambientales durante cuatro años en las aguas costeras del Cantábrico oriental, con el fin de detectar si las variaciones en la eficiencia de crecimiento bacteriana estaban acopladas a cambios en la estructura de la comunidad derivados de cambios ambientales, y por tanto, podrían reflejar el nivel de adaptación de la comunidad bacteriana a su entorno. Para evitar artefactos derivados del confinamiento de la muestra y obtener estimaciones fiables de la eficiencia de crecimiento bacteriana, se estudió la eficiencia de crecimiento bacteriana a partir de estimaciones de producción y respiración bacterianas para las que se utilizaron incubaciones cortas inferiores a 6 horas.

## Material y métodos

### *Estrategia de muestreo*

Se recogió agua de mar superficial (0,5 m) en la estación de muestreo situada en Armintza (43°44'N, 2°90'W) (Figura 3.1), ubicada en la costa de Bizkaia, en el Mar Cantábrico Oriental (sureste del Golfo de Bizkaia). Se tomaron un total de 31 muestras desde marzo de 2008 hasta diciembre de 2012. Las muestras de agua de mar se prefiltraron a través de una malla de nylon de 100  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para eliminar el micro- y mesozooplancton, y se transportaron en hielo y en oscuridad al laboratorio antes de 2 h. La temperatura y la salinidad se midieron *in situ* utilizando un salinómetro de conductividad (VWR EC300).



**Figura 3.1.** Localización de la estación de muestreo situada en Armintza (Bizkaia).

### *Densidad microbiana*

Las densidades de las cianobacterias marinas *Synechococcus* y *Prochlorococcus* se determinaron mediante citometría de flujo (Marie *et al.*, 1999). Las muestras sin fijar se procesaron a alta velocidad (aprox. 100  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) en un citómetro de flujo FACScalibur Becton-Dickinson equipado con un láser azul que emite a 488 nm. Se

distinguieron diferentes poblaciones según la intensidad de la luz dispersada lateralmente y la emisión de fluorescencia en naranja (filtro BP 585/42 nm) y roja (filtro LP 670 nm) vinculados a la presencia de células que contienen ficoeritrina y clorofila, respectivamente.

La densidad de bacterias, protozoos y partículas víricas se determinó mediante microscopía de epifluorescencia Nikon Optiphot (Porter & Feig, 1980; Noble & Fuhrman, 1998). Las muestras se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico en el caso de bacterias y virus y con formalina tamponada con tetraborato sódico en el caso de los nanoflagelados (concentración final 2% v/v). Las muestras se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta el análisis, que se realizó siempre en las 24 h siguientes a la fijación. Para realizar los recuentos, se tomaron submuestras de volumen conocido (1 ml para el recuento de bacterias y 4 ml para el recuento de nanoflagelados), se tiñeron con DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole) (concentración final 2 µg ml<sup>-1</sup>) durante 10 min y se filtraron a través de filtros negros de policarbonato de 0,22 µm y 0,8 µm de tamaño de poro (Whatman) para el recuento de bacterias y nanoflagelados, respectivamente. Para el recuento de partículas víricas, se filtraron volúmenes de 1 ml de submuestras a través de filtros Acrodisc de 0,02 µm de tamaño de poro (Whatman), y se colocaron en una gota de 0,2% de SYBR Green I, se tiñeron durante 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada filtrada por 0,02 µm. Finalmente, todos los filtros se montaron en portaobjetos de vidrio, se colocaron bajo el microscopio de epifluorescencia y se establecieron campos microscópicos seleccionados al azar por filtro para los recuentos de las tres comunidades microbianas. Se contaron un mínimo de 20 campos para estimar la densidad de bacterias y virus, y un mínimo de 100 campos para estimar la densidad de nanoflagelados.

#### *Composición de la comunidad bacteriana*

La composición de la comunidad bacteriana se determinó mediante la técnica CARD-FISH descrita por Pernthaler *et al.* (2002), utilizando sondas de oligonucleótidos marcados con HRP (horseradish peroxidase) diseñadas para

detectar específicamente organismos pertenecientes al dominio *Bacteria* (mezcla de EUB I (Amann *et al.*, 1990) y EUB II-III (Daims *et al.*, 1999)) y cuatro de sus principales grupos filogenéticos: ALF968 (Neef, 1997) para las *Alfaproteobacteria*; BET42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Betaproteobacteria*; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) para las *Gammaproteobacteria*; y CF319a (Manz *et al.*, 1996) para los *Bacteroidetes*. La sonda antisentido para *Eubacteria* NON338 (Wallner *et al.*, 1993) se utilizó como control negativo. Todas las hibridaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 35°C, seguidas de 15 min de amplificación con tiramida-Alexa488. La concentración de la formamida en el tampón de hibridación fue del 55%, excepto para las sondas ALF968 y NON338, que fueron de 45% y 20% respectivamente. Las secciones de los filtros en los que se llevó a cabo la hibridación fueron teñidas con DAPI para posteriormente realizar la enumeración de bacterias mediante microscopía de epifluorescencia y calcular el porcentaje de hibridación de cada sonda con respecto al total de bacterias.

#### *Metabolismo bacteriano y actividades enzimáticas extracelulares.*

Las muestras de agua de mar se filtraron suavemente mediante una bomba peristáltica a través de filtros de fibra de vidrio de 0,9 µm de tamaño de poro (Millipore, AP2504700), para separar las bacterias del resto de la comunidad planctónica. La eficiencia de recuperación fue del 87,3% ± 9,9. Inmediatamente después de la filtración, la muestra se dividió en submuestras para estimar la respiración bacteriana, la producción bacteriana y las actividades enzimáticas extracelulares.

Para estimar la respiración bacteriana, las 31 muestras de agua de mar se colocaron por duplicado en cámaras de vidrio de 4 ml diseñadas para evitar el intercambio de oxígeno con el exterior. La disminución de la concentración de oxígeno dentro de las cámaras se monitorizó utilizando un sistema de micro-respiración y un microsensor de oxígeno (OX-MR) (Unisense), que permite mediciones continuas (Briand *et al.*, 2004). Las cámaras de vidrio se introdujeron en un baño de temperatura controlada para evitar cambios en la determinación de oxígeno debido a los cambios de temperatura. La respiración bacteriana se

determinó a partir de la pendiente negativa de la regresión entre la concentración de oxígeno y el tiempo durante incubaciones inferiores a 6 h. El oxígeno respirado se transformó en velocidad de respiración de carbono utilizando un cociente respiratorio de 1 (del Giorgio *et al.*, 2006).

La producción bacteriana se estimó a partir de la velocidad de síntesis de proteínas, utilizando el método de incorporación de leucina tritiada (Kirchman *et al.*, 1985). Se adicionó el isótopo ( $[^3\text{H}]$ -Leucina) a concentración saturante (concentración final 40 nM) a tres submuestras de 5 ml, y se incubaron a temperatura *in situ* y en oscuridad durante 1 h. Paralelamente se repitió el mismo procedimiento con 2 blancos de 5 ml, previamente fijados con ácido tricloroacético (ATC) (concentración final 50%). La incubación se detuvo mediante la adición de ATC (concentración final 5%) y la introducción de las muestras en hielo durante 5 min. A continuación, las muestras se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa (Sartorius) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se lavaron cinco veces con 5 ml de ATC al 5%. Los filtros se dejaron secar al aire, se introdujeron en viales de centelleo y se mezclaron con 500  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo durante 20 min. Finalmente, se añadieron 4 ml de cóctel de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR, utilizando estándares externos para la corrección de la extinción. La producción de biomasa bacteriana se estimó usando un factor de conversión teórico de 1,55 kg C mol leu<sup>-1</sup> que asume que no hay dilución interna del isótopo (Simon & Azam, 1989).

La respiración bacteriana y la producción bacteriana de la comunidad total se determinaron a temperatura *in situ* y se calcularon considerando la proporción de bacterias que se retuvieron en el filtro de 0,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y su biomasa. Tanto la respiración bacteriana como la producción bacteriana se midieron en las mismas escalas de tiempo, utilizando periodos de incubación inferiores a 6 h.

La demanda de carbono bacteriana (DCB) y la eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$DCB = RB + PB$$

$$ECB = \frac{PB}{PB + RB} * 100$$

donde RB corresponde a la respiración bacteriana y PB a la producción bacteriana.

Las actividades enzimáticas extracelulares  $\alpha$ -glucosidasa ( $\alpha$ -Glu),  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -Glu) y leucina-aminopeptidasa (LAP) fueron estimadas mediante fluorimetría de acuerdo con el método de Hoppe (1983). Se prepararon en metilcelosolve las disoluciones apropiadas de los análogos de sustratos fluorogénicos (4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido (MUF- $\alpha$ -Glu), 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucósido (MUF- $\beta$ -Glu), y L-leucina-7-amido-4-metil-cumarina (MCA-Leu)), y se añadieron a tres submuestras de 3 ml en concentración saturante para cada actividad (250  $\mu$ M para los sustratos MUF- $\alpha$ -GLU y MUF- $\beta$ -GLU y 350  $\mu$ M para el sustrato MCA-Leu). Las concentraciones saturantes de los tres sustratos se determinaron en experimentos previos realizados con un rango de concentraciones de entre 0 y 1,5  $\mu$ M, y se determinaron en función de la velocidad máxima obtenida para cada enzima. Las muestras se incubaron a temperatura *in situ* durante incubaciones inferiores a 6 h. La hidrólisis de los sustratos se detectó utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B a longitudes de onda de excitación/emisión de 342 nm / 453 nm para las glucosidasas y de 360 nm / 445 nm para la actividad LAP. El incremento lineal en la fluorescencia se transformó en actividad utilizando una recta estándar establecida para cada muestra con diferentes concentraciones de los fluorocromos MUF (0 – 0,5  $\mu$ M) y MCA (0 – 1  $\mu$ M).

La actividad específica de la respiración bacteriana, la producción bacteriana y de las actividades enzimáticas extracelulares se calcularon dividiendo el valor de cada variable metabólica por la densidad bacteriana de esa muestra.

### *Factores medioambientales*

La concentración de clorofila *a* se determinó fotométricamente a partir del extracto acetónico de plancton retenido en los filtros de acuerdo con los métodos estándar descritos por APHA-AWWA-WEF (1998). Se filtraron tres réplicas de 1 l de agua de mar a través de filtros GF/F (Whatman), los filtros se introdujeron en tubos de vidrio a los que se añadieron 5 ml de acetona (90% v/v) para la extracción de la clorofila *a* en oscuridad y a 4°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, los tubos se agitaron vigorosamente y se alargó la extracción 30 min más a 4°C. Como control se utilizó un filtro GF/F (Whatman) sin muestra que fue procesado de la misma forma que el resto de filtros. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min y se recogieron los sobrenadantes con los extractos. Se determinó la absorbancia a cuatro longitudes de onda (750 nm, 664 nm, 647 nm y 630 nm) mediante un espectrofotómetro (Implen), y utilizando acetona al 90% v/v como blanco. Se corrigió la absorbancia a 664 nm, 647 nm y a 630 nm restándoles la absorbancia a 750 nm, indicadora de turbidez debido a partículas en suspensión. La concentración de clorofila *a* en los cuatro extractos se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$[Chl a] = (11,85 Abs_{664} - 1,54 Abs_{647} - 0,08 Abs_{630}) * \frac{v}{V}$$

donde  $Chl a$  es clorofila *a* ( $\mu g l^{-1}$ ),  $v$  es el volumen extracto acetona (ml) y  $V$  el volumen filtrado de la muestra (l). El valor de concentración de clorofila *a* obtenido en el control se restó a la media de las tres réplicas.

Para la determinación de los nutrientes inorgánicos, se recogieron muestras de 500 ml de agua de mar y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su análisis. Se analizaron los nitratos, fosfatos y silicatos mediante un autoanalizador BRAN-LUEBBE AAIII siguiendo los métodos descritos en Grasshoff *et al.* (1983) para el análisis automático de nutrientes en flujo segmentado. La concentración de nitratos se determinó mediante la reacción colorimétrica de Griess-Ilosvay (Griess, 1858), después de la reducción a nitrito utilizando una columna de

reducción de Cd-Cu; las concentraciones de fosfatos y silicatos se determinaron por el método del azul de molibdeno.

El carbono orgánico disuelto se determinó de acuerdo con el método de Benner y Strom (1993). Las muestras se filtraron utilizando un sistema de filtración enjuagado con ácido a través de filtros GF / C (Whatman) previamente quemados (a 450°C). Después de descartar una primera fracción del filtrado, se tomaron muestras por triplicado de 10 - 15 ml de agua de mar, en ampollas de vidrio quemadas y se acidificaron a pH ~ 2 con ácido ortofosfórico antes de ser selladas térmicamente y almacenadas en la oscuridad a 4°C hasta el análisis. El carbono orgánico disuelto se midió en un analizador de carbono orgánico Shimadzu TOC-CVS, con una precisión de  $\pm 0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ . El equipo se estandarizó diariamente con un estándar de ftalato de hidrógeno y potasio. La concentración del carbono orgánico disuelto se determinó restándole el área del pico del blanco preparado con agua Milli-Q (Merck) al área del pico promedio de la muestra y dividiéndolo por la pendiente de la curva estándar.

La materia orgánica disuelta fluorescente se determinó según lo descrito por Nieto-Cid *et al.* (2006). Las mediciones individuales se llevaron a cabo con un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B en una célula de fluorescencia de cuarzo de 1 cm no fluorescente. El ancho de banda para las longitudes de onda de excitación y emisión fue de 10 nm y la velocidad de exploración fue de 250 nm min<sup>-1</sup>. Las longitudes de onda de excitación / emisión utilizadas fueron las establecidas por Coble (1996): 280 nm / 350 nm (pico T) como indicador de sustancias proteicas, y 340 nm / 440 nm (pico C) y 320 nm / 410 nm (pico-M) como indicadores de sustancias húmicas. Las medidas de fluorescencia se transformaron en unidades de sulfato de quinina (USQ), utilizando como curvas estándar sulfato de quinina dihidrato disuelto en 0,05 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> l<sup>-1</sup>, a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm / 440 nm, y donde 1 USQ fue equivalente a la emisión de fluorescencia de 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ . La fluorescencia del blanco, generado con agua Milli-Q (Merck) se restó a todas las muestras.

### *Análisis estadísticos*

Para identificar diferencias significativas entre las variables entre distintos periodos ambientales, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Las correlaciones entre las variables se determinaron mediante los coeficientes de correlación rho de Spearman. Se realizaron regresiones lineales simples para obtener la velocidad de consumo de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo de incubación ( $p < 0,05$ ). Estos análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics versión 20 para Windows.

Para organizar la variabilidad de la composición de la comunidad bacteriana lo largo del año en función de un conjunto de variables explicativas, se utilizó un análisis de redundancia (RDA) utilizando la función *decostand* como método de estandarización antes del análisis (paquete *vegan* R; Oksanen *et al.*, 2015). Para evaluar la tendencia estacional basada en la composición y el metabolismo bacteriano, se realizó una agrupación jerárquica (paquete *pvclust* R; Suzuki & Shimodaira, 2006). Los meses relacionados se identificaron mediante un dendrograma aplicando el método de Ward con disimilitud de Bray-Curtis. Tanto la RDA como la agrupación jerárquica se ejecutaron en la versión 3.1.0 de R (Development core team R, 2016). La significancia de todos los análisis estadísticos fue aceptada en  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### *Patrón estacional*

La estación costera de Armintza en el mar Cantábrico oriental se muestreó en 11 ocasiones desde marzo de 2008 hasta junio de 2009, y 20 veces desde febrero de 2011 hasta diciembre de 2012 (un total de 31 muestras) (Figura 3.2).

Los valores medios mensuales obtenidos para todas las variables analizadas se presentan en la Tabla 3.1. La tendencia estacional se detectó a partir de un agrupamiento jerárquico basado en tres descriptores bacterianos generales: la demanda de carbono bacteriana, que indica la cantidad total de carbono procesado por las bacterias; la eficiencia de crecimiento bacteriana, que muestra

la eficiencia de la comunidad bacteriana en la transferencia de carbono a niveles tróficos superiores; y la composición de la comunidad bacteriana, determinada como la abundancia de 4 grupos filogenéticos principales detectados por hibridación *in situ* de sondas fluorescentes (CARD-FISH).

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
2008			●	●	●	●	●		●		●	
2009		●		●	●	●						
2011		●	●	●		●	●	●	●	●	●	
2012	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●

**Figura 3.2.** Resumen de los meses en los que se recolectó muestra en la estación de Armintza durante los años 2008, 2009, 2011 y 2012. Se recogieron un total de 31 muestras.

