

**BAKTERIOEN  
HAZKUNTZA-EFIZIENTZIAREN  
ALDAKORTASUNA  
KOSTALDEKO  
ITSAS-SISTEMETAN**

**Zuriñe Baña García  
2020**

## Doktorego-tesia

---

# BAKTERIOEN HAZKUNTZA- EFIZIENTZIAREN ALDAKORTASUNA KOSTALDEKO ITSAS-SISTEMETAN

---

**Zuriñe Baña García**

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

Zuzendariak:

**Dra. Begoña Ayo Millán**

**Dr. Juan Iriberry Ramalle**



Leioa, 2020



# Aurkibidea

<b>SARRERA OROKORRA .....</b>	<b>2</b>
Prokariotoak eta ur-sistemetako karbono-fluxua .....	3
Bakterioen hazkuntza-efizientzia .....	5
Alderdi metodologikoak.....	6
Faktore erregulatzailak .....	9
<i>Materia organikoa eta mantenugai ez-organikoak.....</i>	<i>9</i>
<i>Temperatura .....</i>	<i>11</i>
<i>Bakterio-komunitatearen konposizioa.....</i>	<i>11</i>
<i>Aktibitate maila .....</i>	<i>12</i>
<b>HELBURUAK.....</b>	<b>14</b>
<b>1. KAPITULUA: .....</b>	<b>18</b>
<b>Bakterioen arnasketaren neurri zehatzak oxigeno-mikrosentsoreen eta inkubazio-denbora laburren bidez .....</b>	<b>18</b>
Laburpena .....	20
Sarrera.....	21
Materialak eta metodoak.....	24
<i>Laginketa estrategia .....</i>	<i>24</i>
<i>Bakterioen arnasketa.....</i>	<i>25</i>
<i>Bakterioen dentsitatea eta biomasa .....</i>	<i>26</i>
<i>Bakterioen ekoizpena .....</i>	<i>27</i>
<i>Bakterioen komunitatearen konposizioa .....</i>	<i>28</i>
<i>Analisa estatistikoa.....</i>	<i>29</i>
Emitzak.....	29
<i>Oxigenoaren jaitsieraren dinamikak.....</i>	<i>29</i>
<i>Bakterioen arnasketaren neurriak.....</i>	<i>30</i>
<i>Aldaketak bakterioen komunitatean inkubazioan zehar .....</i>	<i>35</i>
Eztabaida.....	38

**2. KAPITULUA: ..... 43**

**Protozoo bakteriboroen harraparitzak disolbatutako materia organikoan eragindako eraldaketek bakterioen metabolismoan aldaketak sortzen ditu... 43**

Laburpena .....45

Sarrera.....46

Materialak eta metodoak.....49

*Laginketa eta prozedura esperimentalak* .....49

*Mikroorganismoen dentsitatea* .....53

*Bakterioen ekoizpena* .....53

*Bakterioen arnasketa*.....54

*Bakterioen hazkuntza-efizientzia eta karbono-eskaria* .....55

*Zelulaz kanpoko entzima-jarduerak*.....55

*Bakterio-komunitatearen konposizioa*.....56

*Disolbatutako karbono organikoaren neurketa* .....56

*Disolbatutako materia organiko fluoreszentearen neurketa*.....57

*Analisia estatistikoa*.....58

Emaizak .....58

*I. Fasea: Disolbatutako materia organiko eraldatuaren bilketa eta karakterizazioa* .....58

*II. Fasea: Tratamenduak. Kantauri eta Mediterraneo Itsasoetako bakterio-komunitateen ezaugarriak*.....61

*II. Fasea: Tratamenduak. Biologikoki eraldatu dagoen disolbatutako materia organikoaren eragina bakterioen jarduera metabolikoan* .....64

Eztabaida .....67

**3. KAPITULUA: ..... 76**

**Bakterioen hazkuntza-efizientziaren erabilpena ingurumen aldaketen aurrean duten egokitzapen mailaren isla gisa. .... 76**

Laburpena .....78

Sarrera.....79

Materialak eta metodoak.....81

*Laginketa estrategia* .....81

*Mikroorganismoen dentsitatea* .....82

*Bakterioen komunitatearen konposizioa* .....83

<i>Bakterioen metabolismoa eta zelulaz kanpoko entzima-jarduera .....</i>	<i>84</i>
<i>Ingurumen faktoreak .....</i>	<i>86</i>
<i>Analisa estatistikoak .....</i>	<i>88</i>
Emaitzak .....	89
<i>Urtaroko patroia .....</i>	<i>89</i>
<i>Bakterioen metabolismoa eta zelulaz kanpoko entzima-jarduera .....</i>	<i>97</i>
<i>Bakterio-komunitatearen konposizioa.....</i>	<i>99</i>
Eztabaida .....	102
<b>EZTABAIDA OROKORRA .....</b>	<b>108</b>
<b>ONDORIOAK .....</b>	<b>117</b>
<b>ERREFERENTZIAK .....</b>	<b>121</b>
<b>MATERIAL GEHIGARRIA .....</b>	<b>149</b>





SARRERA  
OROKORRA

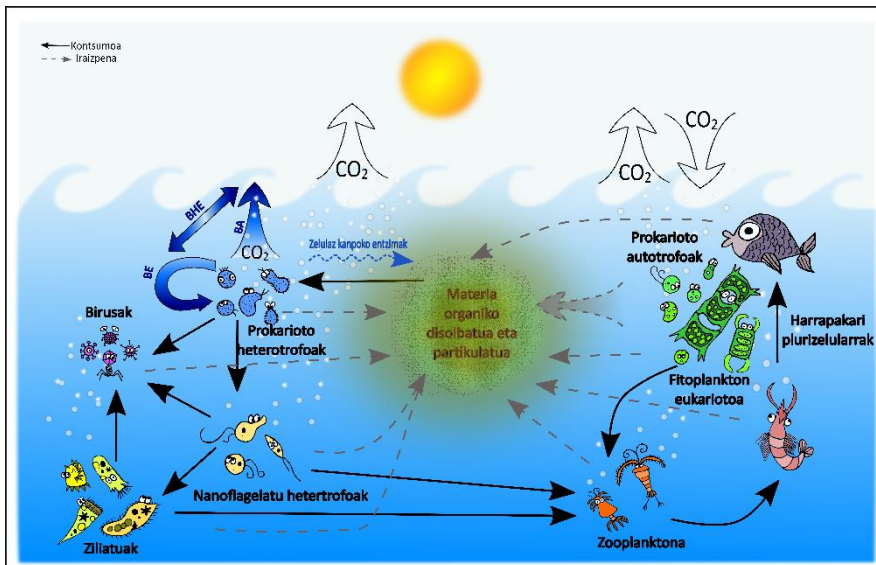




## Prokariotoak eta ur-sistemetako karbono-fluxua

Ozeanoek gure planetaren %71 hartzen dute, eta batez beste 4.000 metroko sakonera dute. Ur gaziko masa handi bat osatzen dute, non mikroorganismoek dentsitate eta jarduera talde biologiko nagusia osatzen duten (González *et al.*, 2008). Kalkuluen arabera, itsasoko uraren mililitro bakoitzeko  $10^6$  prokarioto,  $10^3$  nanoflagelatu heterotrofo eta  $10^9$  partikula biriko aurki ditzakegu, besteak beste (Fenchel, 2008). Kopuru handia izan arren, ur zutabean mikroorganismoen funtzioa gutxietsi egin zen denbora luzez, eta itsasoko katea trofikoaren eta karbono fluxuaren ereduaren baztertuta utzi zen neurri handi batean. Prokarioto gehienak metabolikoki inaktiboak zirela uste zen, hainbat hamarkadatan zehar plaken zenbaketak erabiliz ikertu eta kuantifikatu ziren arren (Zobell, 1946). Karbonoaren zikloan benetan garrantzitsuak organismo fitoplanktoniko handiak bakarrik zirela uste zen, batez ere diatomeoak eta dinoflagelatuak, zooplanktonarentzako elikagai bezala balio zutenak. Hauek aldi berean arrain txikienezko elikagai bezala balio zuten, katea trofiko klasiko bezala ezagutzen zena sortuz (Steele, 1976). Mikrobiologiari aplikatutako tekniken hobekuntzek, hala nola epifluoreszentzia mikroskopia bidezko prokariotoen zenbaketak edo  $^{14}\text{C}$ -az markatutako glukosa eta aminoazidoak erabiltzeak, frogatu zuten prokariotoen zati handi bat metabolikoki aktibo zegoela (Wright & Hobbie, 1965; Hobbie *et al.*, 1972; Meyer-Reil, 1978), eta  $\text{O}_2$  kantitate handiak xurgatzeko gai zirela (Pomeroy, 1974). 80ko hamarkadara arte ez zen onartu prokariotoek ur-sistemetako materia organikoaren deskonposizioan eta birmineralizazioan eta mantenugai ez-organikoen birziklapenean zuten zeregina (Williams, 1981; Kirchman *et al.*, 1982). Aurkikuntza horiek erabat aldatu zuten ordura arte ur-sistemetan karbonoaren fluxuari buruz zegoen ikuspegia. Garai honetan, ur-zutabeko prokariotoen dentsitatea nahiko konstantea izatea, nagusiki flagelatu heterotrofoen (Fenchel, 1982) eta ziliatuen (Borsheim, 1984) jarduerak kontrolatzen zutela ere frogatu zen. Azam eta laguntzaileek (1983) "begizta mikrobiarra" terminoa ezarri zuten lehen aldiz, itsas komunitate planktonikoen egituraren ikuspegi klasikoa osatu gabea zela erakutsiz, eta disolbatutako karbono organikoaren

birmineralizazioaren ardatz nagusian mikrobio-komunitatea jarriz (0.1. Irudia). Denborarekin, begizta mikrobiarrean eginkizun garrantzitsuak dituzten talde funtzional berriak ezagutu ziren; hala nola, bakterio fotosintetikoek karbono atmosferikoaren finkapenean duten inplikazioa, birusak mikrobioen zelulalisiaren eta materia organikoaren birziklapenaren kausa garrantzitsu gisa, edo gaitasun fotosintetikoak eta fagotrofoak dituzten protozoo mixotrofoen presentzia (Pomeroy *et al.*, 2007).



**0.1. Irudia.** Karbono-fluxua itsasoko sare trofikoaren bidez. BE: Bakterioen ekoizpena; BA: Bakterioen arnasketa; BHE: Bakterioen hazkuntza-efizientzia.

Frogatu da mikrometro baten tamainako prokarioto batek oso tasa metaboliko handiak lor ditzakela eta ozeanoko prokariotoen masa totalak zooplanktonen eta arrainen masa konbinatua gainditzen duela (Pomeroy *et al.*, 2007). Horregatik, gaur egun onartzen da prokarioto heterotrofoen jarduerak zehazten duela, nagusiki, ur-sistemetan sortutako disolbatutako karbono organikoaren norakoa. Alde batetik, goiko maila trofikoekiko konexio gisa jarduten dute, plankton fotosintetikoak sortutako materia organikoa bere biomasara gehituz, eta karbono eta energia horren zati bat goiko maila trofikoetara bideratuz; lehenengo protozoo fagotrofo eta mixotrofoetara, ondoren zooplanktonera pasatzen dena, eta, azkenik, arrain eta zetazeoetara. Bestalde, prokarioto planktoniko

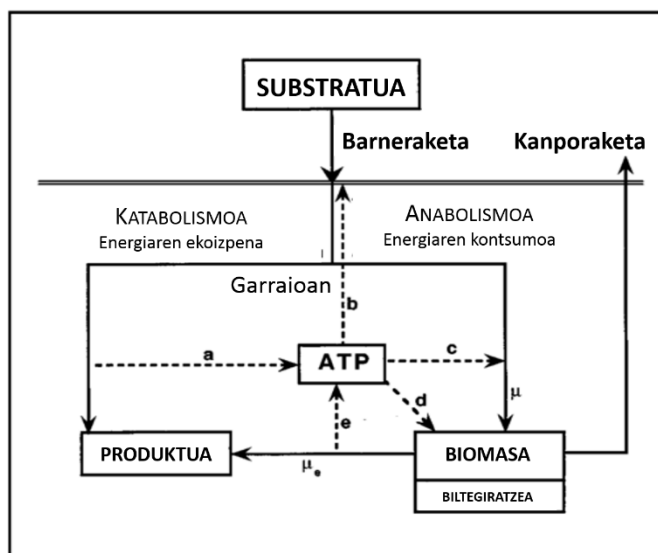
heterotrofoek sartutako disolbatutako karbonoaren zati bat arnastu egiten da, eta atmosferara askatzen da berriro CO<sub>2</sub> moduan. Prozesatutako materia organikoaren beste zati bat bere hazkuntzarekin lotutako irazpen-mekanismoen bidez iraz daiteke, nitrogenoaren, fosforoaren eta sulfuroaren birziklapenean lagunduz. Prozesu horren bidez, gainera, ur-sistemetak materia organiko errekalzitratzearen epe luzeko biltegitratzean laguntzen dute, karbono-ponpa mikrobiarraren bidez (Buchan *et al.*, 2014). Baina prokariotoen komunitatearen bitarteko karbono organikoaren fluxuaren magnitudea zein den ezezaguna da oraindik. Ikerketa gehiago behar da jardura prokariotoek ur-sistemetak karbono-fluxuan nola eragiten duten jakiteko, eta era horretan, prokariotoen papera eredu biogeokimiko prediktiboetan integratzeko.