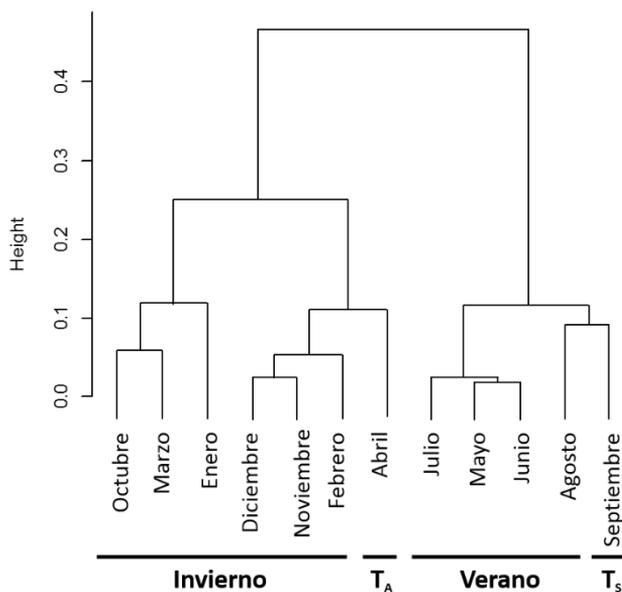
Se observó que las muestras, identificadas por meses, se agruparon en dos situaciones estacionales (de mayo a septiembre y de octubre a abril) (Figura 3.3). Sin embargo, las muestras correspondientes al último mes de cada grupo, septiembre y abril, mostraron marcadas divergencias con los otros miembros de su grupo, tales como valores muy bajos de eficiencia de crecimiento y producción bacteriana, y una codominancia de *Bacteroidetes* y *Alfaproteobacteria* en su composición. Estas diferencias sugirieron que estas muestras representaban situaciones intermedias que merecían un análisis por separado. Así, el ciclo estacional estuvo representado por dos situaciones alternas largas: verano (mayo a agosto), caracterizada por una alta actividad metabólica y dominada por *Bacteroidetes* (12 muestras), e invierno (octubre a marzo), caracterizada por una baja actividad metabólica y dominada por *Alfaproteobacteria* (13 muestras). El invierno y el verano estuvieron separados por dos cortos periodos de transición, T<sub>A</sub> en abril (4 muestras) y T<sub>S</sub> en septiembre (2 muestras).

**Tabla 3.1.** Valores medios mensuales  $\pm$  errores estándar de las variables analizadas. Los meses de transición, abril y septiembre, están señalados en fondo gris. MODF<sub>Húmico</sub>: material húmico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot</sub>: material proteico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot:Húmico</sub>: Ratio entre MODF<sub>Prot</sub> y MODF<sub>Húmico</sub>;  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu: Ratio entre las actividades enzimáticas extracelulares  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasa. n.m.: no medido. n.d.: no detectable.

		Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
<b>Número de muestras</b>		1	3	3	4	3	4	3	2	2	2	3	1
<b>Temperatura superficial</b>	°C	13,3	12,0 $\pm 0,6$	13,0 $\pm 0,5$	13,6 $\pm 0,3$	15,9 $\pm 0,3$	19,0 $\pm 0,6$	20,3 $\pm 0,5$	21,0 $\pm 0,3$	21,0 $\pm 0,1$	18,3 $\pm 1,2$	15,7 $\pm 0,3$	13,3
<b>Clorofila <math>\alpha</math></b>	$\mu\text{g l}^{-1}$	0,50	1,19 $\pm 0,51$	1,51 $\pm 0,51$	1,10 $\pm 0,18$	0,46 $\pm 0,15$	0,25 $\pm 0,02$	0,22 $\pm 0,02$	0,21 $\pm 0,02$	0,23 $\pm 0,04$	0,29 $\pm 0,00$	0,40 $\pm 0,04$	0,46
<b>Carbono orgánico disuelto</b>	$\mu\text{M}$	76	214 $\pm 132$	113 $\pm 31$	251 $\pm 67$	128 $\pm 22$	147 $\pm 8$	156 $\pm 61$	155 $\pm 0$	166	196 $\pm 58$	233 $\pm 91$	107
<b>Concentración de nitratos</b>	$\mu\text{M}$	5,05	5,61 $\pm 1,07$	4,08 $\pm 2,43$	1,42 $\pm 1,02$	1,05 $\pm 0,00$	1,03 $\pm 0,58$	0,38 $\pm 0,03$	0,70 $\pm 0,30$	0,65	1,10 $\pm 0,35$	1,40 $\pm 1,00$	4,75
<b>Concentración de fosfatos</b>	$\mu\text{M}$	0,20	0,32 $\pm 0,06$	0,29 $\pm 0,11$	0,16 $\pm 0,09$	0,25 $\pm 0,00$	0,19 $\pm 0,01$	0,27 $\pm 0,08$	0,12 $\pm 0,04$	0,50	0,14 $\pm 0,04$	0,14 $\pm 0,06$	n.m.
<b>Concentración de silicatos</b>	$\mu\text{M}$	3,95	3,73 $\pm 0,03$	2,81 $\pm 0,81$	1,22 $\pm 0,42$	4,25 $\pm 0,00$	1,58 $\pm 0,08$	1,85 $\pm 0,25$	4,03 $\pm 1,58$	5,25	3,65 $\pm 2,10$	1,79 $\pm 0,61$	9,00
<b><i>Synechococcus</i></b>	$\times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$	2,2	3,5 $\pm 2,9$	1,5 $\pm 0,3$	2,1 $\pm 1,9$	2,9 $\pm 0,0$	9,8 $\pm 5,4$	81,6 $\pm 57,4$	43,8 $\pm 13,8$	14,2 $\pm 0,0$	42,9 $\pm 20,0$	11,0 $\pm 0,2$	6,4

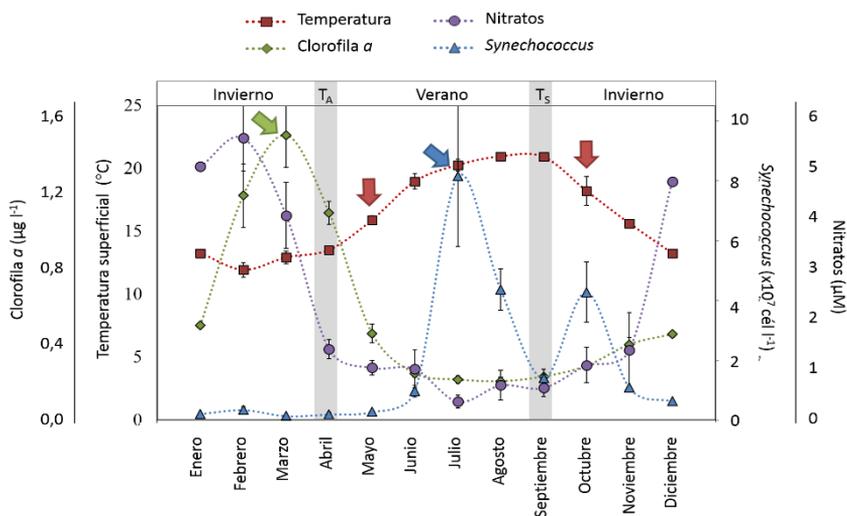
<i>Prochlorococcus</i>	x10 <sup>6</sup> cél l <sup>-1</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7 ± 0,7	19,3 ± 0,0	36,1 ± 5,3	21,7 ± 8,4	2,1
MODF <sub>Humic</sub>	USQ	3,43 ± 0,19	3,39 ± 0,53	3,80 ± 0,52	4,10 ± 0,35	3,30 ± 0,25	2,98 ± 0,09	1,90 ± 0,34	2,33 ± 0,62	3,14 ± 0,97	2,49 ± 1,42	4,46 ± 1,42	4,20
MODF <sub>Prot</sub>	USQ	1,57 ± 0,16	1,98 ± 0,23	2,18 ± 0,24	2,69 ± 0,35	2,34 ± 0,49	2,89 ± 0,10	2,29 ± 0,64	2,98 ± 0,87	3,14 ± 0,35	2,93 ± 0,73	3,31 ± 0,73	1,83
MODF <sub>Prot:Humic</sub>		0,46 ± 0,08	0,59 ± 0,11	0,60 ± 0,12	0,69 ± 0,08	0,71 ± 0,21	0,99 ± 0,11	1,21 ± 0,09	1,26 ± 0,09	0,98 ± 0,09	1,33 ± 0,38	0,66 ± 0,17	0,44
Densidad bacteriana	x10 <sup>9</sup> cél l <sup>-1</sup>	0,98 ± 0,38	0,91 ± 0,47	1,26 ± 0,09	0,74 ± 0,55	1,06 ± 0,18	1,11 ± 0,26	1,52 ± 0,04	0,97 ± 0,04	1,56 ± 0,22	0,99 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,71
Densidad nanoflagelados heterótrofos	x10 <sup>6</sup> cél l <sup>-1</sup>	0,28 ± 0,30	0,82 ± 0,11	0,57 ± 0,06	0,70 ± 0,13	0,57 ± 0,74	2,02 ± 1,17	2,03 ± 0,12	0,51 ± 0,12	1,33 ± 0,48	0,85 ± 0,07	0,37 ± 0,09	0,28
Nanoflagelados : Bacterias		0,29 ± 1,63	2,07 ± 0,40	0,73 ± 0,17	1,06 ± 0,34	0,88 ± 0,80	2,03 ± 0,54	1,62 ± 0,40	0,52 ± 0,00	0,54 ± 0,27	0,92 ± 0,09	0,42 ± 0,09	0,39
Partículas víricas	x10 <sup>10</sup> cél l <sup>-1</sup>	n.m.	0,49 ± 0,47	0,85 ± 0,49	1,27 ± 0,48	1,26 ± 0,31	1,27 ± 0,19	n.m.	3,70	3,85 ± 1,07	2,20 ± 1,07	1,61 ± 0,40	2,00
Respiración bacteriana	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	30,8 ± 15,6	69,3 ± 14,8	59,1 ± 3,1	79,2 ± 15,7	101,8 ± 13,9	92,2 ± 6,6	71,3 ± 6,8	110,9 ± 6,8	51,6 ± 12,5	60,0 ± 5,5	64,0 ± 3,6	49,1
Producción bacteriana	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	14,6 ± 4,5	25,2 ± 5,6	31,3 ± 2,4	11,1 ± 4,4	52,5 ± 11,5	59,7 ± 2,4	43,6 ± 5,7	43,0 ± 5,7	10,7 ± 3,3	24,8 ± 0,6	28,4 ± 5,5	19,9

<b>Eficiencia de crecimiento bacteriana</b>	%	<b>32,1</b>	<b>27,7</b> ± 6,0	<b>35,4</b> ± 2,8	<b>12,0</b> ± 2,3	<b>34,8</b> ± 4,9	<b>39,4</b> ± 3,6	<b>38,2</b> ± 3,4	<b>28,0</b> ± 3,9	<b>16,9</b> ± 0,9	<b>29,4</b> ± 2,5	<b>30,4</b> ± 5,1	<b>28,8</b>
<b>Demanda de carbono bacteriana</b>	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<b>45,4</b>	<b>94,5</b> ± 15,6	<b>90,4</b> ± 19,7	<b>90,3</b> ± 4,9	<b>154,3</b> ± 15,0	<b>151,8</b> ± 23,2	<b>114,9</b> ± 4,9	<b>153,9</b> ± 1,1	<b>62,3</b> ± 15,8	<b>84,8</b> ± 4,8	<b>92,4</b> ± 5,2	<b>69,0</b>
<b>Leucina Aminopeptidasa</b>	x10 <sup>3</sup> nmol MCA l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<b>1,80</b>	<b>1,77</b> ± 0,59	<b>2,64</b> ± 0,14	<b>2,24</b> ± 0,44	<b>9,12</b> ± 3,8	<b>4,34</b> ± 0,97	<b>5,59</b> ± 3,03	<b>1,93</b> ± 0,35	<b>2,42</b> ± 0,38	<b>1,83</b> ± 0,24	<b>1,37</b> ± 0,54	<b>1,58</b>
<b>α-Glucosidasa</b>	nmol MUF l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<b>14,7</b>	<b>46,5</b> ± 31,7	<b>42,9</b> ± 22,3	<b>62,2</b> ± 30,1	<b>63,6</b> ± 29,2	<b>49,1</b> ± 17,8	<b>16,1</b>	<b>9,4</b> ± 0,7	<b>113,4</b> ± 85,4	<b>9,7</b> ± 8,4	<b>18,0</b> ± 4,3	<b>18,6</b>
<b>β-Glucosidasa</b>	nmol MUF l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<b>12,7</b>	<b>48,6</b> ± 28,6	<b>50,9</b> ± 12,9	<b>119,6</b> ± 25,3	<b>116,2</b> ± 48,9	<b>90,2</b> ± 28,5	<b>27,1</b>	<b>21,2</b> ± 3,9	<b>65,8</b> ± 52,9	<b>22,3</b> ± 16,6	<b>19,8</b> ± 7,7	<b>12,5</b>
<b>α-Glu / β-Glu</b>		<b>1,16</b>	<b>0,66</b> ± 0,08	<b>0,73</b> ± 0,23	<b>0,70</b> ± 0,15	<b>0,66</b> ± 0,21	<b>0,48</b> ± 0,10	<b>0,59</b>	<b>0,46</b> ± 0,12	<b>1,93</b> ± 0,25	<b>0,35</b> ± 0,12	<b>0,60</b> ± 0,24	<b>1,49</b>
<b><i>Alfaproteobacteria</i></b>	%	<b>46,3</b>	<b>41,5</b> ± 1,7	<b>37,5</b> ± 1,1	<b>34,5</b> ± 2,3	<b>27,7</b> ± 2,8	<b>23,7</b> ± 2,3	<b>28,3</b> ± 4,3	<b>26,3</b> ± 1,4	<b>27,3</b>	<b>40,6</b> ± 0,2	<b>41,0</b> ± 0,3	<b>39,9</b>
<b><i>Bacteroidetes</i></b>	%	<b>21,9</b>	<b>23,0</b> ± 2,9	<b>26,4</b> ± 4,9	<b>31,8</b> ± 1,4	<b>39,6</b> ± 2,4	<b>39,0</b> ± 1,4	<b>34,8</b> ± 4,5	<b>38,6</b> ± 5,6	<b>30,8</b>	<b>22,3</b> ± 0,8	<b>21,7</b> ± 2,3	<b>23,4</b>
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	%	<b>15,8</b>	<b>23,0</b> ± 5,4	<b>21,2</b> ± 2,0	<b>20,2</b> ± 1,4	<b>17,5</b> ± 3,3	<b>21,2</b> ± 2,0	<b>23,0</b> ± 1,7	<b>22,3</b> ± 3,2	<b>23,2</b>	<b>24,1</b> ± 0,4	<b>21,5</b> ± 0,6	<b>23,8</b>
<b><i>Betaproteobacteria</i></b>	%	<b>7,1</b>	<b>6,0</b> ± 0,8	<b>8,6</b> ± 2,3	<b>6,5</b> ± 0,6	<b>7,5</b> ± 1,8	<b>8,4</b> ± 0,3	<b>7,2</b> ± 1,6	<b>5,9</b> ± 0,9	<b>8,6</b>	<b>6,7</b> ± 2,0	<b>8,6</b> ± 2,3	<b>6,3</b>
<b>Otras Eubacteria</b>	%	<b>8,9</b>	<b>6,6</b> ± 0,2	<b>6,2</b> ± 0,8	<b>7,0</b> ± 0,6	<b>7,7</b> ± 0,8	<b>7,6</b> ± 0,7	<b>6,7</b> ± 0,1	<b>6,8</b> ± 0,3	<b>10,1</b>	<b>6,3</b> ± 0,6	<b>7,3</b> ± 0,7	<b>6,6</b>



**Figura 3.3.** Agrupación jerárquica de las muestras a lo largo del ciclo anual, basada en la demanda de carbono bacteriana, la eficiencia del crecimiento bacteriana y la composición de la comunidad bacteriana estimada entre 2008 y 2012. Los meses correspondientes a los periodos de verano, de invierno y a los periodos de transición (T<sub>A</sub> y T<sub>S</sub>) se muestran delimitados por líneas.

Los valores promedio para cada periodo de todas las variables analizadas se presentan en la Tabla 3.2. Además de los tres descriptores microbianos mencionados anteriormente, otras variables ambientales también mostraron un patrón estacional recurrente. La temperatura superficial del agua de mar mostró el patrón estacional habitual de los mares templados, con un periodo más cálido de mayo a octubre, seguido de un periodo más frío de noviembre a abril. Sin embargo, las situaciones de transición T<sub>A</sub> y T<sub>S</sub> ocurrieron antes que los cambios en la temperatura superficial (Figura 3.4, flechas rojas). La concentración total de clorofila *a* varió entre 0,2 y 2,4  $\mu\text{g l}^{-1}$ , y sus valores estacionales máximos se detectaron cada año en invierno (2008, 2009, 2011 y 2012), inmediatamente antes de la transición de primavera T<sub>A</sub> (Figura 3.4, flecha verde). Esta primera floración de productores primarios se relacionó con el agotamiento de la reserva de nitratos (Figura 3.4) y con las concentraciones más altas de carbono orgánico disuelto a lo largo del año (Tabla 3.1).