Hemendik aurrera, bakterio terminoa erabiliko da prokariotoak aipatzeko, lan hau Kantauri Ekialdeko kostaldeko uretan egin baitzen, non arkeoek komunitate osoari egiten dioten ekarpena oso txikia den (%1 - 6) (Alonso-Sáez *et al.*, 2009).

### **Bakterioen hazkuntza-efizientzia**

Gaur egun ez dago baliabide zuzenik bakterioplanktonaren bitartez ematen den disolbatutako karbono organikoaren fluxua neurtzeko, batez ere muga metodologikoen ondorioz. Hurbilketa praktikoa gisa, horren ordez, bakterioen hazkuntza-efizientzia estimatzen da (Ducklow & Carlson, 1992), zein biomasa eratzeko erabiltzen den kontsumitutako disolbatutako karbono organikoaren frakzioa bezala definitzen den. Aldagai hau bakterio batek barneratutako substratu organikoak ATP sortzeko erabiltzen diren erreakzio katabolikoen isla da, baita biomasaren parte izango diren biomolekulen eta ingurunean askatzen diren biltegitratze-produktuetan eta konposatu organikoaren sintesirako erabiltzen diren erreakzio anabolikoen isla ere (0.2. Irudia) (Giorgio & Cole, 1998). bakterioen hazkuntza-efizientzia, beraz, funtsezkoa da bakterio heterotrofoek ur-sistematan duten eginkizun ekologikoa eta biogeokimikoa zehazteko (Giorgio & Cole, 1998). Garrantzi ekologikoa duen arren, bakterioen hazkuntza-efizientiaren estimazioa eta ulermena neurketen aldakortasunak eta faktore erregulatuzaileen ziurgabetasunak mugatzen dute. Gainera, bakterioek katabolismoaren eta

anabolismoaren arteko akoplamendua alda dezakete, hazkuntza ingurumen-baldintzen arabera maximizatzeko (Tempest & Neijssel, 1992; Russell & Cook, 1995), energia-kostua handituz hazkuntza mugatuta dagoenean; horrek are gehiago zailtzen du ur-sistema naturaletan bakterioen hazkuntza-efizientzia aurreikustea.



**0.2. Irudia.** Bakterioen hazkuntza-efizientzian eragina duten bide kataboliken eta anabolikoen irudikapen sinplifikatua: a: konposatu organikoen oxidazio-abiadura eta ATParen sorrera-abiadura; b: substratuak zelularen barnerantz aktiboki garraiatzera bideratutako ATParen kontsumo-abiadura; c: ATParen kontsumo-abiadura (erreakzio anabolikoetan erabilita); d: ATParen kontsumo-abiadura (zelulatik kanpo askatzen diren molekula organikoen sintesian erabilita) Konposatu endogenoen oxidaziora bideratutako ATParen sorrera-abiadura;  $\mu$ : hazkuntza-tasa;  $\mu_e$ : metabolismo endogenoa, non  $\mu = 0$  (Giorgio & Cole, 1998tik aldatuta).

## Alderdi metodologikoak

Bakterioen hazkuntza-efizientziaren neurketarekin lotutako arazo metodologikoak aldagai horren balioan hautemandako aldakortasunaren kausa izan liteke (Briand *et al.*, 2004; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b), eta, beraz, oraindik beharrezkoa da metodologia sendo bat ur-sistemetan karbonoaren fluxuaren magnitudea neurtzeko eta ulertzeko. Tradizioz, bakterioen hazkuntza-efizientzia zeharka kalkulatu zen substratu sinpleak erabiliz, gehienetan labilak, %50 eta %97 arteko hazkuntza-efizientzia sortzen zituztenak (Hobbie & Crawford, 1969;

Williams, 1981; Bjornsen, 1986). Balio horiek ez zuten nahitaz islatzen bakterio-komunitatea nola ari zen hazten ur-sistema natural batean aurki daitezkeen substratu organikoen nahasketa konplexutik abiatuta (Meyer *et al.*, 1987). Gaur egun ez da metodologia hori erabiltzen, eta oso onartuta dago ur-sistema gehienetan bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioak %40 baino txikiagoak direla (Giorgio & Cole, 1998; Toolan, 2001; Pradeep Ram *et al.*, 2003; Reinhthaler & Herndl, 2005). Bakterioen hazkuntza-efizientzia zeharka ere neur daiteke disolbatutako karbono organikoaren degradazio-esperimentuen bidez (Carlson & Ducklow, 1996; Cherrier *et al.*, 1996; del Giorgio & Davis, 2003), non bere kontsumoa (disolbatutako karbono organikoaren desagertze gisa neurtuta) bakterio-biomasaren hazkuntzarekin edo karbono organiko partikulatuarekin alderatzen den. Metodologia horrek bakterio-komunitatea bere harrapariengandik bereiztea eta inkubazio luzeak egitea eskatzen du (1 - 2 aste), eta horrek inkubazio-denboran zehar komunitatearen konposizioan aldaketak gertatzea dakar (Massana *et al.*, 2001; Gattuso *et al.*, 2002). Hala ere, bakterioen hazkuntza-efizientzia neurtzeko metodologiari erabiliena bakterio-ekoizpena eta bakterio-arnasketa aldi berean kalkulatzeko datza.

Joan den mendeko 80ko hamarkadatik, bakterio-ekoizpena neurtzeko egile gehienek errutinaz konposatu erradioaktiboen barneraketa metodoak erabiltzen dituzte, hala nola DNAn txertatzen den timidina (Fuhrman & Azam, 1980) edo proteinetan txertatzen den leuzina (Kirchman *et al.*, 1985; Simon & Azam, 1989). Egile batzuek bakterioen DNAn sartzen den konposatu ez-erradioaktibo bat erabiltzea erabaki dute, bromodioxyuridine (BrDU) (Steward & Azam, 1999; Nelson & Carlson, 2005). Metodo horiek inkubazio-aldi laburretan (1 - 2 h) emaitzak lortzeko abantaila ukalezina badute ere, teknika horiek guztiak konbertsio-faktore enpirikoak edo teorikoak erabili behar dituzte zelulen edo biomasaren ekoizpena kalkulatzeko, eta, konstanteak ez direnez, aldakortasuna gehitzen diete bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioei (Giorgio & Cole, 2000; Sherry *et al.*, 2002; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b).

Bakterioen arnasketaren neurriak ekoizpenekoak baino askoz eskasagoak izan dira, neurri batean, bere neurketarekin lotutako zailtasun metodologikoengatik (Wikner *et al.*, 2013). Bakterioen arnasketaren neurketa hainbat modutan egin daiteke: substratu jakin bat sartzeari eta degradatzeari lotutako CO<sub>2</sub>-ren ekoizpen-tasa edo O<sub>2</sub>-ren kontsumo-tasa neurtuz; arnasketa entzima baten jarduera kuantifikatuz; edo bakterio-komunitatearen biomasan, jardueran edo konposizioan oinarritutako estimazio prediktiboak erabiliz (Robinson & Williams, 2005). Metodo horien bidez neurtutako aldagaietan aldaketa esanguratsuak lortzeko, inkubazio luzeak erabili behar dira askotan (24 - 72 h), zeinetan botila-efektuak bakterio-komunitatearen konposizioan aldaketak gertatzea (Massana *et al.* 2001; Gattuso *et al.* 2002) eta/edo baliabide trofikoak agortzea (Pradeep Ram *et al.*, 2003) eragin ditzake. Ondorioz, baliteke emaitzak ez izatea hasierako bakterio-komunitatearen adierazgarri. Ur-sistema naturalen errealitatearekiko estimazio distorsionatuak ez lortzeko, garrantzitsua da arnasketa doitasun handiko metodo baten bidez kalkulatzeko, inkubazio-denbora ahalik eta txikiena izan dadin. Gainera, bakterioen arnasketa neurtzeko gehien erabiltzen diren teknikek, oro har disolbatutako oxigenoaren kontsumo-tasen neurketek, bakterio-komunitatea gainerako komunitate planktonikotik bereiztea behar dute, inhibitzaile selektiboen bidez edo, arruntago, iragazketaren bidez egiten dena. Inkubazioaren aurretik egiten den komunitateen banaketa hori 0,6 eta 3 µm arteko iragazkien bidez egiten da (normalean ~ 0,8 µm). Aurreiragazketa-prozesu horrek komunitatearen arnasketa aldatzen du, organismoen kalteen, karbono organikoaren eskuragarritasunaren aldaketen eta beste komunitate planktoniko batzuekiko elkarrekintza etetearen ondorioz (Gasol & Morán, 1999; Robinson, 2008). Gainera, bakterioplanktonaren eta bereizi nahi diren protozooen artean tamainak gainjartzen direnez, iragazkortasunaren eraginkortasuna, askotan, ez da erabatekoa: gerta daiteke prokariotoen dentsitatearen parte bat iragazkian atxikituta gelditzea edo protozoo txikiren bat iragazkitik pasatzea, eta hortaz, bakterio horiek bakterio-komunitatearen arnasketa osoari egiten dioten ekarpenari buruzko onarpenak erabili behar direlarik. Ondorioz, iragazketaren ostean, bakterio-komunitatea jatorrizkoaren desberdina da, konposizio

filogenetikoari eta jarduerari dagokienez (Pomeroy *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2003; Robinson & Williams, 2005). Arazo metodologiko horiek bakterioen arnasketaren estimazio okerrak eragin ditzakete aurreiragazitako laginetan (Teira *et al.* 2010).

Bakterioen arnasketa komunitate planktonikoaren arnasketaren osagai nagusia da ur-sistema gehienetan (Williams, 1981; Hopkinson *et al.*, 1989; Jahnke & Craven, 1995). Hala ere, hainbat ikerketa zientifikotan aldagai horri buruz egindako neurketak oso desberdinak dira, neurri handi batean, erabilitako metodologiak dakarren zehaztugabetasunengatik. Datuen aldakortasun horrek baldintzatu egiten du ur-ekosistemetako karbonoaren eta gasen balantze orokorraren interpretazioa, eta, horregatik, doktorego-tesi honetako **1. kapitulu**an bakterio-arnasketaren neurketari lotutako zailtasun metodologikoak jorratzen dira, horiek konpontzeko zehaztasun handiagoko metodo bat proposatuz.

## **Faktore erregulatzaileak**

Jarduera zelularrean inplikaturako prozesu ugari zehazten dute bakterioen hazkuntza-efizientzia (0.2. Irudia), eta horietako bakoitza hainbat ingurumen-faktoreren menpe daude, fisiko-kimikoak zein biologikoak (Giorgio & Cole, 1998), ur-sistemetan neurtutako hazkunde-efizientiaren balioen aldakortasuna handiarazten dutenak. Jarraian, bakterioen hazkuntza-efizientzia erregulazio-faktore posibletzat hartu diren aldagaiak zehazten dira.

### *Materia organikoa eta mantenugai ez-organikoak*

Zenbait ikerketen arabera, bakterioen hazkuntza-efizientzia mantenugai ez-organikoen kontzentrazioetan (Kroer, 1993; Tortell *et al.*, 1996; Benner *et al.*, 1998), disolbatutako karbonoak mantenugaiekiko (C:N ratioa) duen eskuragarritasunean (Touratier *et al.*, 1999), eta ingurunean dagoen materia organikoaren kantitatean, kalitatean eta tamainan gertatutako aldaketa azkarren menpe dago (Pomeroy & Wiebe, 2001; Amon & Benner, 1994 eta 1996; Eiler *et al.*, 2003).



Ikerketa esperimentaletan alderantzizko erlazioa ikusi da bakterioen hazkuntza-efizientziaren eta disolbatutako materia organikoaren C:N ratioaren artean (Goldman *et al.*, 1987; Kroer, 1993; Pradeep Ram & Chandramohan, 2003). Aldi berean, del Giorgio-k eta Cole-k (1998) bakterioen hazkuntza-efizientziaren joera positiboa erakutsi zuten ekosistemako egoera trofikoaren gradientean zehar. Aitzitik, beste ikerketa batzuek adierazten dute disolbatutako materia organikoaren kalitatea dela, kantitatea baino gehiago, sistema eutrofikoenetan bakterioen hazkuntza-efizientziaren balio altuenen bultzatzailea (Kritzberg, 2005; Apple & del Giorgio, 2007). Ildo horretan, itsas uretan bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioak barneratzen dituzten urtaroko ikerketa urriek, aldagai hori hein handi batean disolbatutako karbono organikoaren labilitateaz baldintzatuta dagoela iradokitzen dute (Lemée *et al.*, 2002; Reinthaler & Herndl, 2005).

Bakterioek disolbatutako materia organikoaren erabileran eragina izan dezakeen beste ingurumen-faktore garrantzitsu bat argiarekiko esposizioa da. Disolbatutako materia organikoaren irradiazioak handitu egin dezake materia organiko labilaren eta pisu molekular txikiko materia organikoaren proportzioa, bakterioek barneratzeko eskuragarriagoa eta lagungarriagoa dena, eta horrek bakterioen hazkuntza areagotzea ekarriko luke (Miller & Moran, 1997; Moran *et al.*, 2000; Tranvik & Bertilsson, 2001; Obernosterer & Benner, 2004), baita hazkuntza-efizientzia ere (Reche *et al.*, 1998). Hala ere, beste lan batzuetan ikusi da argiaren presentzian bakterioen arnasketa ekoizpena baino gehiago estimulatzen dela eta, beraz, bakterioen hazkuntza-efizientziako balio txikiagoak eta karbono-eskari handiagoak ikusten direla argiarekiko esposizioan iluntasunean baino (Cottrell *et al.*, 2008; Pringault *et al.*, 2009).

Bestalde, protistoplankton bakteriboroak (González *et al.*, 1990; Lebaron *et al.*, 1999) eta partikula birikoek (Middelboe *et al.*, 1996), zelula-lisiaren eragile gisa, osaera eta labilitate desberdineko konposatu organikoak askatzen dituzte, disolbatutako materia organikoaren erreserban laguntzen dutenak (Nagata & Kirchman, 1991; Strom *et al.*, 1997; Nagata, 2000; Carlson, 2002), eta eragin nabarmena izan ditzaketanak bakterio-komunitatearen hazkuntza-efizientzian.

Baina, dakigunera arte, oraindik ez da aztertu harraparitzak eta zelula-lisiak disolbatutako materia organikoaren alterazioen bitartez bakterioen hazkuntza-efizientzian duten eragina. Alderdi hau tesi honen **2. Kapitulu**an eztabaidatzen da.

### *Temperatura*

Arrheniusen ekuazioaren arabera, edozein erreazio biokimikoren abiadura handitu egiten da temperatura igo ahala (Arrhenius, 1889). Hala ere, deigarria da bakterioen hazkuntza-efizientziaren eta uraren tenperaturaren arteko erlazioa aztertzeaz arduratu diren ikerketetan ikusten diren emaitza kontraesankorrak. Rivkin eta Legendre (2001) ur-sistemetan lortutako datu-bilketan oinarrituta, bakterioen hazkuntza-efizientziak tenperaturarekiko alderantzizko mendekotasuna aurkezten duela iradoki zuten. Harreman hori bera ikusi da manipulazio-esperimentu batzuetan (Iturriaga & Hoppe, 1977; Tison & Pope, 1980; Griffiths *et al.*, 1984; Roland & Cole, 1999), antzeko beste ikerketa batzuetan halakorik ikusten ez den bitartean (Crawford *et al.*, 1974). Bakterioen hazkuntza-efizientziaren urtaroko aldakortasuna aztertu den lanetan, emaitzak ere kontraesankorrak izan dira; kasu batzuetan efektu negatiboa ikusi zuten (Bjørnsen, 1986; Daneri *et al.*, 1994), beste batzuetan efektu positiboa izan zen (Roland & Cole, 1999; Lee *et al.*, 2002; Reinthaler & Herndl, 2005; Apple *et al.*, 2006) eta beste batzuetan tenperaturak ez zuen eragin handirik edo batere ez bakterioen hazkuntza-efizientzian (Kroer, 1993; Toolan, 2001; Pradeep Ram *et al.*, 2003). Oraindik ez dago argi desadostasun horiek zenbaterainokoak diren erabilitako metodologian dauden desberdintasunengatik, edo benetan tenperaturak ur-sistemetan bakterioen hazkuntza-efizientzian duen efektuaren aldakortasuna islatzen duten, kontrolatu gabeko beste parametro batzuen arabera. Alderdi hau tesi honen **3. Kapitulu**an aztertzen da.

### *Bakterio-komunitatearen konposizioa*

Bakterio-komunitatearen konposizioa ur-sistema naturaletan karbonoaren prozesamenduaren erregulazio-faktore posibletzat ere jo izan den arren, ez dago informazio askorik bakterioen hazkuntza-efizientziari nola eragin diezaiokeen azaltzeko (Cottell & Kirchman, 2000). Bakterioen kultibo puruekin egindako

ikerketetan ikusi zen, hazkunde-parametroen konbinazio jakin baterako, bakterio-espezie desberdinek bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioek tarte handia erakusten zutela (Heijnen & Van Dijken, 1992). Hala ere, bakterio-komunitate natural konplexuagoekin egindako ikerketetan, emaitzak kontraesankorrak izan dira berriro. Hala, Blanes-ko Badian egindako ikerketa batean, Alonso-Sáez eta laguntzaileek (2008) ez zuten harremanik aurkitu komunitatearen konposizioaren eta karbonoaren metabolismoaren neurri orokorren artean, beste itsas-sistema batzuetan behatutakoa ez bezala (Fuhrman *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). Tesi honen **3. Kapituluan** komunitatearen konposizioak bakterioen hazkuntza-efizientziaren erregulazioan duen inplikazio maila eztabaidatzen da.

Protozoo bakteriboroen bidezko harraparitza da bakterio-komunitateak ur-sistemetan duen konposizio genotipiko eta fenotipikoari forma ematen dion prozesu nagusietako bat (Jurgens & Güde, 1994). Protistoplanktonaren hautazko harraparitza dela eta, zelula ertain eta bizitza librean dauden aktiboek lehenetsiz, aldaketak gertatzen dira tamaina eta morfologiaren banaketan, talde filogenetikoaren konposizioan eta bakterio-komunitatearen jardueran (Hahn & Höfle, 2001). Aldaketa horiek, aldi berean, komunitatearen bakterioen hazkuntza-efizientzian aldaketak eragin ditzakete.

### *Aktibitate maila*

Litekeena da bakterio guztiek ur-sistemetako karbonoaren fluxuan duten ekarpena berdina ez izatea, bakoitza metabolismoaren jarduera maila desberdinetan egon baitaitezke (Warkentin, 2011). del Giorgio-ren eta Cole-ren arabera (2000), hazkunde aktiboan dauden bakterioek substratu kopuru handia dute, eta arnasketa nahiko txikia da. Bakterioek metabolismoaren mantenturako barneko biltegiatze-produktuak erabiltzen dituztenean, substratuaren kontsumoa txikia da edo ez dago, hazkuntzan eta ekoizpenean neurri txikiagoan parte hartzen dute eta arnasketa handia da, eta horrek bakterioen hazkuntza osoaren efizientzia murrizten du. Komunitate naturaletako bakterio-talde funtzionalen jarduera metabolikoaren maila ezezaguna da, baita ingurunean

dauden zelula latenteek edo aldaketa-egoeran dauden zelulek karbonoaren eraldaketan edo barneraketan eta bakterioen hazkuntza-efizientzia izan dezaketen eragina ere. Premisa horren pean, zelula oso aktiboak eta inaktiboak dentsitatearen arteko proportzioa izan liteke ur-sistemetan bakterioen hazkuntza-efizientzia erregulatzen duen beste faktore bat.

Gaur egun, ziurgabetasun handia dago bakterioen hazkuntza-efizientzia kontrolatzen duten erregulazio-faktoreei eta prozesu honetan duten garrantzi erlatiboari buruz, eta horrek ezinezko egiten du ingurumen-baldintza jakin batzuetatik espero daitezkeen bakterioen hazkuntza-efizientiaren balioak zehaztasunez aurreikustea. Horregatik, doktorego-tesi honen **2. eta 3. Kapituluek** kostaldeko itsas-sistemetan bakterioen hazkuntza-efizientzia erregulatzen duten faktoreen ezagutzan sakontzen da, baita prozesu horretan benetan egiten duten ekarpena ere.



HELBURUAK



Garrantzi ekologikoa duen arren, deigarria da bakterioen hazkuntza-efizientziaren eta ur-sistema naturaletan duen magnitudea erregulatzen duten faktoreen emaitza zehatzen eskasia. Bakterioen hazkuntza-efizientziaren neurketarekin lotutako arazo metodologikoez eta bertan eragina izan dezaketen faktoreei buruzko ziurgabetasunak, ur-sistemetako karbono-fluxuaren magnitudeari buruz dugun ulermenean eragin zuzena dute.

Ur-sistemetan karbonoaren fluxua ulertzen eta iragartzen laguntzeko helburu orokorrek, tesi honetan bakterioen hazkuntza-efizientzia zehazteko metodologia egokia ezartzen da, eta kostaldeko itsas sistemetan aldagai hori erregulatzen duten faktoreen ezagutzan sakontzen da.

Helburu orokorra lortzeko, honako helburu espezifiko hauek ezarri ziren:

1. Ur-sistema naturaletan bakterioen arnasketa neurri zehatzak eta fidagarriak lortzeko baldintza egokiak ezartzea, mikroarnasketa-sistema baten eta oxigeno-mikrosentsoreen bidez (**1. Kapitulua**).
2. Protozoo bakteriboroen harrapakaritzak disolbatutako materia organikoan eragiten duen alterazioaren bidez bakterioen hazkuntza-efizientzian duen eragina zehaztea (**2. Kapitulua**).
3. Kantauri Ekialdeko kostaldeko bakterioen hazkuntza-efizientziaren denboran zeharreko aldaketa aztertzea, eta baita hura kontrolatzen duten faktoreak ere (**3. Kapitulua**).