**Figura 3.4.** Evolución temporal de la temperatura superficial del agua de mar, de la concentración de clorofila *a*, de los nitratos y de la densidad de *Synechococcus*. Las flechas rojas indican el comienzo del cambio en la temperatura superficial después de los periodos de transición ( $T_A$  y  $T_S$ ). Las flechas verde y azul indican los picos de clorofila *a* y de *Synechococcus* previos a  $T_A$  y  $T_S$ , respectivamente. Las barras grises resaltan los periodos de transición.

*Synechococcus* alcanzó su densidad máxima en julio y agosto (valores medios de  $8,2 \times 10^7$  cél l<sup>-1</sup> y  $4,4 \times 10^7$  cél l<sup>-1</sup>, respectivamente), en tanto que *Prochlorococcus* no fue detectable desde enero hasta julio. La presencia de estos procariontos autótrofos se asoció a condiciones de temperatura superficial alta, clorofila *a* baja y concentración de nitratos baja (Figura 3.4).

La densidad de nanoflagelados fue menor en invierno que en verano (prueba de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) y aunque se detectó la misma tendencia para las partículas víricas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En los experimentales llevados a cabo para el **Capítulo 2** de esta tesis, se observó que la ratio entre los nanoflagelados heterótrofos y las bacterias, un indicador de la presión por depredación (Gasol, 1994), estaba relacionada con la modificación de la materia orgánica disuelta. Esta relación se correlacionó positivamente con las tres actividades enzimáticas extracelulares específicas de la LAP, la  $\alpha$ -Glu y la  $\beta$ -Glu, así como con la respiración bacteriana específica ( $\rho$  de Spearman = 0,52,  $p < 0,01$ ), la producción bacteriana específica ( $\rho$  de Spearman = 0,43,  $p < 0,05$ ) y la demanda de carbono bacteriana específica ( $\rho$  de Spearman = 0,50,  $p < 0,01$ ) (Tabla Suplementaria TS.2).

**Tabla 3.2.** Valores promedios para cada periodo (invierno, verano y transiciones)  $\pm$  errores estándar de las variables analizadas. Los periodos de transición, abril (T<sub>A</sub>) y septiembre (T<sub>S</sub>), están señalados en fondo gris. MODF<sub>Humic</sub>: material húmico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot</sub>: material proteico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot:Humic</sub>: Ratio entre MODF<sub>Prot</sub> y MODF<sub>Humic</sub>;  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu: Ratio entre las actividades enzimáticas extracelulares  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasa. n.d.: no detectable.

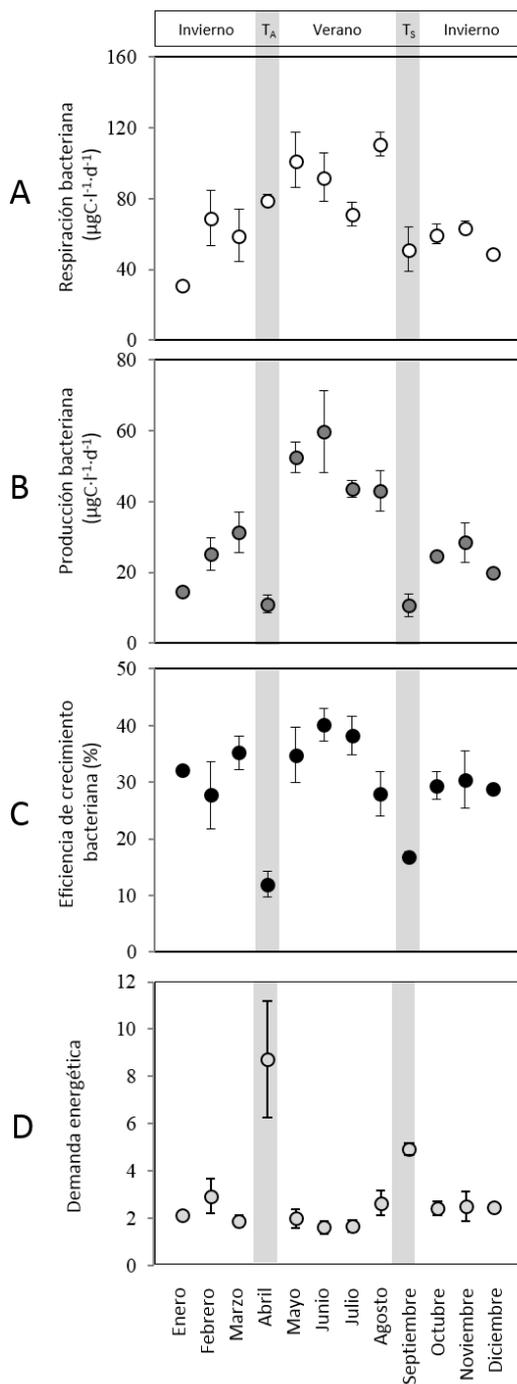
		Invierno		T <sub>A</sub>		Verano		T <sub>S</sub>	
		$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$
Temperatura superficial	°C	14,2	0,7	13,6	0,3	18,9	0,6	21,0	0,1
Clorofila <i>a</i>	$\mu\text{g l}^{-1}$	0,84	0,20	1,10	0,19	0,29	0,5	0,23	0,04
Carbono orgánico disuelto	$\mu\text{M}$	168	36	251	67	144	12	166	
Concentración de nitratos	$\mu\text{M}$	3,42	0,75	1,42	1,02	0,75	0,18	0,65	
Concentración de fosfatos	$\mu\text{M}$	0,22	0,04	0,17	0,09	0,20	0,03	0,50	
Concentración de silicatos	$\mu\text{M}$	3,69	0,73	1,22	0,42	2,93	0,60	5,25	
<i>Synechococcus</i>	$\times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$	12,6	6,0	2,1	1,9	39,0	18,1	14,1	
<i>Prochlorococcus</i>	$\times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$	15,1	7,0	n.d		0,2	0,2	19,3	
MODF <sub>Humic</sub>	USQ	3,59	0,31	4,10	0,52	2,73	0,22	3,14	0,62
MODF <sub>Prot</sub>	USQ	2,43	0,22	2,69	0,24	2,62	0,21	3,14	0,87
MODF <sub>Prot:Humic</sub>		0,70	0,10	0,69	0,12	1,00	0,10	0,99	0,09
Densidad bacteriana	$\times 10^9 \text{ cél l}^{-1}$	0,98	0,13	0,74	0,09	1,15	0,16	1,56	
Densidad nanoflagelados heterótrofos	$\times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$	0,58	0,09	0,70	0,06	1,41	0,40	1,33	0,48
Nanoflagelados : Bacterias		0,94	0,38	1,06	0,17	1,37	0,35	0,54	

Partículas víricas	x10 <sup>10</sup> cél l <sup>-1</sup>	1,32	0,31	1,27	0,48	1,67	0,42	3,85	
Respiración bacteriana	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	59,8	5,2	79,2	3,1	92,5	7,0	51,6	12,5
Producción bacteriana	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	26,0	2,2	11,1	2,4	51,1	4,3	10,7	3,3
Eficiencia de crecimiento bacteriana	%	30,8	1,9	12,0	2,3	35,1	2,1	16,9	0,9
Demanda de carbono bacteriana	µg C l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	85,8	6,4	90,3	4,9	143,5	9,2	62,3	15,8
Leucina Aminopeptidasa	x10 <sup>3</sup> nmol MCA l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	1,87	0,21	2,23	0,44	5,43	1,30	2,41	0,38
α-Glucosidasa	nmol MUF l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	27,4	7,7	62,2	30,1	42,2	12,2	113,4	85,4
β-Glucosidasa	nmol MUF l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	32,9	8,0	119,6	25,3	77,9	20,6	65,8	52,9
α-Glu / β-Glu		0,73	0,12	0,70	0,15	0,54	0,07	1,92	0,25
<i>Alfaproteobacteria</i>	%	40,6	0,8	34,5	2,3	26,3	1,5	27,3	
<i>Bacteroidetes</i>	%	23,3	1,3	31,8	1,4	38,0	1,8	30,8	
<i>Gammaproteobacteria</i>	%	21,9	1,3	20,2	1,4	20,9	1,5	23,2	
<i>Betaproteobacteria</i>	%	7,4	0,8	6,5	0,6	7,5	0,6	8,6	
Otras Eubacteria	%	6,8	0,3	7,0		7,3	0,3	10,1	

*Metabolismo bacteriano y actividad enzimática extracelular*

El metabolismo de la comunidad bacteriana siguió un claro patrón estacional recurrente (Tabla 3.2 y Figura 3.5). La demanda de carbono bacteriana fue 1,7 veces menor en invierno que en verano ( $86 \pm 6 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$  vs.  $144 \pm 9 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ; prueba de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ). La respiración bacteriana y la producción bacteriana mostraron tendencias similares, con valores significativamente más bajos en invierno que en verano ( $p < 0,001$  para ambos). Sin embargo, la eficiencia de crecimiento bacteriana no mostró diferencias significativas (prueba de Wilcoxon,  $p > 0,1$ ) entre estos dos periodos (valores medios de 31% en invierno y de 35% en verano). En las muestras de transición, los valores de producción bacteriana fueron los más bajos de todo el año y, como consecuencia, la eficiencia de crecimiento bacteriana disminuyó a los valores más bajos observados, por debajo del 18%. La relación entre la respiración y la producción se utilizó como una estimación de la demanda energética necesaria para obtener una unidad de biomasa bacteriana. Esta demanda energética fue de promedio  $7,5 \pm 1,0$  para los periodos de transición ( $T_A$  y  $T_S$  juntas), que fue significativamente mayor (prueba de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ) que los valores de  $2,4 \pm 0,2$  y  $1,9 \pm 0,2$  obtenidos para invierno y verano, respectivamente, los cuales no fueron significativamente diferentes entre sí (Figura 3.5D).

Las actividades enzimáticas extracelulares LAP,  $\alpha$ -Glu y  $\beta$ -Glu fueron menores en invierno que en verano (Tabla 3.2), aunque las diferencias en los valores medios solo fueron significativas para la LAP (prueba de Wilcoxon,  $p = 0,005$ ). Sin embargo, hubo correlaciones positivas cercanas entre las actividades específicas de la LAP, de la  $\alpha$ -Glu o de la  $\beta$ -Glu y la respiración bacteriana específica. Además, la relación  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu, indicador de la labilidad de los carbohidratos disueltos (Decho & Herndl, 1995; Karner & Rassoulzadegan, 1995), fue más alta en invierno que en verano. Esta relación se correlacionó negativamente con la demanda de carbono bacteriana ( $\rho$  de Spearman =  $-0,60$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabla suplementaria TS.2).



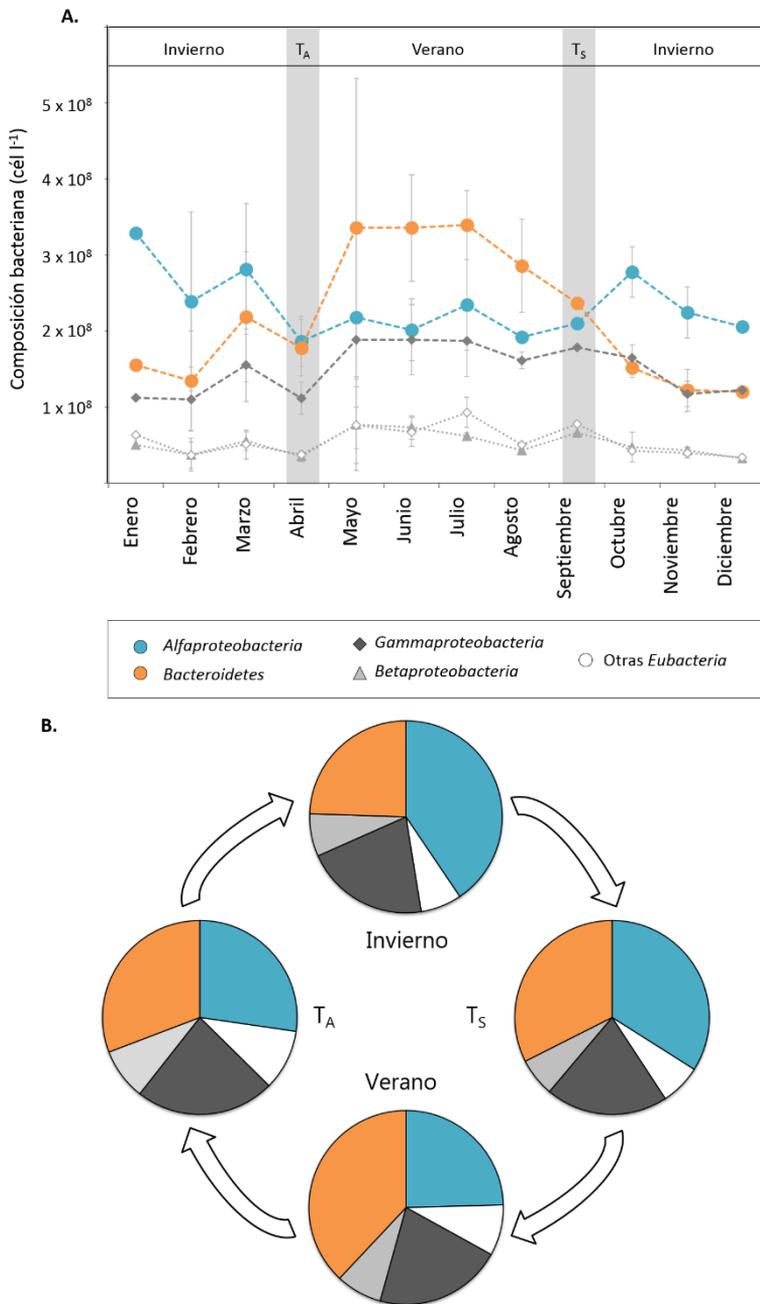
**Figura 3.5.** Distribución intra-anual de la respiración bacteriana (A), la producción bacteriana (B), la eficiencia de crecimiento bacteriana (C) y la demanda energética (D), calculada como la ratio entre la respiración bacteriana y la producción bacteriana. Las barras grises remarcan los periodos de transición ( $T_A$  y  $T_S$ ). Se presentan los valores medios  $\pm$  error estándar.

### *Composición de la comunidad bacteriana*

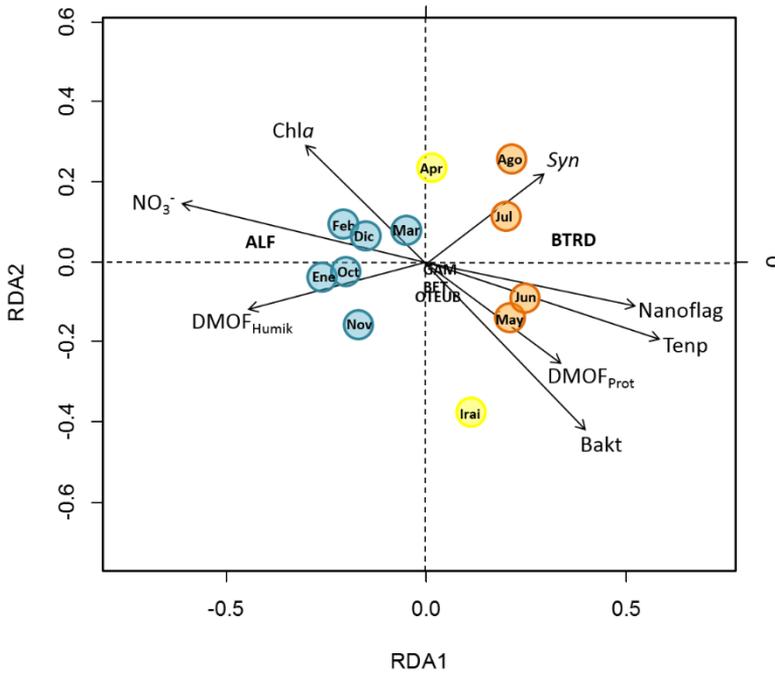
La alternancia en el predominio de los dos grupos filogenéticos principales, *Bacteroidetes* y *Alfaproteobacteria*, fue notable a lo largo del estudio (Figura 3.6). En invierno, las *Alfaproteobacteria* ( $2,6 \pm 0,3 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup>) fueron más abundantes que los *Bacteroidetes* ( $1,5 \pm 0,2 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup>), mientras que en verano los *Bacteroidetes* ( $3,3 \pm 0,4 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup>) dominaron sobre las *Alfaproteobacteria* ( $2,1 \pm 0,3 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup>) ( $p < 0,001$  en ambos casos). Las muestras de transición mostraron valores intermedios y similares para estos dos grupos filogenéticos. Las *Gammaproteobacteria* constituyeron el tercer grupo más abundante en todo el ciclo estacional ( $1,5 \pm 0,2 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup> para todo el estudio), y su tendencia estacional se asemejó a la de los *Bacteroidetes*, aunque de manera menos marcada. Las *Betaproteobacteria* siempre estuvieron presentes en un porcentaje mucho menor ( $5,3 \pm 0,7 \times 10^7$  cél l<sup>-1</sup>) y no mostraron estacionalidad. Las bacterias restantes, no identificadas mediante las sondas específicas, nunca representaron más de  $1,7 \times 10^8$  cél l<sup>-1</sup> ( $5,6 \pm 0,7 \times 10^7$  cél l<sup>-1</sup>). Las arqueas no se cuantificaron debido a su baja densidad habitual en estas aguas costeras (Alonso-Sáez *et al.*, 2009).