## 1. KAPITULUA:

Bakterioen arnasketaren neurri zehatzak  
oxigeno-mikrosentsoreen eta inkubazio-  
denbora laburren bidez





## Laburpena

Bakterioplanktona ur-sistemetako materia organikoa eraldatzeko eta mineralizatzeko gai den osagai biologiko garrantzitsua da; horregatik, karbonoaren zikloa ulertzeko, funtsezkoa da bakterio horiek CO<sub>2</sub> bihurtzen duten eta atmosferara askatzen duten karbono organikoaren kantitatea zehaztasunez ezagutzea. Hala ere, bakterioen arnasketaren neurriak urriak eta oso aldakorrak dira, batez ere muga metodologikoen ondorioz. Ur-sistema naturalean bakterioen arnasketa neurri zehatzak lortzeko metodo bat optimizatzeko asmoz, Kantauri Itsaso Ekialdeko kostaldeko itsas gainazaleko 120 ur-lagin jaso ziren guztira 2007 eta 2009 bitartean, eta lagin bakoitzaren disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren jaitsiera oxigeno-mikrosentsoreen bidez monitorizatu zen modu jarraituan 24 orduz. Inkubazioko 3-6 ordutatik aurrera disolbatutako oxigenoaren jaitsieran linealtasuna galdu zela identifikatu zen. Arnasketa-dinamikaren aldaketa horiek komunitatearen dentsitatean, jardueran eta konposizioan izandako aldaketekin lotuta egon ziren, batez ere hasieran bakterio-dentsitate baxua zituzten laginetan. 12 ordutik gorako inkubazio-denborak erabiltzeak bakterioen arnasketa balioestea eragiten du. Oxigeno-mikrosentsoreek arnasketa-dinamiken aldaketak identifikatzeko eta inkubazio-denbora 6 ordu baino gutxiagora murrizteko aukera ematen dute. Horri esker, bakterioen arnasketa-neurri zehatzak eta ekosistemaren errealitatearekin bat datozenak lor daitezke.

## Sarrera

Daukaten ugaritasuna dela eta, bakterioplanktona materia organikoaren transformazioan eta mineralizazioan osagai biologiko garrantzitsuentzat hartzen da (Cho & Azam, 1988; Fuhrman, 1992), funtsezkoa izanik ur-sistemetako karbonoaren zikloan. Bakterioplanktonaren mineralizazio- edo arnasketa-tasa ezagutzea oso garrantzitsua da CO<sub>2</sub> bihurtzen den eta atmosferara askatzen den karbono organikoaren kantitatea zehaztasun handiagoz ezagutzeko. Bakterioen arnasketa atmosferarekin trukutzen den CO<sub>2</sub>-aren bultzatzaile biologiko garrantzitsuena den arren (Williams & del Giorgio, 2005), horrek dakarren garrantzi ekologiko eta biokimikoarekin, ekosistema-mailan gutxien ikertutako bakterioen prozesu metabolikoetako bat da. Egin ziren lehenengo arnasketa neurriak XX. mende hasierakoak dira (Gaarder & Gran, 1927), baina hamarkadetan arnasketa neurriak oso eskasak izan ziren, eta fotosintesi neurriak zuzentzeko erabili ziren nagusiki. Pomeroy & Johannesen (1966 eta 1968) lanak argitaratu ziren arte arnasketa ez zen berez prozesu bat bezala garrantzitsua izan komunitate zientifikoarentzat. Hala ere, hamarkada bat geroago arte ez zen garatu onargarritzat jotzeko moduko inkubazio-denbora txikiak erabiliz (12 - 24 h) aurrera eraman zitekeen bakterioen arnasketa neurtzeko teknikarik (Bryan *et al.*, 1976). Gaur egun, zailtasun metodologikoek ur-sistemetan bakterioen arnasketaren neurri zehatzak eta fidagarriak lortzea oztopatzen jarraitzen dute.

Bakterioen arnasketa hainbat modutan neur daiteke. Modurik zuzenena inkubazioan zehar disolbatutako karbono ez-organikoaren edo oxigenoaren kontzentrazioaren bilakaera jarraitzea da, nahiz eta azken horrek arnas koefiziente bat erabiltzea eskatzen duen, kontsumitutako disolbatutako oxigenoa sortutako CO<sub>2</sub> bihurtzeko. Itsasoko uretan karbono ez-organikoaren kontzentrazioa handia denez, CO<sub>2</sub>-aren sorrera neurtzeko analisia kolorimetrikoaren erabilpena (Johnson *et al.*, 1993; Robinson & Williams, 1999) jarduera planktoniko handia duten sistema ozeanikoetara mugatzen da. Beraz, sentsibilitate-arrazoiengatik, kasu gehienetan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren neurria erabili da, eta Winkler metodoa izan da hura zehazteko gehien erabili dena (Williams &

Jenkinson, 1982; Culberson & Huang, 1987; Biddanda *et al.*, 1994; Smith & Praire, 2004). Winkler metodoa disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa neurtzeko metodo zehatzenetako bat da,  $0,07 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ egun}^{-1}$ -ko detekzio-muga teorikoarekin, nahiz eta praktika esperimentalean jakinarazitako zehaztasuna 0,1 eta  $2 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ egun}^{-1}$  artekoa izan (Biddanda *et al.*, 1994; Duarte *et al.*, 2004; Maranger *et al.*, 2005). Hala ere, ur-sistema naturaletan bakterioen arnasketa modu zehatzean estimatzeko orduan, Winkler-ek neurketa zaildu dezaketen zenbait ezaugarri ditu: laginen analisisa diskretua da, inkubazio-denbora luzeak behar ditu neurri fidagarri bat lortzeko (12 - 72 h) eta disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren jaitiera lineala dela onartzen du, inkubazioan zehar gerta daitezkeen kontsumo-abiaduren balizko aldaketak kontuan hartu gabe. (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002). Gainera, lagin-bolumenen erreplika erlatiboki altuak behar ditu (normalean 60 - 120 ml), eta disoluzio kimikoak erabiltzea dakar, zeinen manipulazioak eta lurrunketak neurri aldakortasuna erants diezaieken (Helm *et al.*, 2012).

Metodo entzimakoak, elektroien garraio-katearen (EGK) jardueraren neurketa *in vitro* (Packard *et al.*, 1988) esate baterako, bakterioen arnasketa neurtzeko metodo alternatibo gisa ere erabili izan dira. Entzima-jardueraren *in vitro* neurketek EGK lotutako entzimen jarduera maximoak adierazten dituzte, hau da, komunitate horren arnasketa-tasa potentzialak. Hala ere, naturan *in vivo* tasak fosforilazio oxidatiboaren tasek kontrolatzen dituzte eta, beraz, ez da maximora iristen zelula osoan. Beraz, *in vitro* jarduera entzimakoak komunitate naturalaren jardueretara estrapolatzeko enpirikoki zehaztutako algoritmo bat erabili behar da (Robinson & Williams, 2005), baina algoritmo hori konstantea ez izateak, ohiko teknika bezala erabiltzea mugatzen du neurri handi batean. Faktore horiek erabiltzeak %30eko errore-tasa supozatzen du (Arístegui & Montero, 1995), eta horrek bakterioen arnasketa-neurrien aldakortasuna areagotzea eragiten du. Arazo horri aurre egiteko, Martínez-García eta kolaboratzaileek (2009) EGK *in vivo* jardueraren neurketaren teknika egokitu zuten mikrobio komunitateak ur-sistemetan duen arnasketaren azterketara. *In vitro* teknikan ez

bezala, ez da beharrezkoa EGKaren osagaiak erauztea, laginari zuzenean gehitzen baitzaio mintz-plasmatikoari iragazkorra den elektroi-hartzaile bat. Teknika honen abantaila nagusia da arnasketaren benetako *in vivo* tasa aztertzeko aukera ematen duela. Gainera, bakterioen eta mikroorganimo-komunitate osoaren arnasketa elkarrekin neurtzeko aukera ematen du, lagina aldeztetik iragazi behar izan gabe. Horrela, aldi berean inkubazio baldintza oso desberdinak aplikatu daitezke laginetan, eta horrek azterketa konplexuagoak egiteko atea irekitzen du. Hala ere, erabiltzen diren tetrazolio-gatzak eta prozesuan formazan-kristalak metatzea toxikoak izan daitezke zelulentzat (Gasol & Arístegui, 2007) eta arnasketa-neurriak gutxietea ekar dezake.

Ur-sistema naturaletan bakterioen arnasketa neurtzeko erabiltzen diren beste metodo batzuk oxigeno-sentsore optikoak (Klimant, 1995; Warkentin *et al.*, 2007; Chipman *et al.*, 2012) edo Clark elektrodoetan oinarritutako oxigeno-mikrosentsoreak (Briand *et al.*, 2004) dira. Bi metodo horiek modu jarraituan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren beharrezko monitorizazioa eta inkubazioan zehar kontsumo-abiadura aldaketak detektatzea ahalbidetzen dute. Bai optodoek zein oxigeno-mikrosentsoreek Winkler metodoaren pareko zehaztasuna dute (0,3 eta 0,1-0,5  $\mu\text{M O}_2$ , hurrenez hurren) (Pyroscience; Briand *et al.*, 2004), eta biek errepikagarritasun handia dute. Horri esker, disolbatutako oxigenoaren kontzentrazio-balioak lor daitezke, lagin-bolumen handiak edo erreplika ugari erabili behar izan gabe. Gainera, katodoaren inplementazioari esker (Revsbech, 1989) mikrosentsoreak oxigenorik ez kontsumitzeak abantaila nabarmena supozatzen du ur planktonikoetan oxigenoa neurtzerakoan makrozundak erabiltzen duten beste ekipo batzuekin alderatuta (Griffith, 1988; Langdon, 1993). Makrozundek barneko oxigeno-kontsumoa daukatenez, bakterioen arnasketaren neurria balioestea eragiten dute. Optodoen edo mikrosentsoreen erabilera bakterioen arnasketa neurtzeko duen desabantailarik handiena kasu bietan aurreiragazketaren bidez bakterio-komunitatea protistoplanktonetik eta tamaina handiko organismoetatik bereiztea beharrezkoa dela da.

Gaur egun, ur-sistemetako bakterioen arnasketa neurketak urriak eta oso aldakorak dira oraindik, lehen aipatutako arazo metodologikoen ondorioz batez ere. Arnasketa neurrien ziurgabetasun hori da ur-sistemetan karbonoaren zikloaren funtzionamenduari buruzko ezagutza mugatzen duten faktore nagusietako bat (del Giorgio & Cole, 1998; Morán *et al.*, 2007; Gasol *et al.*, 2008; Robinson, 2008). Ildo horretan, ur-sistemetan arnasketa-neurri zehatzak lortzeko metodo bat optimizatu beharra dago. Beste metodo batzuekiko dituzten abantaila metodologikoak direla eta, oxigeno-mikrosentsoreak bakterioen arnasketa zehazteko tresna baliagarri gisa aurkezten dira. Horrela, lan honetan, bakterio komunitate naturalaren arnasketa neurri adierazgarriak lortzeko helburuarekin, itsasoko ur-laginetan oxigeno-mikrosentsoreak erabiltzeko modurik egokiena determinatzea eta inkubazio-denboren mugak zehaztea proposatu zen. Era berean, oxigeno-mikrosentsoreen bidez lortutako emaitzak komunitate zientifikoak orain arte beste teknika batzuen bidez ur-sisteme desberdinetan lortutako bakterioen arnasketako neurriekin alderatu ziren.

## **Materialak eta metodoak**

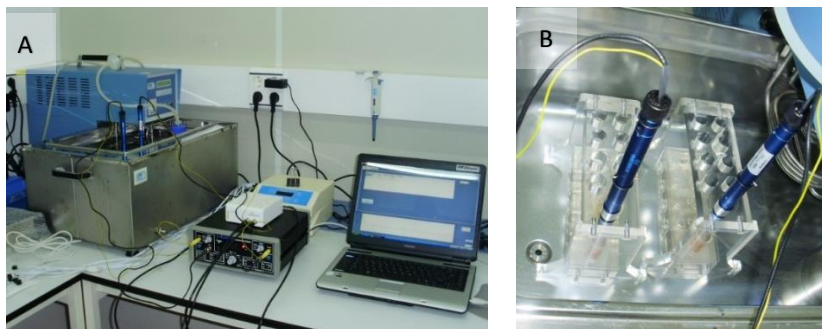
### *Laginketa estrategia*

2007tik 2009ra bitartean, itsas gainazaleko 120 ur-lagin jaso ziren (0,5 metroko sakonera) Kantauri Ekialdeko kostaldean (43°44'N, 2°90'W, Armintza, Bizkaia). Laginak Millipore AP25 beira-zuntzeko iragazkien bidez iragazi ziren (0,9 µm-ko poro nominala), %89 - 100eko berreskuratze-eraginkortasunarekin, bakterioak gainerako komunitate planktonikotik bereizteko. Jarraian, lagin bakoitzeko erreplika bitan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren beharakada modu jarraituan monitorizatu zen 24 orduz. Horri esker, arnasketa neurtzeko beste metodo batzuetan erabili ohi diren inkubazio-denbora luzeak simulatu ahal izan ziren. Ontzi itxietan inkubazioan zehar komunitatearen tamainan, jardueran eta konposizioan gerta zitezkeen aldaketak identifikatzeko, bakterioen dentsitatearen, biomasaren eta ekoizpenaren neurri puntualak egin ziren hasierako denboran lagin guztietan, eta 12 laginen hautaketa batean parametro horiek berak zehaztu ziren ≤ 6, 12 eta 24 orduko inkubazioen ondoren. Gainera,

10 lagin hautatu ziren bakterio-komunitatearen konposizioa zehazteko inkubazioaren hasieran, baita 12 eta 24 orduko inkubazioaren ondoren ere.

### *Bakterioen arnasketa*

Bakterioen arnasketa neurtzeko, laginean disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren beherakada estimatu zen, mikroarnasketa modularreko sistema bat erabiliz (Unisense), anperimetriaren eta bi oxigeno-mikrosentsoreen (OX-MR) bidez etengabeko neurketak egitea ahalbidetzen duena (Briand *et al.*, 2004) (1.1. Irudia). Horretarako, aurreiragazitako itsasoko 120 ur-lagin bakoitzaren bi erreplika kontu handiz eta burbuilak sortzea ekidinez sartu ziren zulo kapilardun tapoien bidez zigilatuta zeuden borosilikato-beirazko 4 ml-ko ganberetan (15 x 33 mm), zeintzuk kanpoaldearekin oxigenoaren trukatea saihesteko diseinatuta zeuden. Oxigenoaren disolbagarritasunaren aldaketen ondorioz ganbaren barruan mikroburbuilarik sor ez zedin, laginak inkubazio-temperaturara egokitu ziren ganbaretara sartu aurretik. Laginak iluntasunean inkubatu ziren temperatura kontrolatuko bainu baten barruan, laginketa egiteko unean itsasoko urak zuen *in situ* temperaturan (11°C - 21,5°C tartea,  $\pm$  0,5°C desbideratzearekin).



**1.1. Irudia.** Unisenseko mikroarnasketa sistema modularra. (A) temperatura-bainu kontrolatua, OX-MR oxigenozko bi mikrosentsore, AP2000 anperimetroa eta ADC-216 bihurgailua, agitzioa kontrolatzeko unitateak eta ordenagailua. (B) Bainuan murgildutako neurketa ganbarentzat diseinatutako bi euskarri, eta kalibrazio-ganberetan sartutako bi OX-MR mikrosentsore.

Ganberen barruko oxigeno-kontzentrazioaren jaitsiera 30 segunduro monitorizatu zen 24 orduz, OX-MR oxigeno-mikrosentsore baten bidez. Sentsore hori 500  $\mu$ m-ko Clark motako sentsorea da, plastikozko punta batean amaitzen



den aluminiozko gida baten barruan, 1 segunduko erantzun-ahalmena eta 0,1  $\mu\text{M}$ -ko doitasuna dituen, eta elektrodoaren oxigeno-kontsumoa minimora murrizten duen kanpoko katodo batekin diseinatua (gutxi gorabehera  $2 \times 10^9 \text{ mg O}_2 \text{ min}^{-1}$ ). Mikroarnasketako sistema modularrean, datuak eskuratzeko PA2000 pikoanperimetroa eta Unisenseko ADC-216 bihurgailua erabili ziren. Laginak homogeneizazio leun batekin mantendu ziren inkubazioan zehar, kontrol-unitate independente batek kontrolatutako irabiagailu magnetikoen bidez. Erabilitako material gutzia azidoarekin (HCl %10) eta Milli Q urarekin ikuzi zen neurri bakoitza egin aurretik. Oxigeno-sentsorea neurri bakoitzerako kalibratu zen, %0ean eta %100ean oxigenoz asetutako Milli Q esterila erabiliz. Horri esker, disoluzioen disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa sentsoretik jasotako seinalearekin (mV) erlazionatu ahal izan zen. Une bakoitzeko oxigeno-kontzentrazioa oxigeno-asetasunaren portzentaia gisa zehaztu zen, eta kontzentrazioa bihurtu zen ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) lagin bakoitzaren gazitasuna eta temperatura kontuan hartuta.

Bakterio-komunitatearen oxigenoa kontsumitzeko bi neurri estimatu ziren, oxigeno-kontzentrazioaren eta igarotako denboraren arteko erregresioaren maldatik abiatuta eta disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren beharakadaren dinamiketan behatutako aldaketak kontuan hartuta: RB1, non 6 ordu edo gutxiagoko inkubazio-denborak erabili ziren; eta RB2, non 12 ordu baino gehiagoko inkubazio-denborak erabili ziren. Oxigeno-kontsumoak karbono-arnasketan bihurtu ziren, 1:1 arnasketa-koefizientea erabiliz (Giorgio *et al.*, 2006).

### *Bakterioen dentsitatea eta biomasa*

Bakterioen dentsitateak Nikon Optiphot epifluoreszentzia-mikroskopiaren bitartez zenbatu ziren (Porter & Feig, 1980). Laginak kaltzio-karbonatoarekin tanponatutako formalinarekin fixatu ziren (azkeneko kontzentrazioa %2 b/b eta 0,2  $\mu\text{m}$ -tik iragazita) eta 4°C-tan iluntasunean biltegitatu ziren analizatu arte. 1 ml-ko azpilaginak hartu ziren, DAPI-rekin (azkeneko kontzentrazioa 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) 10 minutuz tindatu ziren, eta 0,22  $\mu\text{m}$  poro-tamainako (Whatman) polikarbonatozko iragazki beltzen bidez iragazi ziren. Iragazkiak beirazko porta batean muntatu ziren, murgiltze-olio ez fluoreszentearekin. Laginak bikoiztuta zenbatu ziren, eta

iragazki bakoitzerako zoriz hautatutako 20 eremu zenbatu ziren EF-D epifluoreszentzia ekipamendua zuen Nikon Optiphot mikroskopio batean (1250x gehikuntza).

Bakterioen biomasa determinatzeko, bakterioen biobolumena irudi semiautomatikoaren analisiaren bidez zehaztu zen (Massana *et al.*, 1997). DAPI-rekin tindatutako zelula prokarioto esekien irudiak (Porter & Feig, 1980) Nikon Optiphot mikroskopiora konektatutako Hamamatsu C2400 kamera baten bidez hartu ziren, EF-D epifluoreszentziako ekipamenduarekin, eta LG-3 (Scion Corporation) bideo-txartel baten bidez digitalizatu ziren, ondoren ordenagailuz analizatzeko NIH Scion programaren bidez. Lagin bakoitzean 200 - 250 bakterio neurtu ziren. Behin biobolumen zelularra zehaztu ondoren, biomasara bihurtu zen Norlanden (1993) eredu alometrikoa erabiliz. Analisia hori 120 laginetatik 12-tan egin zen, hasierako denboran (0 ordu) ez ezik, inkubazio-denborako bestelako hiru unetan ere: RB1 neurtzeko erabiltzen zen unean ( $\leq 6$  ordu), RB2 neurtzeko erabiltzen zen unean ( $\geq 12$  ordu), eta inkubazioaren amaieran (24 ordu). Bakterio-biomasaren igoera-faktorea kalkulatzeko, inkubazio-denbora desberdinetan lortutako balioa (6 h, 12 h eta 24 h) hasierako denboraren balioarekin zatitu zen.

### *Bakterioen ekoizpena*

Bakterioen ekoizpena timidina tritiatua barneraketa-tasetatik abiatuta kalkulatu zen Kirchman *et al.* (1985) metodoaren arabera. 5 ml-ko azpilaginen hiru erreplika gehi azido trikloroazetikoz (ATK) fixatutako bi zuri, isotopoarekin ( $[^3\text{H}]$ -Timidina) kontzentrazio saturantean (amaierako kontzentrazioa 50 nM) *in situ* tenperaturaraino iluntasunean ordubetez inkubatu ziren. Inkubazioak ATK gehituz (%5ko amaierako kontzentrazioarekin) eta laginak izotzetan 5 minutuz jarriz gelditu egin ziren. Ondoren, laginak 0,22  $\mu\text{m}$  poro-tamainako zelulosa-azetatozko iragazkien bidez (Sartorius) iragazi ziren, eta bost aldiz ikuzi ziren 5 ml %5eko ATKrekin. Iragazkiak airean lehortzen utzi, izarniadura-bialetan sartu eta etilo-azetatozko 500  $\mu\text{l}$ -rekin nahastu ziren 20 minutuz. Azkenik, izarniadura-kokteleko 4 ml gehitu ziren (Ultima Gold, Perkin Elmer) eta erradioaktibitatea Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR izarniadura-kontagailu batean neurtu zen, iraungitzea zuzentzeko kanpoko

estandarrek erabiliz. Bakterioen ekoizpen-abiadura konbertsio-faktore bi erabiliz kalkulatu zen: timidinaren barneraketa zelula kopurura bihurtzeko  $1,7 \times 10^{18}$  zel timidina  $\text{mol}^{-1}$  faktore teorikoa erabili zen (Fuhrman & Azam, 1982), eta zelula kopurua karbono-kantitatara bihurtzeko, lagin bakoitzaren batez besteko biomasa prokariota erabili zen ( $\text{fgC zel}^{-1}$ ). 120 laginetatik 12tan bakterioen ekoizpena neurtu zen, hasierako denboran (0 h) ez ezik, inkubazio-denborako bestelako hiru unetan ere: RB1 neurtzeko erabiltzen zen unean ( $\leq 6$  h), RB2 neurtzeko erabiltzen zen unean ( $\geq 12$  h), eta inkubazioaren amaieran (24 h).

### *Bakterioen komunitatearen konposizioa*

120 laginetatik 10tan bakterioen komunitatearen konposizioa CARD-FISH teknikaren bidez determinatu zen Pernthaler-ek *et al.* (2002) deskribatutako teknikaren bitartez, inkubazio-denborako hiru unetan: hasierako denboran (0 ordu), inkubazioaren 12 ordutan eta inkubazioaren amaieran (24 ordu). Talde espezifikoko detektatzeko diseinatuta zeuden HRP-arekin (peroxidase horseradish) markatutako oligonukleotidoetako zundak erabili ziren: *Bacteria* domeinua (EUB I-ren (Amann *et al.*, 1990) eta EUB II-III-ren (Daims *et al.*, 1999) arteko nahasketa) eta bere lau talde filogenetikorik garrantzitsuenak detektatzeko: ALF968 (Neef, 1997) *Alfaproteobacteria*-entzako; BET42a (Manz *et al.*, 1992) *Betaproteobacteria*-entzako; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) *Gammaproteobacteria*-entzako; eta CF319a (Manz *et al.*, 1996) *Bacteroidetes*-entzako. *Eubacteria*-entzako kontrako zentzuzko NON338 zunda (Wallner *et al.*, 1993) kontrol negatibo bezala erabili zen. Hibridazio guztiak  $35^{\circ}\text{C}$ -tan 2 orduz burutu ziren, eta jarraian tiramida-Alexa488-arekin amplifikatu ziren 15 minutuz. Hibridazio-tanpoiko formamidaren kontzentrazioa %55-ekoa izan zen zunda guztientzako ALF968 eta NON338 zundetarako izan ezik, %45koa eta %20 izan zirenak hurrenez hurren. Hibridazioa egin zen iragazkien sekzioak DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole) bidez tindatu ziren, ondoren bakterioak epifluoreszentiako mikroskopiaren bidez zenbatzeko eta zunda bakoitzak bakterio totalarekiko osatzen zuen hibridazio-portzentaia kalkulatzeko.