Cabe destacar que la proporción de los *Bacteroidetes* mostró una estrecha correlación positiva con la demanda de carbono bacteriana (rho de Spearman = 0,56,  $p < 0,01$ ), así como con la actividad LAP (rho de Spearman = 0,60,  $p < 0,01$ ). La proporción de las *Alfaproteobacteria* se correlacionó inversamente con la demanda de carbono bacteriana (rho de Spearman = -0,51,  $p < 0,01$ ), con la actividad LAP (rho de Spearman = -0,60,  $p < 0,01$ ) y con la actividad  $\beta$ -Glu (rho de Spearman = -0,50,  $p < 0,01$ ) (Tabla suplementaria TS.2).

Se realizó un análisis de redundancia (Figura 3.7) para sintetizar las variaciones en la composición de la comunidad bacteriana en función de un conjunto de variables explicativas: clorofila *a*, concentración de nitratos, materia orgánica disuelta fluorescente húmica y proteica, abundancia de *Synechococcus*, temperatura superficial, densidad de nanoflagelados heterótrofos y densidad de bacterias.



**Figura 3.6.** (A) Evolución temporal de la composición de la comunidad bacteriana. Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. (B) Proporciones relativas de los principales grupos bacterianos de la comunidad del Cantábrico oriental (*Alfaproteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y otras *Eubacteria*) en los cuatro periodos por los que pasa el ecosistema: invierno, primera transición (T<sub>A</sub>), verano y segunda transición (T<sub>S</sub>). Las barras grises resaltan los periodos de transición.



**Figura 3.7.** Análisis de redundancias (RDA) de la relación entre variables ambientales (flechas) y los principales grupos de la comunidad bacteriana (en negrita) (*Alfaproteobacteria* (ALF), *Bacteroidetes* (BTRD), *Gammaproteobacteria* (GAM), *Betaproteobacteria* (BET) y otras *Eubacteria* (OTUEB)). Los meses de invierno están representados en azul, los meses de verano en rojo y los periodos de transición en amarillo. Las variables analizadas: Clorofila  $a$  ( $Chla$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ), materia orgánica disuelta fluorescente proteica y húmica ( $MODF_{Prot}$  y  $MODF_{Humik}$ ), abundancia de *Synechococcus* (*Syn*), temperatura superficial del agua (*Temp*), densidad de nanoflagelados heterótrofos (*Nanoflag*) y densidad bacteriana (*Bact*).

El 87,7% de la variación en la composición de la comunidad bacteriana correspondió a las variables explicativas, mientras que el 12,3% de la variación correspondió a otros factores desconocidos. Este análisis indica que, las *Alfaproteobacteria* fueron más abundantes en situaciones con alta concentración de clorofila  $a$ , de nitratos y de materia orgánica disuelta fluorescente húmica (variables que caracterizaron el periodo invernal), mientras que los *Bacteroidetes* fueron más abundantes con alta temperatura superficial, alta densidad de nanoflagelados heterótrofos, alta abundancia de *Synechococcus* y alta concentración de materia orgánica disuelta fluorescente proteica (características que acompañan el periodo de verano). La temperatura superficial, la densidad de nanoflagelados heterótrofos, la densidad de bacterias y la y materia orgánica disuelta fluorescente proteica estuvieron estrechamente relacionados entre sí.

## Discusión

Los resultados aquí presentados muestran claramente un ciclo estacional recurrente en las aguas costeras del Cantábrico oriental a lo largo de cuatro años (del 2008 al 2012). Este ciclo estacional consta de dos situaciones funcionalmente estables, invierno (de octubre a marzo) y verano (de mayo a agosto), que presentan diferentes estructuras de comunidades bacterianas y niveles de utilización de carbono, pero valores similares y altos de eficiencia de crecimiento bacteriana. Estas situaciones están vinculadas por cortos períodos de transición,  $T_A$  (abril) y  $T_S$  (septiembre), en los cuales la estructura de la comunidad bacteriana y el metabolismo cambian rápidamente y la eficiencia de crecimiento bacteriana se reduce en gran medida.

Las tres comunidades microbianas principales, bacterias, nanoflagelados y virus, son más abundantes en verano que en invierno, y tanto la densidad de bacterias como la de nanoflagelados heterótrofos correlacionan positivamente con la temperatura del agua de mar. No se han encontrado correlaciones significativas entre la temperatura superficial y la demanda de carbono bacteriana, la producción bacteriana o la respiración bacteriana, al contrario que en otros estudios realizados en el Cantábrico Oriental y Central (Iriberry *et al.*, 1985; Huete-Stauffer *et al.*, 2015; Morán & Scharek, 2015), en los cuales se destaca el efecto positivo de la temperatura del agua de mar sobre la actividad microbiana heterotrófica. Por lo tanto, estos resultados no apoyan la temperatura como un impulsor directo de la variabilidad en el Cantábrico Oriental, porque los cambios en la eficiencia de crecimiento bacteriana y en la composición de la comunidad bacteriana asociados a los periodos de transición ocurren antes que los cambios en la temperatura superficial del agua de mar. Por lo tanto, se deben considerar otros factores para explicar los cambios estacionales observados y las peculiares situaciones de transición.

Además de la abundancia de depredadores, la relación entre la densidad de nanoflagelados heterótrofos y la densidad de bacterias también fue mayor en verano que en invierno. Dado que esta relación se considera un indicador de la

presión por depredación (Gasol, 1994; ver **Capítulo 2**), su correlación con las tres actividades enzimáticas extracelulares, que a su vez correlacionaron con la respiración específica, sugiere una secuencia de eventos que relacionan la presión por depredación con el metabolismo bacteriano. El aumento de la depredación de bacterias por parte de los nanoflagelados heterótrofos se ha relacionado con la producción de materia orgánica disuelta de una calidad diferente a la producida por la producción primaria fitoplanctónica (Strom *et al.*, 1997; Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; ver **Capítulo 2**). A medida que la degradación de los materiales producidos por el fitoplancton avanza y la materia orgánica se altera cualitativamente mediante el procesamiento microbiano, los materiales restantes requieren la expresión de niveles elevados de actividades enzimáticas extracelulares, que a su vez aumentan el coste energético que les supone convertir esa materia orgánica disuelta en biomasa microbiana (Middelboe & Søndergaard, 1993; ver **Capítulo 2**). Esto lo refleja la mayor respiración específica (y posterior demanda de carbono bacteriana) detectada durante el verano en comparación con la de invierno. Sin embargo, esta respuesta metabólica a la materia orgánica disuelta alterada no ayuda a explicar las disminuciones sustanciales y constantes de la producción bacteriana y la eficiencia de crecimiento bacteriana observadas durante los periodos de transición.

La determinación de la composición de la comunidad bacteriana mediante CARD-FISH puede limitar la posibilidad de asociar una determinada actividad metabólica con un grupo de bacterias concreto, debido a la baja resolución taxonómica obtenida mediante esta técnica (Fuchs *et al.*, 1998; Kubota, 2013). A pesar de que podemos suponer que dentro de los grandes grupos taxonómicos la actividad metabólica es muy variable, el análisis de la composición de la comunidad bacteriana mediante CARD-FISH nos ha permitido detectar, a lo largo del año, cambios en el funcionamiento de la comunidad en general que coinciden con cambios en el dominio de los grandes grupos taxonómicos. En este sentido, detectamos un cambio recurrente de alternancia en el predominio de los dos grupos más abundantes en estas aguas costeras, *Bacteroidetes* y

*Alfaproteobacteria*. Esta alternancia se observa también en otros ecosistemas (Pinhassi & Hagstrom, 2000; Kan *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008). A pesar de este cambio en las predominancias, y aunque *Bacteroidetes* y *Alfaproteobacteria* sean grupos taxonómicamente amplios que probablemente varían su composición específica a lo largo del año, la comunidad bacteriana mantiene una alta y estable eficiencia de crecimiento bacteriana durante la mayor parte del año (verano e invierno). Sin embargo, existen dos descensos bruscos en la eficiencia de crecimiento bacteriana que ocurren en los dos periodos de transición, durante el cambio en el predominio de *Alfaproteobacteria* a *Bacteroidetes* en abril ( $T_A$ ), y de *Bacteroidetes* a *Alfaproteobacteria*, en septiembre ( $T_S$ ).

Varios autores han observado un acoplamiento entre la aparición de floraciones fitoplanctónicas y los cambios en la composición de la comunidad bacteriana (Middelboe *et al.*, 1995; Riemann *et al.*, 2000; Pinhassi *et al.*, 2004; Brussaard *et al.*, 2005; Fandino *et al.*, 2005; Rooney-Varga *et al.*, 2005; Sapp *et al.* 2007; Teeling *et al.*, 2012; Sintès *et al.*, 2013). Observamos dos momentos en el año en el que las condiciones indicaron la presencia de floraciones. En el primero, se detectó el máximo de clorofila *a* en marzo junto con un descenso significativo en la concentración de silicatos desde marzo ( $2,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) hasta abril ( $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , la más baja en todo el año), sugiriendo el desarrollo de una floración de diatomeas justo antes de la transición de abril (Sarhou *et al.*, 2005; Wasmund *et al.*, 2013). Calvo-Díaz *et al.*, (2008) también encontraron valores máximos de clorofila *a* a finales del invierno o principios de la primavera en el sur del Golfo de Bizkaia, asociados al fitoplancton de mayor tamaño. El segundo momento vino marcado por la alta densidad de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* en julio y agosto, antes de la transición de septiembre y en combinación con una elevada temperatura superficial y bajas concentraciones de nitratos y clorofila *a*, de acuerdo con otros estudios realizados en el Cantábrico y otras aguas costeras (Agawin *et al.*, 2000; Worden *et al.*, 2004; Morán, 2007; Calvo-Díaz *et al.*, 2008).

La floración de primavera, formado por fototrofos eucariotas, y la floración de verano, de fitoplancton procariota, podrían ser los principales impulsores de la

variabilidad en la composición de la comunidad bacteriana en el Cantábrico Oriental. Por un lado, a comienzos de la primavera, la nueva materia orgánica disuelta liberada principalmente por diatomeas (asociada a una ratio  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu < 1, indicativo de presencia de polisacáridos complejos (Bhaskar & Bhosle, 2008)) favorecería la expansión de *Bacteroidetes* e impulsaría el primer cambio en la composición de la comunidad bacteriana durante el periodo de transición de abril. Los *Bacteroidetes* se han descrito como con estrategias r de rápido crecimiento con especialización en el ataque inicial de materia orgánica altamente compleja (Kirchman, 2002; Bauer *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011). Este grupo podría adaptarse mejor a este tipo de materia orgánica debido a su capacidad para expresar una amplia gama de enzimas extracelulares especializadas en la degradación de polisacáridos sulfatados, que se sabe que son componentes principales de la pared celular del fitoplancton, y transportadores de compuestos de alto peso molecular (Arnosti *et al.*, 2012; Gómez-Pereira *et al.*, 2012; Sarmiento & Gasol, 2012; Teeling *et al.*, 2012). Esto, a su vez, conduciría a la disminución de aquellas *Alfaproteobacteria* que no están equipadas para usar la materia orgánica disuelta recién producida derivada de diatomeas. Pero a finales de verano, la excreción de sustratos altamente lábiles (ratio  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu > 1 (Bhaskar & Bhosle, 2008)) excretados por *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Biddanda & Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), puede generar el segundo cambio principal de la composición de la comunidad bacteriana en la transición de septiembre, favoreciendo el desarrollo de las *Alfaproteobacteria* capaces de asimilar eficientemente los compuestos de bajo peso molecular y enlaces de sencilla degradación (Teeling *et al.*, 2012).

En estos dos periodos de transición, observamos la eficiencia de crecimiento más baja de todo el año. Este hecho, junto con las eficiencias de crecimiento similares y relativamente altas de invierno y verano, a pesar de las notables diferencias en la densidad bacteriana, la producción, la demanda de carbono y la composición de la comunidad bacteriana, sugieren que la eficiencia de crecimiento depende del grado de adaptación de la comunidad bacteriana a las condiciones

ambientales de su entorno. Algunos estudios afirman que diferentes comunidades bacterianas muestran diferentes niveles de respiración, producción y eficiencia (Findlay *et al.* 2003; Fuhrman *et al.*, 2006; Kritzberg *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b), mientras que otros indican que el acoplamiento entre la composición y la función puede ser débil (Langenheder *et al.*, 2005; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Gasol *et al.*, 2009; Sjöstedt *et al.*, 2012). Comte & del Giorgio (2010) sugieren que la conexión entre la composición y la función de la comunidad solo puede expresarse en ciertos momentos en el espacio y en el tiempo y bajo ciertas condiciones ambientales. Nuestra hipótesis plantea que, debido a su gran plasticidad metabólica (Meyer *et al.*, 2004; Mou *et al.*, 2008), las comunidades bacterianas pueden adaptar su metabolismo a pequeños cambios ambientales, sin cambios significativos en la composición. Sin embargo, cuando se enfrentan a cambios ambientales significativos, los ajustes funcionales requeridos se encuentran fuera del rango de adaptación, por lo que posteriormente la composición de la comunidad cambia debido a un proceso de adaptación y sucesión ecológica (*sensu* Koskella & Vos, 2015). En estas condiciones, la demanda energética aumentaría y la eficiencia de crecimiento bacteriana disminuiría drásticamente. Por lo tanto, no será la composición de la comunidad bacteriana, sino el grado de adaptación de esa comunidad bacteriana a las condiciones ambientales lo que determinará la proporción de la materia orgánica disuelta que se mineralizará y estará disponible para su transferencia a niveles tróficos superiores.

En resumen, nuestros resultados indican que la comunidad microbiana en el Cantábrico Oriental sigue un ciclo anual predecible, compuesto por dos situaciones funcionalmente estables, invierno y verano, caracterizadas por niveles bajos y altos de metabolismo microbiano y una composición distinta de la comunidad microbiana. Las transiciones entre estos dos estados son impulsadas por una floración primaveral dominado por diatomeas, en abril, y por una floración de cianobacterias, en septiembre. Por lo tanto, la procedencia de la materia orgánica disuelta disponible parece ser el principal factor inicial que

controla la actividad y composición bacteriana en estas aguas y, por lo tanto, estas propiedades se controlan principalmente de abajo hacia arriba; es decir, en función de los recursos nutricionales existentes. El ajuste del metabolismo de la comunidad microbiana a estos cambios ambientales que ocurren en los períodos de transición no se debe a cambios en la biomasa, densidad o plasticidad fenotípica (escenario de ajuste), sino a cambios en la estructura de la comunidad (escenario de reemplazo). La eficiencia de crecimiento bacteriana parece ser una propiedad muy elástica que, después de breves eventos de transición, se restaura rápidamente a niveles relativamente altos (~ 30%) y estables mediante la selección de los miembros de la comunidad microbiana que mejor se adaptan a la materia orgánica disuelta disponible en cada periodo.



## DISCUSIÓN GENERAL



Una gran fracción de la producción primaria llevada a cabo por el fitoplancton a través de la fotosíntesis se encuentra en forma de materia orgánica en los sistemas acuáticos, que es accesible casi exclusivamente para las bacterias heterotróficas. La comunidad procariota heterótrofa puede tomar esa materia orgánica de modo directo cuando está formada por moléculas de pequeño tamaño, o indirectamente tras la expresión de enzimas extracelulares que vehiculizan una hidrólisis previa de la materia orgánica de alto peso molecular. Las bacterias dominan el océano en abundancia, diversidad y actividad metabólica, y su absorción de la materia orgánica por las bacterias representa una vía importante del flujo de carbono en este sistema. Las bacterias heterótrofas determinan en gran medida el destino del carbono orgánico disuelto, ya que pueden incorporarlo a su biomasa o pueden mineralizarlo y liberarlo de nuevo a la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub> mediante la respiración. La eficiencia de crecimiento bacteriana, definida como la fracción del carbono consumido que se destina a la producción de biomasa, es una variable clave para conocer la capacidad de remineralización de la materia orgánica de la comunidad bacteriana en los sistemas acuáticos, y su variabilidad puede cambiar el flujo general de carbono en los sistemas acuáticos.

Desde que se reconoció la importancia ecológica del bucle microbiano en el ciclo del carbono (Williams, 1981; Kirchman *et al.*, 1982), muchos estudios se han centrado en determinar la eficiencia de crecimiento bacteriana y en intentar establecer los factores que la regulan, aunque la gran variabilidad de datos obtenidos ha obstaculizado la obtención de resultados que permitan predecir con fiabilidad la eficiencia de crecimiento bacteriana (del Giorgio & Cole, 1998). La recopilación de datos llevada a cabo por del Giorgio & Cole (2000) indica que el rango de valores de eficiencia de crecimiento en ecosistemas marinos naturales es muy amplio, ya que varía entre valores inferiores al < 1% y superiores al 60%, si bien la mayor parte se encuentran entre un 5% y un 30%. Por otra parte, en esta revisión se indica con claridad la existencia de una enorme variabilidad en la interrelación de los valores de producción y respiración, de tal manera que un

determinado valor de producción podría asociarse a un valor de respiración variable en hasta dos órdenes de magnitud. Los problemas metodológicos asociados a la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana o las diferencias en la estrategia experimental han podido contribuir a la variabilidad observada (Briand *et al.*, 2004; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). Así, a día de hoy aún es difícil predecir la magnitud real del carbono orgánico disuelto que es transformado por el bacterioplancton, lo cual es fundamental para una adecuada comprensión del funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas acuáticos. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir a la comprensión y predicción del flujo del carbono en los sistemas acuáticos a través del bacterioplancton. Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar, se adaptó la metodología adecuada para la determinación de la de respiración de bacterioplancton en muestras de agua de mar natural con una elevada sensibilidad y en periodos cortos de incubación (**Capítulo 1**). Posteriormente, se profundizó en el conocimiento de los factores que regulan la eficiencia de crecimiento bacteriana desde dos perspectivas diferentes: por un lado, se exploró específicamente la influencia ejercida por la depredación de protozoos bacterívoros en el metabolismo de comunidades bacterianas a través de la alteración de la materia orgánica disuelta en dos sistemas costeros distintos, sudeste del Mar Cantábrico y el noroeste del Mar Mediterráneo. (**Capítulo 2**); por otro lado, se analizó la variabilidad anual de la eficiencia de crecimiento bacteriana a lo largo de cuatro años en las aguas costeras del Cantábrico oriental, junto con el metabolismo y composición de la comunidad bacteriana y un amplio conjunto de variables ambientales (**Capítulo 3**).

Uno de los principales problemas asociados a la determinación de la eficiencia de crecimiento bacteriana es la dificultad metodológica inherente a la medida de respiración bacteriana en un sistema acuático natural, aspecto que se aborda en el **Capítulo 1** de esta tesis. Tras valorar las ventajas y desventajas de cada uno de los diferentes métodos descritos en la bibliografía para medir respiración bacteriana, se optó por optimizar la utilización de los microsensores de oxígeno

como herramienta para obtener medidas de respiración precisas y representativas de la comunidad natural en los sistemas acuáticos, ya que permiten monitorizar la evolución del descenso de oxígeno de manera continua y, por tanto, identificar cambios en las dinámicas de respiración (Briand *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos demostraron que a partir de las 6 horas de incubación la comunidad microbiana no se mantiene estable ni en número, ni en actividad, ni en composición, y consecuentemente, tampoco el descenso de oxígeno disuelto es lineal cuando el período de incubación supera ese nivel. Observamos que la utilización de periodos de incubación superiores a 12 h supuso un notable incremento del valor de la respiración bacteriana (de media 3 veces superior) con respecto a los valores obtenidos con periodos de incubación inferiores a 6 h. Este resultado resulta significativo, ya que la mayoría de los trabajos en los que se mide la respiración bacteriana realizados hasta el momento asume un descenso lineal de la concentración de oxígeno disuelto (Robinson, 2008) a pesar de utilizar métodos que requieren el uso de tiempos de incubación que a menudo superaban las 48 h. Estas medidas posiblemente presenten sobreestimaciones notables frente al valor real de la respiración bacteriana de la comunidad natural debido a la posible alteración de la misma durante la incubación (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002), y pueden ser las causantes en parte de la variabilidad en la eficiencia de crecimiento bacteriana observada por otros autores (por ejemplo, del Giorgio & Cole, 1998).

La utilización de tiempos de incubación lo más cortos posible es crucial para la obtención de tasas de respiración bacterianas precisas. En este sentido, los microsensores de oxígeno son una herramienta útil para medir respiración bacteriana de una manera fiable, ya que permiten detectar cambios en la velocidad de consumo ligados a cambios en la actividad y composición de la comunidad, y reducir considerablemente el tiempo de incubación a periodos inferiores a 6 h. Además, esta reducción en el tiempo de incubación, permite estimar la producción y la respiración bacterianas en el mismo intervalo de tiempo

y obtener medidas de eficiencia de crecimiento bacteriana precisas y representativas de la comunidad natural.

Además del aspecto metodológico, resulta evidente que la variabilidad observada en los valores de eficiencia de crecimiento bacteriana puede ser el reflejo de la flexibilidad fisiológica de las bacterias y del grado en el que los procesos anabólicos y catabólicos puedan encontrarse acoplados o desacoplados en las bacterias marinas, posiblemente con el fin de optimizar su supervivencia y crecimiento en un medio ambiente natural cambiante (del Giorgio & Cole, 2000). Es precisamente este segundo aspecto el que se aborda en los **Capítulos 2 y 3** de la tesis. Dado que la eficiencia de crecimiento bacteriana está estrechamente relacionada con el crecimiento bacteriano y con la producción bacteriana (del Giorgio & Cole, 1998), es de esperar que aquellos factores que influyan en estas variables, influirán también en la eficiencia de crecimiento bacteriana. Muchos autores sugieren que la eficiencia de crecimiento bacteriana podría estar regulada por factores físicos, químicos y biológicos, como la temperatura (Rivkin & Legendre, 2001; Apple *et al.*, 2006), la irradiación (Cottrell *et al.*, 2008; Hörtnagl *et al.*, 2011), la disponibilidad de nutrientes (Biddanda *et al.*, 2001; Lemée *et al.*, 2002; Pradeep Ram *et al.*, 2003), la concentración y la calidad de la materia orgánica disuelta (Eiler *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2005; Apple & del Giorgio, 2007; Lee *et al.* 2009), la estructura y la composición de la comunidad bacteriana (Comte & del Giorgio, 2011; Warkentin *et al.*, 2011) o la mortalidad bacteriana debida a la depredación y/o a la lisis viral (Middelboe *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento han sido muy variables y a menudo contradictorios a la hora de determinar qué factores y cómo controlan la eficiencia de crecimiento bacteriana.

La eficiencia de crecimiento es el parámetro que mejor integra todos aquellos procesos metabólicos complementarios: transporte, mantenimiento, crecimiento, reproducción, que configuran la energética de las bacterias (Dawes, 1985). Esto explica que existan numerosos trabajos de energética bacteriana que cuantifican eficiencia de crecimiento de especies individuales (cultivos puros) en

condiciones definidas (p.ej. revisiones de Wieser, 1994 o Russell & Cook, 1995). Aunque la información acumulada resulta útil, desafortunadamente no es de aplicación a comunidades mixtas naturales. La eficiencia de crecimiento de una especie cuando utiliza un sustrato definido, poco tiene que ver con la que muestra la mezcla de especies que forman el bacterioplancton creciendo en distintas situaciones fisiológicas y medioambientales sobre una mezcla compleja de sustratos con distintos grados de biodegradabilidad. Además, al analizar la variabilidad natural de la eficiencia de crecimiento bacteriana, la mayoría de los estudios abordan la variabilidad espacial, mientras que el análisis de la sucesión temporal está menos estudiado (Lemée *et al.*, 2002; Reinthaler & Herndl, 2005; Eichinger *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Bonilla-Fidji *et al.*, 2010).

En el **Capítulo 3** se analizó la variabilidad natural de la eficiencia de crecimiento bacteriana a lo largo de cuatro ciclos estacionales en las aguas costeras del Cantábrico oriental. Los resultados mostraron un ciclo estacional recurrente, consistente en dos situaciones estables y con una alta eficiencia de crecimiento bacteriana, el invierno (desde octubre a marzo) y el verano (desde mayo a agosto), en los que los grupos filogenéticos dominantes fueron *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes*, respectivamente. Entre el invierno y el verano, identificamos dos periodos cortos de transición, en abril y septiembre, caracterizados por bajas eficiencias de crecimiento y en los que no se detectó dominancia clara de ninguno de estos dos grupos. Los resultados obtenidos indican que la alternancia entre *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* fue impulsada principalmente por la capacidad de adaptación y grado de especialización en el uso de diferentes tipos de materia orgánica. La nueva materia orgánica disuelta altamente compleja liberada principalmente por diatomeas en el bloom fitoplanctónico previo a la transición de abril podría haber favorecido la expansión de *Bacteroidetes*, caracterizado por su capacidad para expresar una amplia gama de exoenzimas y transportadores de compuestos de alto peso molecular (Arnosti *et al.*, 2012; Gómez-Pereira *et al.*, 2012; Sarmiento & Gasol, 2012; Teeling *et al.*, 2012). De la misma forma, la excreción de sustratos altamente lábiles excretados por el bloom

fitoplanctónico procariota (Biddanda & Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), que sucede con anterioridad a la transición de septiembre, impulsaría el aumento de *Alfaproteobacteria*, mejor adaptadas a asimilar compuestos fáciles de degradar y de bajo peso molecular (Teeling *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que la eficiencia de crecimiento bacteriana debe considerarse una propiedad muy elástica que refleja el nivel de adaptación de la composición de la comunidad bacteriana a los cambios ambientales que ocurren a lo largo del ciclo estacional en las aguas costeras del Cantábrico oriental.

La actividad bacterívora y el consumo selectivo del protistoplancton ejercen un profundo impacto tanto en la estructura fisiológica como taxonómica de la comunidad bacterioplanctónica, así como en la composición de la materia orgánica disuelta (Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; Boras *et al.*, 2010). Por ello, consideramos de interés analizar la influencia que la materia orgánica disuelta alterada en microambientes con alta presión por depredación podía ejercer en el metabolismo de las comunidades bacterianas (**Capítulo 2**). Este estudio se realizó en dos ecosistemas costeros muy diferentes, en el sudeste del Mar Cantábrico y en el noroeste del Mar Mediterráneo. Los experimentos se realizaron mediante manipulación controlada en microcosmos de laboratorio, y se midieron las principales características metabólicas en tratamientos que contenían la mitad de la materia orgánica disuelta del agua natural reemplazada materia orgánica disuelta procedente de distintos momentos clave de la curva depredador-presa. La actividad microbiana causó alteraciones en la composición de la materia orgánica disuelta marina, que a su vez desencadenó cambios metabólicos importantes en las comunidades bacterianas. En ambos ecosistemas, la utilización de la materia orgánica disuelta alterada, y especialmente aquella alterada durante la acción depredadora de los protozoos, provocó el aumento de la demanda de carbono bacteriana y la disminución de la eficiencia de crecimiento bacteriana. Es decir, la materia orgánica disuelta alterada provocó en el bacterioplancton una reorganización metabólica para producir una mayor cantidad de enzimas extracelulares. Estos cambios metabólicos generaron un

coste metabólico para las bacterias que se reflejó en un aumento de la velocidad de respiración y en la disminución de la eficiencia de crecimiento bacteriana. Sin embargo, en el Mar Cantábrico, dominado por *Bacteroidetes* en verano, el coste energético asociado a una alta expresión de enzimas extracelulares fue menor que en el Mar Mediterráneo, dominado por SAR11 en verano. La magnitud del coste metabólico que supone el consumo de una nueva materia orgánica disuelta alterada parece ser, por tanto, una propiedad intrínseca de las comunidades, que depende directamente de la plasticidad funcional y capacidad de adaptación de los grupos filogenéticos dominantes, y que se ve reflejada en la eficiencia de crecimiento bacteriana.

En conclusión, en esta tesis se han adaptado las condiciones para la monitorización de la concentración de oxígeno y obtención de medidas de respiración bacteriana en sistemas acuáticos naturales marinos mediante un sistema de respirometría y microsensores de oxígeno. Los resultados obtenidos aplicando dicha metodología han contribuido a la obtención de medidas de respiración bacteriana fiables, así como a una mejor comprensión de la variabilidad de la eficiencia de crecimiento bacteriana. El trabajo realizado ha permitido enlazar los cambios en la actividad y la composición de la comunidad microbiana de un sistema acuático con la variabilidad de las condiciones ambientales cuando ocurren a diferente escala temporal: a corto plazo, la cantidad, el tamaño, el tipo y calidad de la materia orgánica disuelta determina el nivel de producción, respiración y, consecuentemente, de eficiencia de crecimiento bacteriana de la comunidad. Los cambios en la composición y/o en la degradabilidad de la materia orgánica disuelta conllevan un mayor coste energético para la comunidad bacteriana, y cuya cuantía varía dependiendo de la composición filogenética y la capacidad de adaptación de dicha comunidad. Este mayor coste energético se traduce en menores eficiencias de crecimiento, lo que a largo plazo provoca recambios en los grupos dominantes ya que se favorece el crecimiento de aquellos grupos que mejor se adaptan a las nuevas condiciones. En el momento en el que de nuevo la comunidad bacteriana está completamente

adaptada a la materia orgánica disuelta presente en el medio, la eficiencia de crecimiento vuelve a sus niveles iniciales. Por lo tanto, la variabilidad de la eficiencia de crecimiento, depende del estado trófico del ecosistema y del grado de adaptación de la comunidad bacteriana a la materia orgánica presente.

The background of the slide is a light blue gradient. It features stylized, flowing teal waves that curve upwards and then downwards, creating a sense of movement. Scattered throughout the background are numerous small, white, circular bubbles of varying sizes, some with thin grey outlines, giving the impression of an underwater scene.

**CONCLUSIONES**



1. En la determinación de la respiración bacteriana en los sistemas acuáticos naturales, la utilización de periodos de incubación superiores a 12 h provoca cambios significativos en la densidad, en el tamaño, en la actividad y en la composición de la comunidad bacteriana. Esta alteración contribuye a la sobrestimación de la respiración bacteriana y, por tanto, a la infraestimación de la eficiencia de crecimiento bacteriana.
2. Los microsensores de oxígeno permiten monitorizar la evolución del descenso de oxígeno de manera continua, de tal forma que pueden identificarse los cambios en las dinámicas de respiración en cada muestra de forma individual, delimitar el tiempo en el que la velocidad de consumo de oxígeno disuelto es lineal, y reducir así considerablemente el tiempo de incubación a periodos inferiores a 6 h. De esta manera, se obtienen medidas de respiración y eficiencia de crecimiento bacteriana precisas y representativas de la comunidad bacterioplanctónica natural.
3. El crecimiento bacteriano, pero particularmente el posterior crecimiento y acción depredadora de los protozoos, provoca alteraciones en la materia orgánica disuelta marina, la cual provoca cambios metabólicos importantes en la comunidad bacteriana. A corto plazo, esta respuesta metabólica consiste en un aumento de la actividad enzimática extracelular que implica un coste energético, un aumento en el consumo de carbono no relacionado con la producción bacteriana y una disminución notable en la eficiencia de crecimiento bacteriano como consecuencia final. La velocidad y extensión de estos procesos parecen estar relacionados con, y depender de, la composición de la comunidad bacteriana.
4. La comunidad microbiana en el Cantábrico Oriental sigue un ciclo anual predecible, compuesto por dos situaciones funcionalmente estables, invierno (octubre a marzo) y verano (mayo a agosto), caracterizadas respectivamente por niveles bajos y altos de metabolismo microbiano, y por una composición distinta de la comunidad bacterioplanctónica, dominada por *Alfaproteobacterias* en invierno y por *Bacteroidetes* en verano.

5. La procedencia de la materia orgánica disuelta disponible es el principal factor que controla la actividad y composición de la comunidad bacteriana en las aguas costeras del Cantábrico Oriental. Así, las transiciones entre invierno y verano son impulsadas por los cambios en la materia orgánica derivados de un bloom primaveral dominado por diatomeas, en abril, y de un bloom de cianobacterias, en septiembre.
6. La eficiencia de crecimiento es una propiedad muy elástica de la comunidad bacterioplanctónica de los sistemas acuáticos. Presenta valores bajos en los momentos de inestabilidad y cambios ambientales bruscos que caracterizan las épocas de transición, pero se restaura rápidamente a niveles relativamente altos ( $\sim 30\%$ ) y estables una vez se han seleccionado los miembros de la comunidad microbiana que mejor se adaptan a la materia orgánica disuelta disponible en cada periodo de invierno o verano.