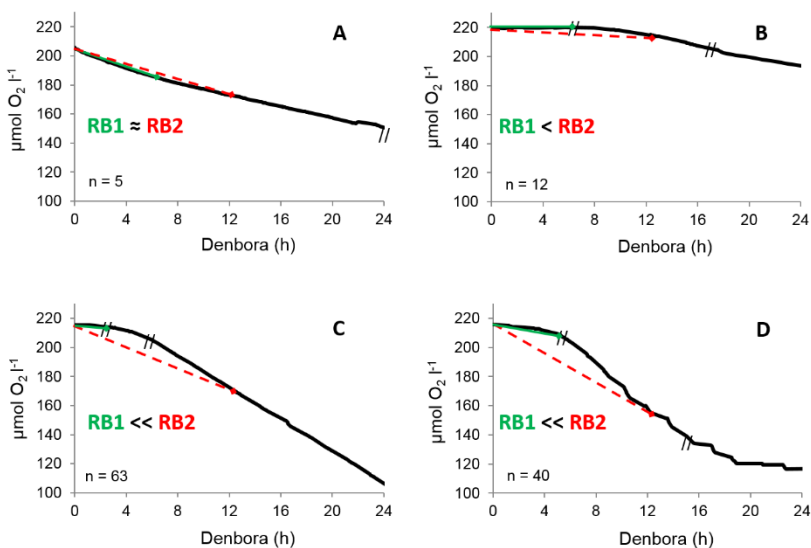
## Analisia estatistikoa

T-Student testa bi lagin-talderen batez besteko balioen arteko diferentzia esanguratsuak identifikatzeko erabili zen, eta pareatutako t-Student testa lagin bereko neurrien arteko desberdintasun esanguratsuak identifikatzeko. Bi lagin-talde baino gehiagoren arteko alde esanguratsuak identifikatzeko, faktore baten ANOVA-rako post hoc proba erabili zen, Bonferroni-ren kontrastearekin. Erregresio lineal sinpleak egin ziren inkubazio-denboran zehar disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura lortzeko ( $p < 0,05$ ). Analisia estatistikoa SPSS programa estatistikoa erabiliz egin ziren (IBM).

## Emaitzak

### Oxigenoaren jaitsieraren dinamikak

Aztertutako lagin guztietan inkubazioaren 24 orduetan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa murriztu egin zela ikusi zen, eta oxigenoa jaisteko dinamika desberdinak 1.2. Irudian agertzen diren lau eredu orokorretan definitzen dira.

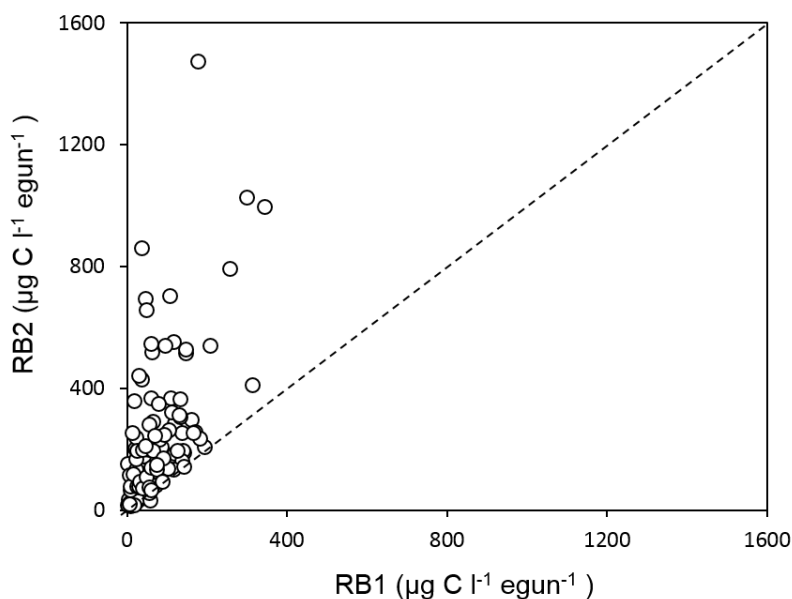


**1.2. Irudia.** 24 orduz iluntasunean inkubatzeko oxigeno mikrosentsoreen bidez disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren jaitsieran detektatutako dinamikaren eredu adierazgarriak (A, B, C, D). Grafiko bakoitzean, disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren jaitsiera-abiaduraren dinamikaren aldatetetan bereiz daitezkeen hiru etapak mugatuta daude. n: lagin-kopurua; RB1:  $\leq 6$  orduko inkubazio-denboran determinatutako bakterioen arnasketa (lerro berdea); RB2:  $\geq 12$  orduko inkubazio-denboran determinatutako bakterioen arnasketa (lerro eten gorria).

Aztertutako 120 laginetatik 5etan joera lineala ikusi zen inkubazio 24 orduetan (A eredua); gainerakoetan, ordea, beherakada ez zen lineala izan. 12 laginetan, lehenengo 6 - 15 orduetan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa linealki jaitsi zela ikusi zen eta, ondoren, disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura pixka bat aldatu zela (B eredua). Gainerako 103 laginetan hiru etapa bereizi ahal izan ziren: 1) lehenengo etapa (0 eta 3 - 6 ordu bitartean), non disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa modu konstantean eta neurritz jaisten zen; 2) bigarren etapa (3 eta 10 ordu arteko iraupena), non disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura aldaketa arin bat (C eredua, 63 lagin) edo bat-batekoa (D eredua, 40 lagin) antzeman zen; 3) azkenik, hirugarren etapa bat disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiaduraren igoerarekin (C eredua) edo jaitsierarekin (D eredua) lotua. Azken batean, inkubazioaren hasierako kontzentrazioarekin alderatuta, disolbatutako oxigenoaren jaitsieraren linealtasuna lagin guztietarako (120) soilik mantendu zen inkubazioaren lehenengo 3 - 6 orduetan.

#### *Bakterioen arnasketaren neurriak*

11°C eta 21,5°C arteko tenperatura eta  $4,4 \times 10^4$  zel  $\text{ml}^{-1}$  y  $4,0 \times 10^6$  zel  $\text{ml}^{-1}$  arteko bakterio-dentsitatea duten itsasoko ur-laginetan arnasketa-neurriak lortu ziren. Lagin bakoitzerako, bakterioen arnasketa-abiaduraren bi estimazio lortu ziren, disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioaren eta inkubazio-denboraren arteko erregresioaren maldatik abiatuta: RB1 arnasketa-balioa 6 ordu edo gutxiagoko inkubaziotik abiatuta kalkulatu zenean, eta RB2 arnasketa-balioa 12 ordu edo gehiagoko inkubaziotik abiatuta kalkulatu zenean. Aztertutako laginen %98,3an (B, C eta D ereduetan bildutako laginak), inkubazio-denbora laburrak (RB1) erabili zirenean kalkulaturako arnasketa-balioak baxuagoak izan ziren (t-Student,  $p < 0,05$ ) inkubazio-denbora luzeak erabili zirenean baino (RB2) (1.3. eta 1.4. Irudiak; TG.1. Taula gehigarria). RB1eko batez besteko balioak RB2koak baino 3 aldiz baxuagoak izan ziren ( $74,6 \pm 5,8 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$  y  $230,7 \pm 21,2 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$ , hurrenez hurren) (t-Student pareatua,  $p < 0,05$ ). Ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioan jaitsiera lineala izan zuten 5 laginetan lortutako RB1 eta RB2 balioen artean (A eredua).



**1.3. Irudia.**  $\leq 6$  orduko inkubazioetan (RB1) eta  $\geq 12$  orduko inkubazioetan (RB2) determinatutako arnasketa-balioen arteko erlazioa. Lerro zuzenak bi estimazioen arteko 1:1 erlazioa adierazten du.

Azterketa honetan mikroarnasketa bidez lortutako arnasketa-neurriak uretako beste sistema batzuetan hainbat teknikarekin lortutako arnasketa-neurriekin alderatzeko, 60 lan zientifiko berrikusi ziren, eta horietan, ozeano irekiko, kostaldeko, plataforma kontinentaleko, estuarioetako, ibaietako eta/edo lakuetako azaleko ur-laginetan bakterioen arnasketa zehazten zen (1.1. Taula). Lan horietan jasotako bakterioen arnasketaren batez besteko estimazioak esanguratsuki desberdinak izan ziren laginen jatorrizko sistema urtarraren arabera ( $P < 0,01$  faktore bateko ANOVArako post hoc Bonferroni proba, kasu guztietan). Ozeano irekian, batez besteko bakterioen arnasketa  $36,6 \pm 5,5 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$  izan zen, kostaldeko uretan eta plataforma kontinentalean  $141,5 \pm 12,0 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$ , eta estuario, ibai eta lakuetan  $176,8 \pm 13,2 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$  (1.4. Irudia). Lan horietan jasotako kostaldeko uretarako batez besteko balioak esanguratsuki desberdinak izan ziren (t-Student,  $p < 0,05$  bi kasuetan) eta azterketa honetan Kantauri Ekialdeko kostaldeko uretan lortutako RB1 ( $74,6 \pm 5,8 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$ ) eta RB2 ( $230,7 \pm 21,2 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$ ) balioekiko bitartekoak (1.4. Irudia).

## 1. Kapituluua

**1.1. Taula.** Ozeano irekian, kostaldeko uretan eta plataforma kontinentaletan, eta estuariotan, itsasadarretan, ibaietan eta lakuetan egindako ikerlanetan método desberdinen bidez lortutako arnasketa bakterianoaren estimazioen bilketa. BHE:bakterioaren hazkuntza-efizientzia; MKA: mikroorganismo-komunitatearen arnasketa; I: Ipar; H: Hego; E: Ekialde; M: Mendebalde. Metodoen zerrenda: 1. Winkler, 2. Mikrowinkler, 3. Oxidazio katalitiko, 4. Kolorimetria bidezko disolbatutako karbono ez-organikoa, 5. HTC kromatografia bidezko disolbatutako karbono organikoaren kontsumoa, 6. Elektroien garraio-katea *in vitro*, 7. Elektroien garraio-katea *in vivo*, 8. Oxigeno-elektrodo polarigrafikoa, 9. Masa espektrometria, 10. Optodoak, 11. Oxigeno-mikrosentsoreak, 12 Oxigeno-makrozundak. n.d.: daturik ez.

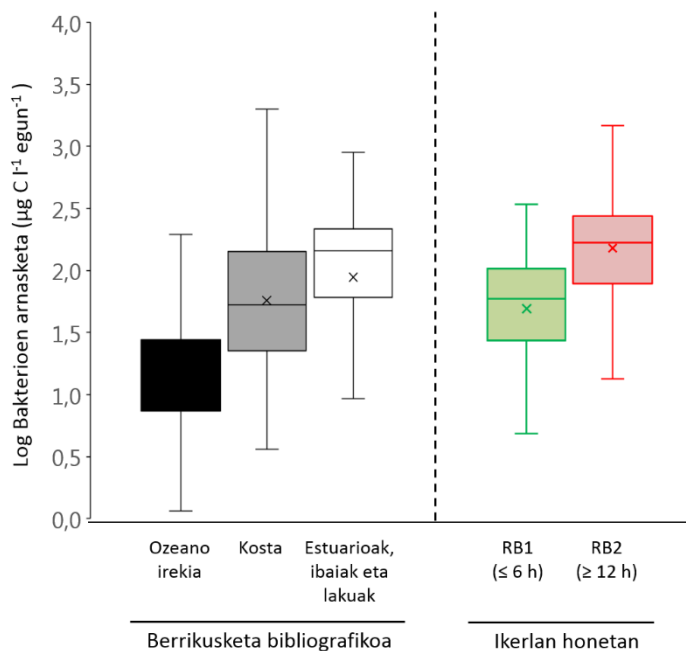
Kokapena	Frakzioa	Metodoa	Inkubazio-denbora	Bakterioen arnasketa $\bar{X} \pm ES$ $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$	Tartea	BHE	Temperatura	Erreferentzia
	$\mu\text{m}$					%	$^{\circ}\text{C}$	
<b>Kostaldeko urak eta plataforma kontinentala</b>								
Kanaria Irlak	< 2	6	20 min	23,6 ± 2,8	[18-27]	n.d.	18	Aristegui & Montero (2005)
Georgiako plataforma kontinentala	< 1	12	< 2 h	803,9 ± 116,2	[144,0-1987,2]	2-11	n.d.	Griffith <i>et al.</i> (1990)
Ipar Itsasoa eta Mantxako Kanala	< 3	1	4-18 h	65,5 ± 7,4	[8,6-227,5]	n.d.	12,5	Iriarte <i>et al.</i> (2001)
Chesapeake-ko Badia	< 3	1	6-12 h	124,6 ± 16,7	[22,5-360,0]	n.d.	17,4	Smith (1998)
Santa Rosako Kanala	< 1	1	6-24 h	469,8 ± 159,8	[54-1752,3]	15 ± 11	22,4	Coffin <i>et al.</i> (1993)
Mexikoko Golkoa	MKA	1	12 h	57,0 ± 14	[8,6-406,1]	1-28	25,5	Pomeroy <i>et al.</i> (1995)
Malasiako I eta M kostaldea	< 0,7	1	12 h	524,0 ± 46,3	[230,4-950,4]	6-9	29,6	Lee <i>et al.</i> (2009)
Baltiko Itsasoa eta Ipar Itsasoa	MKA	10	8-25 h	95,4 ± 20,1	[4,8-145,2]	n.d.	1,7 - 17,7	Wikner <i>et al.</i> (2013)
Maine-ko Golkoa	MKA	1	11-24 h	134,3 ± 22,5	[91,9-194,3]	n.d.	18,8	Packard & Williams (1981)
Maine-ko Golkoa	< 0,7	6	11-24 h	38,9 ± 11,7	[18-71,3]	n.d.	18,8	Packard & Williams (1981)
Artikoa	< 1	1	12-24 h	33,6 ± 16,6	[9,5-65,3]	n.d.	n.d.	Harrison (1986)
H Ipar Itsasoa	< 0,8	1	12-24 h	18 ± 19,2		20 ± 10	n.d.	Reinthal & Herndl (2005)
Luisianako plataforma	< 1	1	20-22 h	77,8 ± 5,3	[63,3-92,2]	38 ± 13	24,3	Biddanda <i>et al.</i> (1994)
Blanes (Mediterraneo I M)	< 200	1	20-24 h	61,6 ± 10,9	[6,6-253,8]	n.d.	17,4	Satta <i>et al.</i> (1996)
Daniar fiordoak	< 1	2	24 h	127,2 ± 12,3	[54-207]	46 ± 6	n.d.	Sand-Jensen <i>et al.</i> (1990)
Antartika	< 0,8	1	24 h	66,1 ± 12,1	[27,6-100,8]	n.d.	0	Robinson <i>et al.</i> (1999)
Antartika	< 0,8	4	24 h	60,2 ± 12	[12-152,4]	n.d.	0	Robinson <i>et al.</i> (1999)
Vigo-ko Itsasadarreko kanala	MKA	1	24 h	179,2 ± 23,6	[36-564]	n.d.	12 - 21	Moncoiffé <i>et al.</i> (2000)
Blanes-eko Badia (Mediterraneo I M)	MKA	1	24 h	47,0 ± 6,2	[13,2-78]	n.d.	12 - 24	Duarte <i>et al.</i> (2004)
Mediterraneo Itsaso I M	Aktibo %	1	24 h	18,3 ± 4,9	[3,6-44,4]	n.d.	13,9 - 27,2	Navarro <i>et al.</i> (2004)
Blanes-eko Badia (Mediterraneo I M)	< 0,8	1	24 h	26,4 ± 5,9	[4-69]	2-42	17	Alonso-Sáez <i>et al.</i> (2008)
Mallorca (Mediterraneo Itsasoa)	< 0,8	1	24 h	18,1 ± 4,4	[0,04-3]	12-51	14,4 - 28,2	Kritzberg <i>et al.</i> (2010)
Marsellako Badia (Mediterraneo I M)	MKA	1	24 h	14,2 ± 3,1	[2,6-55,7]	17 ± 2	12,8 - 25,8	Céa <i>et al.</i> (2015)
Mediterraneo Itsasoa	< 0,8	1	3 egun	30,5 ± 4,7	[20,7-41,8]	23,8 ± 2,7	15	Bonilla-Findji <i>et al.</i> (2008)
Mexikoko Golkoa	< 1	1	2-5 egun	55,3 ± 11,3	[8,9-117,6]	19-29	14,0	Chin-Leo & Benner (1992)
Georgiako kostaldea	< 1	8	n.d.	367,7 ± 109,5	[162-990]	n.d.	n.d.	Hopkinson <i>et al.</i> (1989)
Txileko kostaldea - Ozeano Barea	MKA	1	n.d.	87,0 ± 29,6	[0-400,8]	13-23,5	n.d.	Daneri <i>et al.</i> (2000)
Arabiako Itsasoa	< 0,7	1	n.d.	385,9 ± 158,4	[129,6-610,6]	11,1 ± 4,2	29,4	Ram & Chandramohan (2003)
Adriatiko Itsasoa	< 0,7	6	n.d.	18,9 ± 6,2	[0,2-417,6]	n.d.	18	La Ferla <i>et al.</i> (2006)
Oregoneko kostaldea (Ozeano Barea)	< 1,2	9	n.d.	25,5 ± 3,33	[14,4-36]	12 ± 2	9,2	del Giorgio <i>et al.</i> (2011)

1. Kapitulum

Kokapena	Frakzioa µm	Metodoa	Inkubazio- denbora	Bakterioen arnasketa		BHE %	Temperatura °C	Erreferentzia
				$\bar{X} \pm ES$	Tartea µg C l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>			
<b>Ozeano irekia</b>								
Ozeano Atlantiko I eta H	MKA, > 0,8 γ < 0,8	7	1-4 h	9,8 ± 1,4		n.d.	15 - 30	García-Martín <i>et al.</i> (2017)
Ozeano Atlantikoa eta Barea	MKA	7	n.d.	4,3 ± 0,7	[0,7-10,37]	21 ± 4	20,8	Martínez-García <i>et al.</i> (2013)
Antartika	MKA	1	24 h	22,3 ± 2,1	[4,0-44,3]	n.d.	0,2-6	Robinson & Williams (1993)
Ozeano Atlantiko H	< 0,8	1	24 h	12,8 ± 5,9	[1,2-20,4]	n.d.	< 0	Boyd <i>et al.</i> (1995)
Ozeano Atlantiko H	< 0,8	1	24 h	36,4 ± 13,9	[1,2-134,0]	n.d.	2	Blight (1996)
Ozeano Atlantiko E	MKA	1	24 h	29,2 ± 8,7	[12,0-57,6]	n.d.	13,2 - 28,9	Robinson <i>et al.</i> (2002)
Bizkaiko Badia	< 0,8	1	24 h	20,9 ± 6,1	[1,2-60]	1 ± 8	12,5	González <i>et al.</i> (2003)
Ozeano Barea I	MKA	1	24 h	9,5 ± 0,8	[7,6-13,8]	n.d.	n.d.	Williams <i>et al.</i> (2004)
Ozeano Atlantikoa (Azores-Portugal)	MKA	1	24 h	11,2 ± 2,4	[4,8-20,4]	n.d.	16,6	Maixandeu <i>et al.</i> (2005)
Ipar Itsasoa	< 0,8	1	24 h	17,5 ± 2,6	[8,4-28,8]	5-42	13,0	Reinthal <i>et al.</i> , (2005)
Afrika I M eta I Atlantikoako bira subtropikala	< 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
I E Atlantikoako bira subtropikala	MKA	1	24 h	14,7 ± 1,5	[3,5-28,5]	5,8		Morán <i>et al.</i> (2007)
E Atlantikoa eta Mediterraneo M	< 0,8	1	24 h	183,1 ± 64,1	[3,6-801,6]	3 ± 1,8	26,0	Reinthal <i>et al.</i> (2008)
I eta H Atlantikoa	MKA, > 0,8 γ < 0,8	1	24 h	11,3 ± 0,9	[4,8-27,6]	n.d.	15 - 30	García-Martín <i>et al.</i> (2017)
I E Pazifiko Subartikoa	< 1	2	1-2 egun	14,0 ± 7,9	[1-100]	5-65	12	Sherry <i>et al.</i> (1999)
Mediterraneo I M	< 0,8	1	1-2 egun	17,1 ± 3,3	[0,12-30]	0,1-43	1,5	Lemée <i>et al.</i> (2002)
Ozeano Bare I	< 0,7	3	3 egun	79,9 ± 22,4	[20,9-148,8]	3,2 ± 0,6	11 - 13	Cherrier <i>et al.</i> (1996)
Ozeano Atlantiko I	< 0,8	3	3-4 egun	153,7 ± 15,7	[124,0-177,1]	5 ± 1	14	Kirchman <i>et al.</i> (1991)
Sargasso Itsasoa	< 0,8	5	4-8 egun	15,0 ± 13,8	[1,2-28,8]	7-19	24	Carlson & Ducklow (1996)
Ross Itsasoa	< 0,8	4	11 egun	6,0 ± 0,2	[6,2-5,8]	11	1	Carlson <i>et al.</i> (1999)
Sargasso Itsasoa	< 0,8	4	101 egun	5,4 ± 0,0	[5,3-5,4]	7 ± 3	20	Hansell <i>et al.</i> (1995)
<b>Estuarioak, itsasadarrak, ibaiek eta lakuak</b>								
Nueva Caledonia-ko Lakua	< 0,6	11	5 h	183,0 ± 17,7	[6-345,6]	6 ± 6	26,8	Briand <i>et al.</i> (2004)
Vigo-ko Itsasadarra	MKA	11	3-6 h	10,3 ± 1,6	[7,3-12,6]	n.d.	18	García-Martín <i>et al.</i> (2011)
Chesapeake-ko Badiako estuarioa	< 1	9	6-8 h	65,0 ± 4,3	[2,4-324]	6-68	n.d.	Apple & del Giorgio (2007)
Delaware-ko Badiako estuarioa	< 0,9	9	< 8 h	148 ± 12	[60,7-267,8]	9-41	16 - 26	del Giorgio & Newell (2012)
Nueva Caledonia-ko Lakua	MKA	11	8-10 h	204,5 ± 16,4	[138,2-265]	2-45	n.d.	Pringault <i>et al.</i> (2009)
Malasiako estuario E eta M	< 0,7	1	12 h	366,9 ± 38,8	[129,6-892,8]	11-18	29,6	Lee <i>et al.</i> (2009)
Baltiko Itsasoko estuarioa	< 1,2	10	12-24 h	32,3 ± 16,5	[5,5-77,2]	6 ± 5	3-14	Vikström & Wikner (2019)
Cadagno Lakua (Suiza)	< 1,2	1	12-55 h	10,6 ± 9,2	[0-28,8]	n.d.	14,7	Gatusso <i>et al.</i> (2002)
Hudson Ibaiko estuarioa	< 2,7	1	24 h	152,0 ± 13,2	[36-216]	4-66	n.d.	Roland & Cole (1999)
Hudson Ibaiko estuarioa	< 2,7	1	> 24 h	118,0 ± 8,5	[48-196,8]	15-40	14 - 24	Maranger <i>et al.</i> (2005)
Vigo-ko Itsasadarra	MKA	1	24 h	67,2 ± 5,9	[39,8-111,2]	n.d.	18	García-Martín <i>et al.</i> (2011)
Pearl Ibaiko estuarioa	< 1	1	24 h	52,5 ± 13,5	[19-149]	20,9 ± 5,4	26 - 31	Xu <i>et al.</i> (2019)
Zuari-ko estuarioa (India)	< 0,7	1	n.d.	273,6 ± 51,84	[193,0-385,9]	18,0 ± 7,8	28,3	Ram & Chandramohan (2003)