## REFERENCIAS



- Agawin, N. S. R., Duarte, C. M. & Agustí, S. (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography*, **45**: 591–600.
- Alonso, C., & Pernthaler, J. (2006) *Roseobacter* and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology*, **8**: 2022–2030.
- Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sà, E., Sánchez, O., González, J. M., Pinhassi, J., *et al.* (2007) Seasonality in bacterial diversity in NW Mediterranean coastal waters assessment through clone libraries, fingerprinting fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**: 98–112.
- Alonso-Sáez, L. & Gasol, J.M. (2007) Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in Northwestern Mediterranean coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 3528–3535.
- Alonso-Sáez, L., Gasol, J. M., Aristegui, J., Vilas, J. C., Vaqué, D., Duarte, C. M. & Agustí, S. (2007). Large-scale variability in surface bacterial carbon demand and growth efficiency in the subtropical northeast Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, **52**: 533–546.
- Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., & Gasol, J. M. (2012) Bacterial uptake of low molecular weight organics in the subtropical Atlantic: Are major phylogenetic groups functionally different? *Limnology and Oceanography*, **57**: 798–808.
- Alonso-Sáez, L., Unanue, M., Latatu, A., Azúa, I., Ayo, B., Artolozaga, I. & Iriberrí, J. (2009) Changes in marine prokaryotic community induced by varying types of dissolved organic matter and subsequent grazing pressure. *Journal of Plankton Research*, **31**: 1373–1383.
- Alonso-Sáez, L., Vázquez-Domínguez, E., Cardelús, C., Pinhassi, J., Sala, M. M., Lekunberri, I., *et al.*, (2008) Factors controlling the year-round variability in carbon flux through bacteria in a coastal marine system. *Ecosystems*, **11**: 397–409.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1919–1925.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF) (1998) Standard methods for the examination

of water and wastewater, section 10200 H (20th ed.). Baltimore, Maryland. *United Book Press*.

Amon, R. M. W. & Benner, R. (1994) Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature*, **369**: 549–552.

Amon, R. M. W. & Benner, R. (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **41**: 41–51.

Apple, J. K. & del Giorgio, P. A. (2007) Organic substrate quality as the link between bacterioplankton carbon demand and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *ISME Journal*, **1**: 729–742.

Apple, J. K., del Giorgio, P. A. & Kemp, W. M. (2006) Temperature regulation of bacterial production, respiration, and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, **43**: 243–254.

Aristegui, J. & Montero, M. F. (1995). The relationship between community respiration and ETS activity in the ocean. *Journal of Plankton Research*, **17**: 1563–1571.

Arnosti, C., Fuchs, B. M., Amann, R. & Passow, U. (2012) Contrasting extracellular enzyme activities of particle-associated bacteria from distinct provinces of the North Atlantic Ocean. *Frontiers in Microbiology*, **3**: 425.

Arrhenius, S. (1889) Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von 463 Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **4**: 226–248.

Artolozaga, I., Valcárcel, M., Ayo, B., Latatu, A., & Iriberrí, I. (2002) Grazing rates of bacterivorous protists inhabiting diverse marine planktonic microenvironments. *Limnology and Oceanography*, **47**: 142–150.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**: 257–263.

Baltar, F., Aristegui, J., Sintés, E., van Aken, H. M., Gasol, J. M., & Herndl, G. J. (2009) Prokaryotic extracellular enzymatic activity in relation to biomass production and respiration in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environmental Microbiology*, **11**: 1998–2014.

- Bauer, M., Kube, M., Telling, H., Richter, M., Lombardot, T., Allers, E., *et al.* (2006) Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes '*Gramella forsetii*' reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environmental Microbiology*, **8**: 2201–2213.
- Benner, R., & Kaiser, K. (2003) Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **48**: 118–128.
- Benner, R., Lay, J., K'nees, E. & Hodson, R. E (1998) Carbon conversion efficiency for bacterial growth on lignocellulose: Implications for detritus-based food webs. *Limnology and Oceanography*, **33(6)**: 1514–1526.
- Benner, R. & Strom, M. (1993) A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Marine Chemistry*, **41**: 153–160.
- Bertilsson, S., Berglund, O., Pullin, M. J. & Chisholm, S. W. (2005) Release of dissolved organic matter by *Prochlorococcus*. *Vie et Milieu*, **55**: 225–232.
- Bhaskar, P. V. & N. B. Bhosle (2008) Bacterial production, glucosidase activity and particle-associated carbohydrates in Dona Paula bay, west coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **80**: 413–424.
- Biddanda, B. & Benner, R. (1997) Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, **42**: 506–518.
- Biddanda, B., Ogdahl, M. & Cotner, J. (2001) Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography*, **46**: 730–739.
- Biddanda, B., Opsahl, S. & Benner, R. (1994). Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, **39**: 1259–75.
- Bier, R. L., Bernhardt, E. S., Boot, C. M., Graham, E. B., Hall, E. K., Lennon, J. T., *et al.* (2015) Linking microbial community structure and microbial processes: an empirical and conceptual overview. *FEMS Microbiology Ecology*, **91**: fiv113.
- Bjørnsen, P. K. (1986) Bacterioplankton growth yield in continuous seawater cultures. *Marine Ecology Progress Series*, **30**: 191–196.

- Bonilla-Findji, O., Gattuso, J. P., Pizay, M. D. & Weinbauer, M. G. (2010) Autotrophic and heterotrophic metabolism of microbial planktonic communities in an oligotrophic coastal marine ecosystem: seasonal dynamics and episodic events. *Biogeosciences*, **7**: 3491–3503.
- Boras, J. A., Sala, M. M., Baltar, F., Arístegui, J., Duarte, C. M. & Vaqué, D. (2010) Effect of viruses and protists on bacteria in eddies of the Canary Current region (subtropical northeast Atlantic). *Limnology and Oceanography*, **55**: 885–898.
- Borsheim, K. Y. (1984) Clearance rates of bacteria-sized particles by freshwater ciliates, measured with monodisperse fluorescent latex beads. *Oecologia*, **63**: 286–288.
- Briand, E., Pringault, O., Jacquet, S. & Torretón, J. P. (2004). The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnology and Oceanography Methods*, **2**: 406–416.
- Brussaard, C. P. D., Kuipers, B. & Veldhuis, M. J. W. (2005) A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics I. Regulatory role of viruses in bloom control. *Harmful Algae*, **4**: 859–874.
- Bryan, J. R., Riley, J. P. & Williams, P. J. leB. (1976). A Winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentration for productivity and related studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **21**: 191–197.
- Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A. & González, M. (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology*, **12**(10).
- Calvo-Díaz, A., Díaz-Perez, L., Suárez, L. A., Morán, X. A. G., Teira, E. & Marañón, E. (2011). Decrease in autotrophic to heterotrophic biomass ratio of picoplankton in oligotrophic marine waters due to bottle enclosure. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 5739–5746.
- Calvo-Díaz, A., Morán, X. A. G. & Suarez, L. A. (2008) Seasonality of picophytoplankton chlorophyll a and biomass in the central Cantabrian Sea, southern Bay of Biscay. *Journal of Marine Systems*, **72**: 271–281.
- Carlson, C. A. (2002) Production and removal processes. In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Hansell, D. A., and Carlson, C. A. (eds). Academic, pp. 91–139.
- Carlson, C. A., del Giorgio, P. A. & Herndl, G. J. (2007) Microbes and the dissipation of energy and respiration: from cells to ecosystems. *Oceanography*, **20**: 61–73.

- Carlson, C. A. & Ducklow, H. W. (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **10**: 69–85.
- Chen, R. F. & Bada, J. L. (1992) The fluorescence of dissolved organic matter in seawater. *Marine Chemistry*, **37**: 191–221.
- Chen, R. F., Zhang, Y., Vlahos, P. & Rudnick, S. M. (2002) The fluorescence of dissolved organic matter in the Mid-Atlantic Bight. *Deep Sea Res Part II*, **49**: 4439–4459.
- Cherrier, J., Bauer, J. E. & Druffel, E. R. M. (1996) Utilization and turnover of labile dissolved organic matter by bacterial heterotrophs in eastern North Pacific surface waters. *Marine Ecology Progress Series*, **139**: 267–279.
- Chipman, L., Huettel, M., Berg, P., Meyer, V., Klimant, I., Glud, R., *et al.* (2012). Oxygen optodes as fast sensors for eddy correlation measurements in aquatic systems. *Limnology and Oceanography: Methods*, **10**: 304–316.
- Cho, B. C. & Azam, F. (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature*, **332**: 441–443.
- Chróst, R. J., & Siuda, W. (2002) Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems. In *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Burns, R. G., and Mitchell, R. (eds). Marcel Dekker, pp. 33–73.
- Chróst, R. J., & Siuda, W. (2006) Microbial production, utilization, and enzymatic degradation of organic matter in the upper trophogenic layer in the pelagic zone of lakes along an eutrophication gradient. *Limnology and Oceanography*, **51**: 749–762.
- Coble, P. G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, **51**: 325–346.
- Coffin, R. B. (1989) Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters. *Limnology and Oceanography*, **34**: 531–542.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J. L., Fichet, T., Friedlingstein, P., *et al.* (2013) Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker, T. F., Qin D., Plattner, G. K. *et al.* (eds.). Cambridge University Press, pp. 1029–1136.

- Comte, J. & del Giorgio, P. A. (2009) Links between resources, C metabolism and the major components of bacterioplankton community structure across a range of freshwater ecosystems. *Environmental Microbiology*, **11**: 1704–1716.
- Comte, J. & del Giorgio, P. A. (2010) Linking the patterns of change in composition and function in bacterioplankton successions along environmental gradients. *Ecology*, **91**(5): 1466–1476.
- Comte, J. & del Giorgio, P. A. (2011) Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. *PLoS One*, **6**(9): e25266.
- Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2000) Natural assemblages of marine *Proteobacteria* and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high- molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1692–1697.
- Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnology and Oceanography*, **48**: 168–178.
- Cottrell, M. T., Michelou, V. K., Nemcek, N., DiTullio, G. & Kirchman, D. L. (2008) Carbon cycling by microbes influenced by light in the Northeast Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **50**: 239–250.
- Crawford, C. C., Hobbie, J. E., Webb, K. L. (1974) The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. *Ecology*, **55**: 551–563.
- Culbertson, C. H. & Huang, S. (1987) Automated amperometric oxygen titration. *Deep-Sea Research*, **34**: 875–880.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic Applied Microbiology*, **22**: 434–444.
- Daneri, G., Riemann, B., Williams, P. J. leB. (1994) *In situ* bacterial production and growth yield measured by thymidine, leucine and fractionated dark oxygen uptake. *Journal of Plankton Research*, **16**: 105–113.
- Dawes, E. A. (1985) Starvation, survival and energy reserves. In *Bacteria in Their Natural Environment*. Fletcher, M. and Foodgate G. D. (eds.). New York Academic Press, pp. 43–79.

- Decho, A. W. & Herndl, G. J. (1995) Microbial activities and the transformation of organic-matter within mucilaginous material. *Science of the Total Environment*, **165**: 33–42.
- del Giorgio, P. A. & Cole, J. J. (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **29**: 503–541.
- del Giorgio, P. A. & Cole, J. J. (2000) Bacterial energetics and growth efficiency. In *Microbial ecology of the oceans*. Kirchman, D. L. (ed.). Wiley-Liss, pp. 289–325.
- del Giorgio, P. A., Condon, R., Bouvier, T., Longnecker, K., Bouvier, C., Sherr, E., *et al.* (2011) Coherent patterns in bacterial growth, growth efficiency, and leucine metabolism along a Northeast Pacific inshore-offshore transect. *Limnology and Oceanography*, **56**: 1–16.
- del Giorgio, P. A., Davis, J. (2003) Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. In *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. Findlay, S. (ed.). Elsevier Science, pp. 399–424.
- del Giorgio, P. A., Fisher, D. & Pace, M. L. (2006) The relationship of bacterial growth efficiency to spatial variation in bacterial activity in the Hudson River. *Aquatic Microbial Ecology*, **45**: 55–67.
- Development core team R (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at: <https://www.R-project.org/>.
- Duarte, C. M., Agustí, S. & Vaqué, D. (2004). Controls on planktonic metabolism in the Bay of Blanes, northwestern Mediterranean litoral. *Limnology and Oceanography*, **49(6)**: 2162–2170.
- Ducklow, H. W. & Carlson, C. A. (1992) Oceanic bacterial production. In *Advances in microbial ecology, Vol 12*. Marshall, K. C. (ed.). Plenum Press, pp. 113-181.
- Edwards, J. L., Smith, D. L., Connolly, J., Mcdonald, J. E., Cox, M. J., Joint, I., *et al.* (2010) Identification of carbohydrate metabolism genes in the metagenome of a marine biofilm community shown to be dominated by *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes*. *Genes*, **1**: 371–384.
- Eichinger, M., Poggiale, J. C., Van Wambeke, F., Lefèvre, D. & Sempéré, R. (2006) Modelling DOC assimilation and bacterial growth efficiency in biodegradation experiments: a case study in the Northeast Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **43(2)**:139–151.

- Eichinger, M., Sempéré, R., Grégori, G., Charrière, B., Poggiale, J. C. & D. Lefèvre (2010) Increased bacterial growth efficiency with environmental variability: results from DOC degradation by bacteria in pure culture experiments. *Biogeosciences Discussions*, **7**:787–822.
- Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S. & Tranvik, L. J. (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3701–3709.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, P., Glöckner, F. O., Gerdt, G. & Amann, R. (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contribution to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5134–5142.
- Elifantz, H., Dittel, A. I., Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2007) Dissolved organic matter assimilation by heterotrophic bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **50**: 39–49.
- Elifantz, H., Malmstrom, R. R., Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2005) Assimilation of polysaccharides and glucose by major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Applied Environmental Microbiology*, **71**: 7799–7805.
- Fandino, L. B., Riemann, L., Steward, G. F. & Azam, F. (2005) Population dynamics of Cytophaga-Flavobacteria during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquatic Microbial Ecology*, **40**: 251–257.
- Fellman, J. B., Hood, E. & Spenser, R. G. M. (2010) Fluorescence spectroscopy opens new window into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography*, **55**: 2452–2462.
- Fenchel, T. (1982) Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as consumers of bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **9**: 35–42.
- Fenchel, T. (2008) The microbial loop – 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **366**: 99–103.
- Findlay, S. E. G. (2003) Bacterial response to variation in dissolved organic matter. In *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Findlay, S. E. G., and Sinsabaugh, R. L. (eds). Academic, pp. 363–377.
- Findlay, S. E. G. & Sinsabaugh, R. L. (2003) Response of hyporheic biofilm metabolism and community structure to nitrogen amendments. *Aquatic Microbial Ecology*, **33**: 127–136.

- Findlay, S. E. G., Sinsabaugh, R. L., Sobczak, W. V. & Hoostal, M. (2003) Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **48**: 1608–1617.
- Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippi, I., Ludwig, W. & Amann, R. (1998) Flow cytometric analysis of *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4973–4982.
- Fuhrman, J. A. (1992) Bacterioplankton role in cycling of organic matter: the microbial food web, In: *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Falkowski, P. G. & Woodhead, A. D. (eds.). Plenum Press, New York, pp. 361–383.
- Fuhrman, J. A. & Azam, F. (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**(6): 1085–1095.
- Fuhrman, J. A. & Azam, F. (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology*, **66**: 109–120.
- Fuhrman, J. A. & Bell, T. M. (1985) Biological considerations in the measurement of dissolved free amino acids in seawater and implications for chemical and microbiological studies. *Marine Ecology Progress Series*, **25**: 13–21.
- Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwabach, M. S., Steele, J. A., Brown, M. V. & Naeem, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 13104–13109.
- Gaarder, T. & Gran, H. H. (1927). Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord. *Rapports et procès-verbaux des réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **42**: 1–48.
- Gasol, J. M. (1994) A framework for the assessment of top-down vs bottom-up control of heterotrophic nanoflagellate abundance. *Marine Ecology Progress Series*, **113**: 291–300.
- Gasol, J. M., Alonso-Sáez, L., Vaqué, D., Baltar, F., Calleja, M. L., Duarte, C. M., *et al.* (2009) Mesopelagic prokaryotic bulk and single-cell heterotrophic activity and community composition in the NW Africa-Canary Islands coastal-transition zone. *Progress in Oceanography*, **83**: 189–196.

- Gasol, J. M. & Arístegui, J. (2007). Cytometric evidence reconciling the toxicity and usefulness of CTC as a marker of bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology*, **46**: 71–83.
- Gasol, J. M. & Morán, X. A. G. (1999). Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **16**: 251–264.
- Gasol, J. M., Pinhassi, J., Alonso-Sáez, L., Ducklow, H. Herndl, G. J., Koblizek, M., *et al.* (2008) Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **53**: 21–38.
- Gattuso, J. P., Peduzzi, S., Pizay, M. D. & Tonolla, M. (2002) Changes in freshwater bacterial community composition during measurements of microbial and community respiration. *Journal of Plankton Research*, **24**: 1197–1206.
- González, J. M., Pedrós-Alió, C. & Gasol, J. M. (2008) Plancton bacteriano de los océanos. *Investigación y Ciencia*, Diciembre: 76–84.
- González, J. M., Sherr, E. & Sherr, B. F. (1990) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, **56(3)**: 583–589.
- Goldman, J. C., Caron, D. A., Dennett, M. R. (1987) Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography*, **32**: 1239–1252.
- Gómez-Pereira, P. R., Schuler, M., Fuchs, B. M., Benke, C. M., Teeling, H., Waldmann, J., *et al.* (2012) Genomic content of uncultured Bacteroidetes from contrasting oceanic provinces in the North Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, **14**: 52–66.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (1983) Methods of seawater analysis. 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim.
- Griess, P. (1858) Vorläufige Notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Amidinitro- und Aminotrophenylsäure. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, **106**: 123–125.
- Griffith, P. C. (1988) A high-precision respirometer for measuring small rates of change in the oxygen concentration of natural waters. *Limnology and Oceanography*, **33**: 632–638.

- Griffiths, R., Caldwell, B., Morita, R. Y. (1984) Observations on microbial percent respiration values in Arctic and Subarctic marine waters and sediments. *Microbial Ecology*, **10**: 151–164.
- Gruber, D. F., Simjouw, J. P., Seitzinger, S. P. & Taghon G. L. (2006) Dynamics and characterization of refractory dissolved organic matter produced by a pure bacterial culture in an experimental predator-prey system. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 4184–4191.
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **35(2)**: 113–121.
- Hammes, F., Vital, M. & Egli, T. (2010) Critical evaluation of the volumetric “bottle effect” on microbial batch growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **76(4)**: 1278–1281.
- Hartwig, E. O. & Michael, J. A. (1978) A sensitive photoelectric Winkler titrator for respiration measurements. *Environmental Science and Technology*, **12**: 712–715.
- Heijnen, J. J. & Van Dijken, J. P. (1992) In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnology Bioengineering*, **39(8)**: 833–858.
- Helm, I., Jalukse, L. & Leito, I. (2012) A highly accurate method for determination of dissolved oxygen: Gravimetric Winkler method. *Analytica chimica acta*, **741**: 21–31.
- Hobbie, J. E. & Crawford, C. C. (1969) Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. *Limnology and Oceanography*, **14**: 528–532.
- Hobbie, J. E., Holm-Hansen, O., Packard, T. H., Pomeroy, L. R., Sheldon, R. W., Thomas, J. P. et al. (1972) A study of the distribution and activity of microorganisms in ocean water. *Limnology and Oceanography*, **17**: 544–555.
- Hopkinson, C. S., Sherr, B. & Wiebe, W. J. (1989). Size fractionated metabolism of coastal microbial plankton. *Marine Ecology Progress Series*, **51**: 155–166.
- Hoppe, H. G. (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, **11**: 299–309.

- Hoppe, H. G., Arnosti, C. & Herndl, G. J. (2002) Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment. In *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Burns, R. G., and Mitchell, R. (eds). Marcel Dekker, pp. 73–108.
- Hörtnagl, P., Pérez, M. T. & Sommaruga, R. (2011) Contrasting effects of ultraviolet radiation on the growth efficiency of freshwater bacteria. *Aquatic Ecology*, **45**: 125–136.
- Huete-Stauffer, T. M., Arandia-Gorostidi, N., Díaz-Pérez, L. & Morán, X. A. G. (2015) Temperature dependences of growth rates and carrying capacities of marine bacteria depart from metabolic theoretical predictions. *FEMS Microbiology Ecology*, **91**: fiv111.
- Iriberry, J., Undurraga, A., Muela, A. & Egea, L. (1985) Heterotrophic bacterial activity in coastal waters: Functional relationship of temperature and phytoplankton population. *Ecological Modelling*, **28**: 113–120.
- Iturriaga, R. & Hoppe, H. G. (1977) Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter. *Marine Biology*, **40**: 101–108.
- Jahnke, R. A. & Craven, D. B. (1995) Quantifying the role of heterotrophic bacteria in the carbon cycle: a need for respiration rate measurements. *Limnology and Oceanography*, **40(2)**: 436–441.
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., *et al.* (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 593–599.
- Johnson, K. M., Wills, K. D. Butler, D. B. Johnson, W. K. & Wong, C. S. (1993). Coulometric total carbon dioxide analysis for marine studies: maximizing the performance of an automated gas extraction system and coulometric detector. *Marine Chemistry*, **44**: 167–187.
- Jürgens, K. & Güde, H. (1994) The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series*, **112**: 169–188.
- Kaiser, K. & Benner, R. (2008) Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnology and Oceanography*, **53**: 99–112.
- Kan, J., Crump, B. C., Wang, K. & Chen, F. (2006) Bacterioplankton community in Chesapeake Bay: predictable or random assemblages. *Limnology and Oceanography*, **51**: 2157–2169.

- Karner, M. & Rassoulzadegan, F. (1995) Extracellular enzyme activity: Indications for high short-term variability in a coastal marine ecosystem. *Microbial Ecology*, **30**: 143–156.
- Kawasaki, N. & Benner, R. (2006) Bacterial release of dissolved organic matter during cell growth and decline: molecular origin and composition. *Limnology and Oceanography*, **51**: 2170–2180.
- Keil, R. G. & Kirchman, D. L. (1999) Utilization of dissolved protein and amino acids in the northern Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**: 293–300.
- Kiene, R. P. & Linn, L. J. (1999) Filter-type and sample handling affect determination of organic substrate uptake by bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **17**: 311–321.
- Kirchman, D. L. (2002) The ecology of Ytrophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, **39**: 91–100.
- Kirchman, D. L., K'nees, E. & Hodson, R. (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied of Environmental Microbiology*, **49**: 599–607.
- Kirchman, D., Ducklow, H. & Mitchell, R. (1982) Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**: 1296–1307.
- Klimant, I., Meyer, V. & Kuehl, M. (1995) Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnology and Oceanography*, **40**: 1159–1165.
- Koike, I., Hara, S., Terauchi, K. & Kogure, K. (1990) Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature*, **345**: 242–244.
- Koskella, B. & Vos, M. (2015) Adaptation in natural microbial populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **46**: 503–522.
- Kowalczyk, P., Cooper, W. J., Durako, M. J., Kahn, A. E., Gonsior, M. & Young, H. (2010) Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Relationship between fluorescence and its components, absorption coefficients and organic carbon concentration. *Marine Chemistry*, **118**: 22–36.
- Kramer, G. D. & Herndl, G. J. (2004) Photo- and bioreactivity of chromoforic dissolved organic matter produced by marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **36**: 239–246.

- Kritzberg, E. S., Cole, J. J. Pace, M. M. & Graneli, W. (2005) Does autochthonous primary production drive variability in bacterial metabolism and growth efficiency in lakes dominated by terrestrial C inputs? *Aquatic Microbial Ecology*, **38**: 103–111.
- Kroer, N., Jørgensen, N. G. & Coffin, R. B. (1994) Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: a comparison of three ecosystems. *Applied Environmental Microbiology*, **60**: 4116–4123.
- Kritzberg, E. S., Langenheder, S. & Lindström, E. S. (2006) Influence of dissolved organic matter source on lake bacterioplankton structure and function: implications for seasonal dynamics of community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**: 406–417.
- Kroer, N. (1993) Bacterial growth efficiency on natural dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **38(6)**: 1282–1290.
- Kubota, K. (2013) CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and Environments*, **28(1)**: 3–12.
- Kujawinski, E. B., Del Vecchio, R., Blough, N. V., Klein, G. C. & Marshall, A. G. (2004) Probing molecular-level transformations of dissolved organic matter: insights on photochemical degradation and protozoan modification of DOM from electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Marine Chemistry*, **92**: 23–37.
- Langdon, C. (1993) Community respiration measurements using a pulsed O<sub>2</sub> electrode. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Cole, J. J. (eds.), Lewis Publisher, pp. 447–453.
- Langenheder, S., Lindström, E. S. & Tranvik, L. J. (2005) Weak coupling between community composition and functioning of aquatic bacteria. *Limnology and Oceanography*, **50**: 957–967.
- Langenheder, S., Lindström, E. S. & Tranvik, L. J. (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 12–220.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., *et al.* (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial ecology*, **19**: 255–267.

- Lee, C. W., Bong, C. W. & Hii, Y. S. (2009) Temporal variation of bacterial respiration and growth efficiency in tropical coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 7594–7601.
- Lee, C. W., Kudo, I., Yokokawa, T., Yanada, M. & Maita, Y. (2002) Dynamics of bacterial respiration and related growth efficiency, dissolved nutrients and dissolved oxygen concentration in a subarctic coastal embayment. *Marine and Freshwater Research*, **53**: 1–7.
- Lefort, T. & Gasol, J. M. (2013) Global-scale distributions of marine surface bacterioplankton groups along gradients of salinity, temperature, and chlorophyll: a meta-analysis of fluorescent in situ hybridization studies. *Aquatic Microbial Ecology*, **70**: 111–130.
- Lemée, R., Rochelle-Newall, E., Van Wambeke, F., Pizay, M. D., Rinaldi, P. & Gattuso, J. P. (2002) Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **29**: 227–237.
- Lennon, J. T. & Cottingham, K. L. (2008) Microbial productivity in variable resource environments. *Ecology*, **89**: 1001–1014.
- Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2004) Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4129–4135.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. & Schleifer, K. H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes* in the natural environment. *Microbiology*, **142**: 1097–1106.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*, **15**: 593–600.
- Maranger, R. J., Pace, M. L., del Giorgio, P. A., Caraco, N. F. & Cole, J. J. (2005) Longitudinal spatial patterns of bacterial production and respiration in a large river–estuary: implications for ecosystem carbon consumption. *Ecosystems*, **8**: 318–330.

- Marie, D., Partensky, F. & Vaulot, D. (1999) Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. *In: Current Protocols in Cytometry*. Robinson, J.P. (eds). John Wiley and Sons, Inc., New York., pp. 11.11.1–11.11.15.
- Martínez, J., Smith, D. C., Steward, G. F. & Azam, F. (1996) Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **10**: 223–300.
- Martínez-García, S., Fernández, E., Aranguren-Gassis, M. & Teira, E. (2009) In vivo electron transport system activity: a method to estimate respiration in natural marine microbial planktonic communities. *Limnology and Oceanography Methods*, **7**: 459–469.
- Massana, R., Gasol, J. M., Bjørnsen, P. K., Blackburn, N., Hagström, Å., Hietanen, S., *et al.* (1997). Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Scientia Marina*, **61**: 397–407.
- Massana, R., Pedros-Alió, C., Casamayor, E. O. & Gasol, J. M. (2001) Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnology and Oceanography*, **46**: 1181–1188.
- McCarthy, M., Hedges, J. I. & Benner, R. (1998) Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science*, **281**: 231–234.
- Meyer, J. L., Edwards, R. T. & Risley, R. (1987) Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. *Microbial Ecology*, **13**: 13–29.
- Meyer, A. F., Lipson, D. A., Martin, A. P., Schadt, C. W. & Schmidt, S. K. (2004) Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 483–489.
- Meyer-Reil, L. A. (1978) Uptake of glucose by bacteria in the sediment. *Marine Biology*, **44**: 293–298.
- Middelboe, M., Jørgensen, N. O. G. & Kroer, N. (1996) Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of non-infected marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 1991–1997.
- Middelboe, M. & Søndergaard, M. (1993) Bacterioplankton growth yield: seasonal variations and coupling to substrate lability and  $\beta$ -glucosidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 3916–3921.

- Middelboe, M., Søndergaard, M., Letarte, Y. & Borch, N. H. (1995) Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microbial Ecology*, **29**: 231–248.
- Miller, M., McKnight, D., Cory, R., Williams, M. & Runkel, R. (2006) Hyporheic exchange and fulvic acid redox reactions in an Alpine stream/wetland ecosystem, Colorado Front Range. *Environmental Science and Technology*, **40**: 5943–5949.
- Miller, W. L. & Morán, M. A. (1997) Interaction of photochemical and microbial processes in the radiation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1317–1324.
- Morán, X. A. G. (2007) Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: a major contribution to carbon fluxes. *Aquatic Microbial Ecology*, **49**: 267–279.
- Morán, X. A. G., Pérez, V. & Fernández, E. (2007) Mismatch between community respiration and the contribution of heterotrophic bacteria in the NE Atlantic open ocean: What causes high respiration in oligotrophic waters?. *Journal of Marine Research*, **65**: 545–560.
- Morán, X. A. G. & Scharek, R. (2015) Photosynthetic parameters and primary production, with focus on large phytoplankton, in a temperate mid-shelf ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **154**: 145–156.
- Moran, M. A., Sheldon, W. M. & Zepp, R. G. (2000) Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **45(6)**: 1254–1264.
- Moran, M. A. & Zepp, R. G. (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1307–1316.
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A. & Giovannoni, S. J. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, **420**: 806–810.
- Motegi, C., Nagata, T., Miki, T., Weinbauer, M. G., Legendre, L. & Rassoulzadegan, F. (2009) Viral control of bacterial growth efficiency in marine pelagic environments. *Limnology and Oceanography*, **54**: 1901–1910.

- Mou, X., Sun, S., Edwards, R. A., Hodson, R. E. & Moran, M. A. (2008) Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature*, **451**: 708–11.
- Nagata, T. (2000) Production mechanisms of dissolved organic matter. In *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D. L. (eds). John Wiley, pp. 121–152.
- Nagata, T. & Kirchman, D. L. (1991) Release of dissolved free and combined amino acids by bacterivorous marine flagellates. *Limnology and Oceanography*, **36**: 433–443.
- Neef, A. (1997) Anwendung der in situ-einzelzell-identifizierung von bakterien zur populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. PhD Thesis. Munich, Germany: Technische Universität München.
- Nelson, C. E. & Craig, A. C. (2005) A nonradioactive assay of bacterial productivity optimized for oligotrophic pelagic environments. *Limnology and Oceanography: Methods*, **3**: 211–220.
- Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A. & Pérez, F. F. (2006) Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. *Limnology and Oceanography*, **51**: 1391–1400.
- Noble, R. T. & Fuhrman, J. A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**: 113–118.
- Norland, S. (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: *Aquatic microbial ecology*. Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Cole, J. J. (eds). Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 303–307.
- Obernosterer, I. & Benner, R. (2004) Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, **49(1)**: 117–124.
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K. & Benner, R. (2001) Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science*, **292**: 917–920.
- Oksanen, J., Blanchet, G. F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., *et al.* (2015) Vegan: community ecology package, R package version 2.3-0.
- Ortega-Retuerta, E., Frazer, T. K., Duarte, C. M., Ruiz-Halpern, S., Tovar-Sánchez, A., Arrieta, J. M. & Reche, I. (2009) Biogeneration of chromoforic dissolved organic matter by bacteria and krill in Southern Ocean. *Limnology and Oceanography*, **54**:1941–1950.

- Packard, T. T., Denis, M., Rodier, M. & Garfield, P. (1988). Deep-ocean metabolic CO<sub>2</sub> production: calculations from ETS activity. *Deep-Sea Research*, **35**: 371–382.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 3094–3101.
- Pinhassi, J., Azam, F., Hemphälä, J., Long, R. A., Martinez, J., Zweifel, U. L. & Hagström, A. (1999) Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic and Microbial Ecology*, **17**: 13–26.
- Pinhassi, J. & Hagström, A. (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**: 245–256.
- Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A. & Marrasé, C. (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 6753–6766.
- Pomeroy, L. R. (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* **24**: 499–504.
- Pomeroy, L. R. & Johannes, R. E. (1966) Total plankton respiration. *Deep-Sea Research*, **13**: 971–973.
- Pomeroy, L. R. & Johannes, R. E. (1968) Occurrence and respiration of ultraplankton in the upper 500 meters of the ocean. *Deep-Sea Research*, **15**: 381–391.
- Pomeroy, L. R., Sheldon, J. E. & Sheldon, W. M. (1994) Changes in bacterial numbers and leucine assimilation during estimations of microbial respiratory rates in seawater by the precision Winkler method. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 328–332.
- Pomeroy, L. R. & Wiebe, W. J. (2001) Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **23**: 187–204.
- Pomeroy, L. R., Williams, P. J. leB., Azam, F., Hobbie, J. E. (2007) The microbial loop. *Oceanography*, **20(2)**: 28–33.
- Porter, K. G. & Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, **25**: 943–948.
- Pradeep Ram, A. S., Nair, S. & Chandramohan, D. (2003) Bacterial growth efficiency in the tropical estuarine and coastal waters of Goa, southwest coast of India. *Microbial Ecology*, **45**: 88–96.

- Pringault, O., Tesson, S. & Rochelle-Newall, E. (2009) Respiration in the light and bacterio-phytoplankton coupling in a coastal environment. *Microbiology of Aquatic Systems*, **57**: 321–334.
- Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L. & Giovannoni, S. J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, **418**: 630–633.
- Reche, I., Pace, M. L. & Cole, J. J. (1998) Interactions of photobleaching and inorganic nutrients in determining bacterial growth on colored dissolved organic carbon. *Microbial Ecology*, **36(3-4)**: 270–280.
- Reinthalder, T. & Herndl, J. (2005) Seasonal dynamics of bacterial growth efficiencies in relation to phytoplankton in the southern North Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **39**: 7–16.
- Revsbech, N. P. (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnology and Oceanography*, **34**: 472–476.
- Riemann, L., Steward, G. F. & Azam, F. (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 578–587.
- Rivkin, R. B. & Legendre, L. (2001) Biogenic carbon cycling in the upper ocean: effects of microbial respiration. *Science*, **291**: 2398–2400.
- Robinson, C. (2008). Heterotrophic bacterial respiration. In: *Microbial ecology of the oceans*. Kirchman, D. L. (ed). Wiley-Liss, New York, NY, pp. 299–334.
- Robinson, C. & Williams, P. J. leB. (1999). Plankton net community production and dark respiration in the Arabian Sea during September 1994. *Deep-Sea Research Part II*, **46**: 745–765.
- Robinson, C. & Williams, P. J. leB. (2005). Respiration and its measurement in surface marine waters. In: *Respiration in aquatic ecosystems*. del Giorgio, P. A. & Williams, P. J. leB. (eds.). Oxford University Press, New York, NY, pp. 147–180.
- Roland, F. & Cole, J. J. Regulation of bacterial growth efficiency in a large turbid estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**: 31–38.
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Álvarez-Salgado X. A., Gasol, J. M & Marrasé, C. (2010) Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, **55**: 446–454.

- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Álvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M. & Marrasé, C. (2011) Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 7490–7498.
- Rooney-Varga, J. N., Giewat, M. W., Savin, M. C., Sood, S., LeGresley, M. & Martin, J. L. (2005) Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*, **49**: 163–175.
- Rosenstock, B. & Simon, M. (1993) Use of dissolved combined and free amino acids by planktonic bacteria in Lake Constance. *Limnology and Oceanography*, **38**: 1521–1531.
- Russell, J. B. & Cook, G. M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, **59**(1): 48–62.
- Sapp, M. Wichels, A., Wiltshire, K. H. & Gerds, G. (2007) Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**: 622–637.
- Sarmiento, H. & Gasol, J. M. (2012) Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environmental Microbiology*, **14**: 2348–2360.
- Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S. & Tréguer, P. (2005) Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*, **53**: 25–42.
- Schäfer, H., Servais, P. & Muyzer, G. (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Archives of Microbiology*, **173**: 138–145.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. & Massana, R. (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**: 163–174.
- Schmitt-Kolpin, P., Hertkorn, N., Schulten, H. R. & Kettrup, A. (1998) Structural changes in a dissolved soil humic acid during photochemical degradation processes under O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> atmosphere. *Environmental Science and Technology*, **32**: 2531–2541.
- Serret, P., Fernández, E., Sostres, J. A. & Anadón, R. (1999) Seasonal compensation of microbial production and respiration in a temperate sea. *Marine Ecology Progress Series*, **187**: 43–57.

- Sharp, J. H. (2002) Analytical methods for total DOM pools. In *Biogeochemistry of Marine DOM*. Hansell, D. A., and Carlson, C. A. (eds). Academic, pp. 35–58.
- Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1996) Temporal offset in oceanic production and respiration process implied by seasonal changes in atmospheric oxygen: the role of heterotrophic microbes. *Aquatic Microbial Ecology*, **11**: 91–100.
- Sherr, E. B., Sherr, B. F. & Sigmon, C. T. (1999) Activity of marine bacteria under incubated and *in situ* conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**: 213–223.
- Sherry, N. D., Imanian, B., Sugimoto, K., Boyd, P. W. & Harrison, P. J. (2002) Seasonal and interannual trends in heterotrophic bacterial processes between 1995 and 1999 in the subarctic NE Pacific. *Deep-Sea Research II*, **49**: 5775–5791.
- Simon, M. & Azam, F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **51**: 201–213.
- Sinsabaugh, R. L., Findlay, S., Franchini, P. & Fischer, D. (1997) Enzymatic analysis of riverine bacterioplankton production. *Limnology and Oceanography*, **42**: 29–38.
- Sintes, E., Witte, H., Stodderegger, K., Steiner, P. & Herndl, G. J. (2013) Temporal dynamics in the free-living bacterial community composition in the coastal North Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, **83**: 413–424.
- Sjöstedt, J., Koch-Schmidt, P., Pontarp, M., Canback, B., Tunlid, A., Lundberg, P., *et al.* (2012) Recruitment of members from the rare biosphere of marine bacterioplankton communities after an environmental disturbance. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 1361–1369.
- Smith, E. M. & Kemp, W. M. (2003) Planktonic and bacterial respiration along an estuarine gradient: responses to carbon and nutrient enrichment. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**: 251–261.
- Smith, E. M. & Prairie, Y. T. (2004) Bacterial metabolism and growth efficiency in lakes: The importance of phosphorus availability. *Limnology and Oceanography*, **49**: 137–147.
- Stedmon, C. A., Markager, S. & Bro, R. (2003) Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, **82**: 239–254.
- Steele, J. H. (1976) *The Structure of Marine Ecosystems*. Harvard Univ. Press.

- Steinberg, D. K., Nelson, N. B., Carlson, C. A. & Prusak, A. C. (2004) Production of chromoforic dissolved organic matter (CDOM) in the open ocean by zooplankton and the colonial cyanobacterium *Trichodesmium* spp. *Marine Ecology Progress Series*, **267**: 45–56.
- Steward, G. F. & Azam, F. (1999) Bromodeoxyuridine as an alternative to 3H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquatic Microbial Ecology*, **19**: 57–66.
- Strom, S. L., Benner, R., Ziegler, S. & Dagg, M. J. (1997) Planktonic grazers are a potentially important source of marine dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1364–1374.
- Suzuki, R. & Shimodaira, H. (2006) Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, **22 (12)**: 1540–1542.
- Taylor, G. T., Iturriaga, R. & Sullivan, C. W. (1985) Interactions of bacterivorous grazers and heterotrophic bacteria with dissolved organic matter. *Marine Ecology Progress Series*, **23**: 129–141.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., *et al.*, (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, **336**: 608–611.
- Teira, E., Gasol, J. M., Aranguren-Gassis, M., Fernández, A., González, J., Lekunberri, I., *et al.*, (2008) Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem. *Environmental Microbiology*, **10**: 906–917.
- Teira, E., Martínez-García, S., Calvo-Díaz, A. & Morán, X. A. G. (2010) Effects of inorganic and organic nutrient inputs on bacterioplankton community composition along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **60**: 299–313.
- Tempest, D. W. & Neijssel, O. M. Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. *FEMS Microbiology Letters*, **100**: 169–176.
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M. & Michel, G. (2011) Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, **2**: 93.
- Tison, D. & Pope, D. H. (1980) Effect of temperature on mineralization by heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **39(3)**: 584–587.

- Toolan, T. (2001) Coulometric carbon-based respiration rates and estimates of bacterioplankton growth efficiencies in Massachusetts Bay. *Limnology and Oceanography*, **46**: 1298–1308.
- Tortell, P. D., Maldonado, M. T. & Price, N. M. (1996) The role of heterotrophic bacteria in iron-limited ocean ecosystems. *Nature*, **383**: 330–332.
- Touratier, F., Legendre, L. & Vézina, A. (1999) Model of bacterial growth influences by substrate C:N ratio and concentration. *Aquatic Microbial Ecology*, **19**: 105–118.
- Tranvik, L. J. & Bertilsson, S. (2001) Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. *Ecology Letters*, **4**: 458–463.
- Urban-Rich, J., McCarty, J. T., Fernández, D. & Acuña, J. L. (2006) Larvaceans and copepods excrete fluorescent dissolved organic matter (FDOM). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **332**: 96–105.
- Wakeham, S. G., Pease, T. K. & Benner, R. (2003) Hydroxy fatty acids in marine dissolved organic matter as indicators of bacterial membrane material. *Organic Geochemistry*, **34**: 857–868.
- Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, **14**: 136–143.
- Warkentin, M., Freese, H. M., Karsten, U. & Schumann, R. (2007). New and fast method to quantify respiration rates of bacterial and plankton communities in freshwater ecosystems by using optical oxygen sensor spots. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6722–6729.
- Warkentin, M., Freese, H. M. & Schumann, R. (2011) Bacterial activity and bacterioplankton diversity in the eutrophic river Warnow: direct measurement of bacterial growth efficiency and its effect on carbon utilization. *Microbial Ecology*, **61**: 190–200.
- Wasmund, N., Nausch, G. & Feistel, R. (2013) Silicate consumption: an indicator for long-term trends in spring diatom development in the Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*, **35**: 393–406.
- Wieser, W. (1994) Cost of growth in cells and organisms: general rules and comparative aspects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **69**(1): 1–33.

- Wikner, J., Panigrahi, S., Nydahl, A., Lunberg, E., Bamstedt, U. & Tengberg, A. (2013) Precise continuous measurements of pelagic respiration in coastal waters with oxygen optodes. *Limnology and Oceanography: Methods*, **11**: 1–15.
- Williams, P. J. leB. (1981) Microbial contribution to overall marine plankton metabolism: direct measurements of respiration. *Oceanologica Acta*, **4(3)**: 359–364.
- Williams, P. J. leB. & del Giorgio, P. A. (2005). Respiration in aquatic ecosystems: history and background. In: *Respiration in aquatic ecosystems*. del Giorgio, P. A. & Williams, P. J. leB. (eds). Oxford University Press, New York, NY, pp. 147–180.
- Williams, P. J. leB. & Jenkinson, N. W. (1982) A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnology and Oceanography*, **27**: 576–584.
- Worden, A. Z., Nolan, J. K. & Palenik, B. (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography*, **49**: 168–179.
- Wright, R. T. & Hobbie, J. E. (1965) The uptake of organic solutes in lake water. *Limnology and Oceanography*, **10(1)**: 22–28.
- Yamada, N. & Tanoue, E. (2003) Detection and partial characterization of dissolved glycoproteins in oceanic waters. *Limnology and Oceanography*, **48**: 1037–1048.
- Yamashita, Y. & Tanoue, E. (2008) Production of bio-refractory fluorescent dissolved organic matter in the ocean interior. *Nature Geoscience*, **1**: 579–582.
- Zobell, C. E. (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews*, **10(1-2)**: 1–49.



The image features a light blue background with several white circles of varying sizes scattered throughout, resembling bubbles. Overlaid on this background are stylized, flowing shapes in shades of teal and dark teal, which resemble waves or decorative flourishes. The text "MATERIAL SUPLEMENTARIO" is centered in the middle of the image.

**MATERIAL  
SUPLEMENTARIO**



**Tabla suplementaria TS.1.** Valores de respiración bacteriana determinados en tiempos de incubación  $\leq 6$  horas (RB1) y  $\geq 12$  horas (RB2) mediante microsensores de oxígeno en 120 muestras de agua de mar superficial del Cantábrico oriental.

RB1 ( $\leq 6$ h)			RB2 ( $\geq 12$ h)		
Número muestra	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	
1	2,1	26,8	12,0	33,6	
2	4,9	145,8	12,0	517,0	
3	4,9	206,8	12,0	539,4	
4	5,9	142,8	12,0	188,3	
5	6,0	58,7	12,0	368,9	
6	6,0	17,2	12,0	359,8	
7	5,2	46,4	19,7	693,5	
8	5,2	36,1	20,2	861,7	
9	3,9	36,5	24,0	430,4	
10	5,8	106,4	24,0	704,0	
11	5,4	48,4	20,0	656,7	
12	5,4	312,0	20,0	412,1	
13	3,5	146,3	14,5	527,6	
14	1,6	139,5	14,5	196,0	
15	3,9	109,6	12,0	367,5	
16	3,9	132,2	12,0	366,7	
17	6,0	0,5	12,0	153,7	
18	6,0	65,4	12,0	292,0	
*19	6,0	257,5	12,0	794,1	
*20	6,0	176,2	12,0	1474,4	
**21	6,0	119,3	12,7	283,9	
**22	6,0	63,7	12,7	136,9	
*23	6,0	27,0	12,0	61,3	
*24	6,0	78,7	12,0	138,2	
**25	4,4	343,4	12,0	995,7	
**26	4,4	297,7	12,0	1027,1	
*27	5,0	115,0	12,0	552,2	
*28	5,0	62,3	12,0	518,9	
**29	6,0	71,1	14,3	176,3	
**30	6,0	56,5	14,3	177,6	
*31	6,0	2,6	14,8	34,3	
*32	6,0	6,0	14,8	23,4	
**33	6,0	117,5	12,0	186,7	
**34	2,1	161,1	12,0	298,1	
*35	6,0	79,6	24,0	164,6	
*36	6,0	52,0	24,0	120,3	
**37	6,0	23,8	12,7	63,3	
**38	6,0	68,5	12,7	109,4	
*39	6,0	4,8	24,0	116,3	
*40	6,0	25,5	24,0	59,9	

RB1 ( $\leq 6$ h)			RB2 ( $\geq 12$ h)		
Número muestra	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	
41	3,5	31,8	14,2	43,3	
42	4,3	95,1	14,2	541,5	
43	6,0	18,8	14,2	201,2	
44	4,0	6,9	14,1	18,8	
45	3,0	7,5	14,1	13,4	
46	3,4	2,2	14,1	16,1	
47	3,4	7,1	14,1	25,2	
48	2,4	21,9	14,0	26,8	
49	6,0	41,2	14,6	108,2	
50	6,0	64,8	14,6	155,0	
51	4,0	25,5	12,7	37,6	
52	3,4	28,0	12,7	39,0	
53	6,0	28,9	18,1	40,9	
54	1,5	27,2	19,1	76,3	
55	1,5	61,0	19,1	78,0	
56	1,5	9,0	19,1	65,6	
57	6,0	136,2	18,9	160,6	
58	6,0	137,9	18,9	253,5	
59	5,8	94,8	18,5	143,6	
60	5,8	57,0	18,5	182,0	
61	2,3	8,8	18,5	77,9	
62	2,3	63,4	18,1	154,9	
63	3,9	116,6	18,5	134,8	
64	3,9	88,0	18,5	150,3	
65	6,0	70,0	12,7	145,2	
66	6,0	85,2	12,7	207,3	
67	6,0	46,4	13,1	107,1	
68	4,5	74,2	13,1	170,2	
69	5,2	25,1	16,6	195,1	
70	5,2	41,5	16,6	178,4	
71	1,0	58,2	14,5	132,2	
72	2,7	101,1	14,5	136,1	
73	6,0	22,3	17,5	239,1	
74	3,8	77,6	17,5	349,7	
75	6,0	21,4	17,4	134,5	
76	5,2	22,1	17,4	169,5	
77	6,0	24,0	17,5	194,3	
78	6,0	12,7	17,5	255,8	
79	6,0	54,0	17,8	200,0	
80	3,5	54,9	17,8	280,8	

RB1 ( $\leq 6$ h)			RB2 ( $\geq 12$ h)		
Número muestra	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	Incubación (h)	Respiración $\mu\text{gC l}^{-1} \text{ día}^{-1}$	
81	6,0	37,4	16,1	75,1	
82	2,0	80,9	16,2	232,2	
83	5,3	24,9	16,7	77,2	
84	2,0	38,9	16,6	199,4	
85	5,0	28,9	16,8	78,7	
86	2,3	59,8	16,8	548,0	
87	5,0	70,4	16,6	80,6	
88	1,1	64,7	16,6	196,0	
89	6,0	57,8	20,1	31,3	
90	6,0	64,0	20,1	83,2	
91	6,0	54,7	20,7	57,8	
92	6,0	6,9	20,7	20,4	
93	4,3	28,6	20,7	441,4	
94	6,0	15,6	20,7	117,7	
95	3,4	58,4	20,7	74,1	
96	4,3	31,3	20,7	93,2	
97	4,1	39,8	16,7	73,4	
98	2,1	133,2	12,0	308,0	
99	3,6	48,2	16,7	108,2	
100	2,4	104,0	12,0	264,6	
101	6,0	59,1	14,7	139,8	
102	6,0	72,8	16,7	134,0	
103	5,1	54,6	16,8	74,5	
104	5,2	111,5	12,0	321,5	
105	4,5	170,8	16,6	257,2	
106	6,0	193,5	16,6	206,8	
107	4,9	140,7	12,6	143,8	
108	4,9	87,4	12,6	93,7	
109	3,8	59,3	16,6	65,3	
110	2,4	18,1	16,6	18,1	
111	6,0	5,0	16,6	21,2	
112	6,0	46,1	12,0	212,4	
113	5,8	91,1	17,5	170,5	
114	5,9	181,8	17,5	235,2	
115	3,4	92,9	17,4	248,1	
116	3,4	164,7	17,4	253,6	
117	5,2	68,9	16,8	245,0	
118	5,2	129,2	16,8	312,4	
119	6,0	74,1	16,9	150,3	
120	6,0	125,8	16,9	195,9	

**Tabla suplementaria TS.2.** Coeficientes de correlación Rho de Spearman de las relaciones estadísticamente significativas entre las diferentes variables analizadas. En rosa las correlaciones negativas y en azul las positivas. COD: carbono orgánico disuelto; MODF<sub>Humic</sub>: material húmico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot</sub>: material proteico disuelto fluorescente; MODF<sub>Prot:Humic</sub>: Ratio entre MODF<sub>Prot</sub> y MODF<sub>Humic</sub>; α-Glu / β-Glu: Ratio entre las actividades enzimáticas extracelulares α- y β-glucosidasa; sp: actividades específicas. Significativas a \* p < 0,05 o a \*\* p < 0,01.