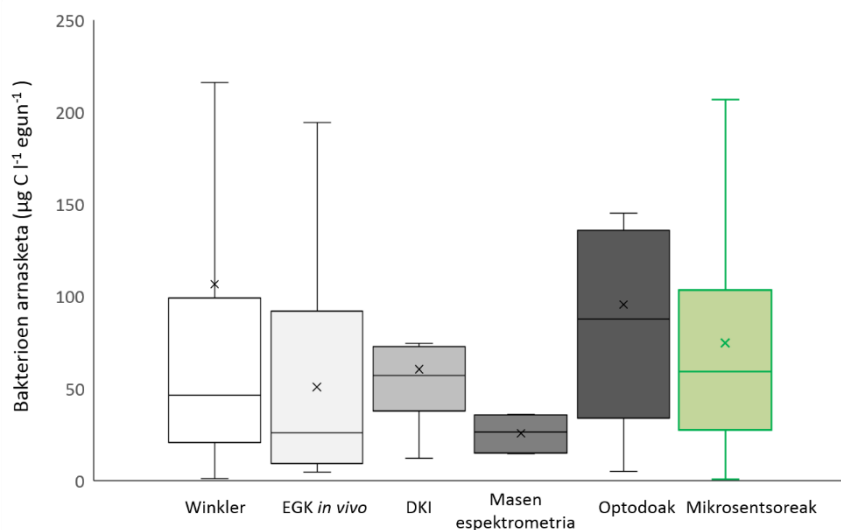
Kostaldeko uretan lortutako arnasketa estimazioetatik, %5,8k soilik erabili zituzten 6 ordutik beherako inkubazio-denborak. Portzentaia hori %7,4ra igotzen da hiru ur-sistematarako aztertutako estimazio guztiak kontuan hartzen badira.



**1.4. Irudia.** Ur- sistema desberdinetan (ozeano irekia, kostaldeko urak, estuarioak eta ibaiak) eta ikerlan honetan  $\leq 6$  ordutako (RB1) eta  $\geq 12$  ordutako (RB2) inkubazio-denborekin lortutako bakterioen arnasketa-neurrien arteko konparaketa. "x" horiek datu-multzo bakoitzaren batez besteko balioak adierazten dituzte.

Komunitate zientifikoak gehien erabili zuen metodoa Winkler metodoa izan zen (aztertutako lan guztien %68a; %75a kostaldeko sistemetan egindako lanen kasuan). Oxigeno-mikrosentsoreen erabilera, berriz, bakterioen arnasketa neurtzeko ohiko metodo gisa oraindik ez dago oso hedatuta eta ur-gezako sistemetara mugatuta dago (aztertutako lanen %5a). Mikrobioen ekologiaren esparruan arnasketa neurtzeko teknika asko erabili izan diren arren, eta espero ez bezala, ez zen desberdintasun esanguratsurik ikusi bakterioen arnasketa-neurrien artean erabilitako metodoaren arabera ( $p > 0,01$  faktore bateko ANOVAra post hoc Bonferroni proba) (1.5. Irudia). Konparazioa kostaldeko sistemetan mikroorganismo komunitate desberdinekin eta urteko sasoi desberdinetan lortutako neurriekin egin zen, eta horrek desbideratze oso handiak eta tekniken

arteko balizko ezberdintasunen moteltzea eragin zezakeen. Hala ere, gure laborategian lagin berarekin egindako konparaketa batean, 48 orduko inkubazioan disolbatutako oxigenoaren jaitsieraren monitorizazioa egin zen Winkler metodoaren bidez (8 ordutik behin neurtuta, 130 ml-ko bialeetan) eta oxigeno-mikrosentsoreen bidez (neurketa jarraitua, 4 ml-ko ganberatan), non teknika biek inportutako arnasketa-neurrien artean desberdintasun esanguratsuak ikusi ziren (48 orduko eta 6 orduko inkubazio-denborak erabiliz inportutakoak, hurrenez hurren). Gainera, bi ontzietan disolbatutako oxigeno-kontzentrazioaren jaitsieraren dinamikak 3 etapako patroia ez-lineal bera jarraitu zuela baieztatu zen, nahiz eta bi ontzien artean desberdintasun nabarmenak eduki bolumenari dagokionez (erakutsi gabeko datuak).

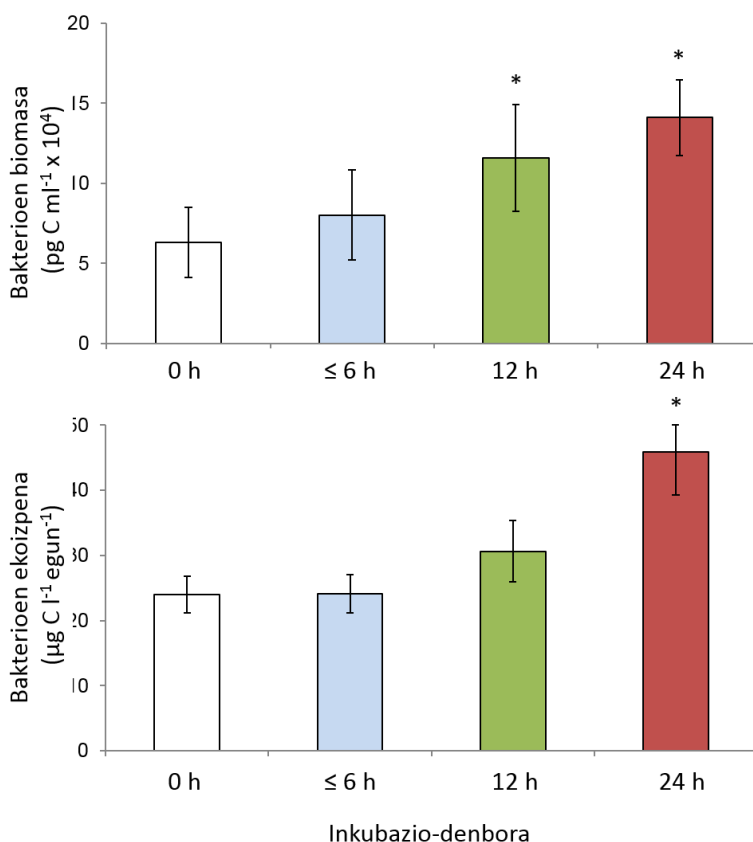


**1.5. Irudia.** Beste kostaldeko sistema batzuetan teknika desberdinen bidez determinatutako bakterioen arnasketa-neurrien eta ikerlan honetan (berdea)  $\leq 6$  orduko inkubazio-denboran (RB1) oxigeno-mikrosentsoreen bidez inportutako arteko konparaketa. EKG: elektroien garraio-katea; DKI: disolbatutako karbono inorganikoa. "x" horiek datu-multzo bakoitzaren batez besteko balioak adierazten dituzte.

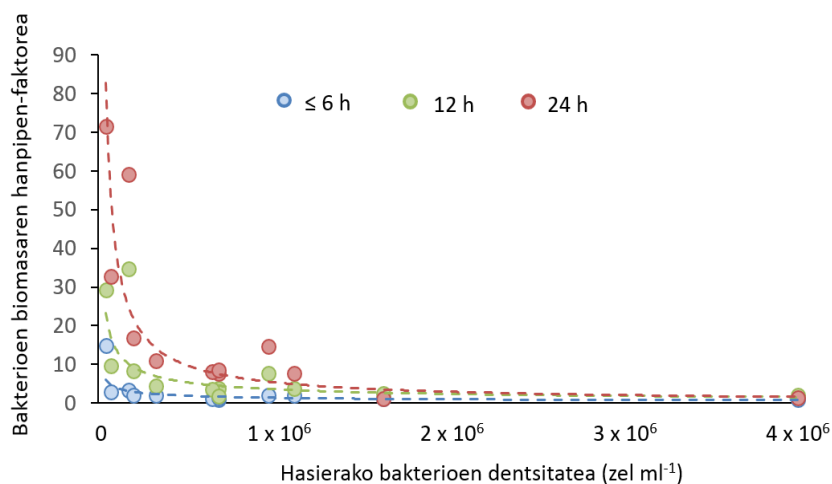
### *Aldaketak bakterioen komunitatean inkubazioan zehar*

Bakterioen biomasaren eta ekoizpenaren bilakaerak ez ziren esanguratsuki desberdinak izan hasierako laginaren eta  $\leq 6$  orduko inkubazioko laginaren artean (t-Student pareatua,  $p > 0,05$ ), baina bakterio-komunitatearen biomasaren eta

ekoizpenaren balioak esponentzialki handitu ziren une horretatik aurrera (1.6. Irudia). Horrela, desberdintasun esanguratsuak antzeman ziren hasierako biomasaren (0 h) eta 12 orduko eta 24 orduko biomasaren artean, baita hasierako ekoizpenaren eta 24 orduko inkubazioko ekoizpenaren artean ere (t-Student pareatua,  $p < 0,01$ ). Bakterioen biomasaren kasuan, hautemandako aldatetako zakarragoak izan ziren hasierako bakterioen dentsitatea baxuagoa izan zen heinean, batez ere inkubazioko 6 orduetatik aurrera (1.7. Irudia).  $2 \times 10^5$  zel  $\text{ml}^{-1}$  baino dentsitate baxuagoko laginetan, komunitateko biomasa 34,6 eta 71,5 aldiz handitu zela detektatu zen 12 orduko eta 24 orduko inkubazioen ostean, hurrenez hurren.

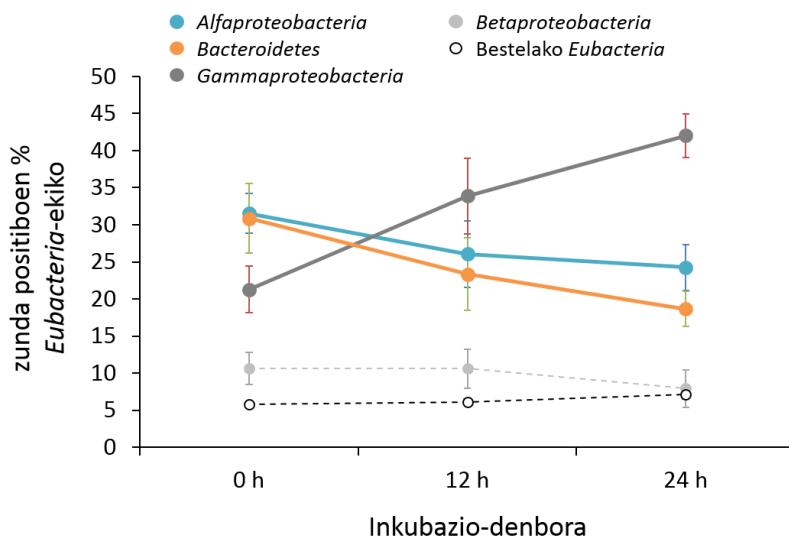


**1.6. Irudia.** Bakterio-komunitatearen ekoizpenaren eta biomasaren batez besteko balioa ± desbiderapen estandarra 4 ml-ko ganbera zigitatueta (0 h, 3-6 h, 12 h eta 24 h). Izartxoek inkubazio-denbora horretako batez besteko balioen eta hasierako balioen (0 ordu) arteko desberdintasun esanguratsuak adierazten dute (t-Student,  $p < 0,05$ ).



**1.7. Irudia.** Bakterioen biomasaren handipen-faktorea 3 edo 6 h, 12 h eta 24 h, laginaren hasierako bakterioen dentsitatearekiko. n = 12.

Bakterio-komunitatearen konposizioa ere ez zen konstante mantendu inkubazio 24 orduetan zehar (1.8. Irudia). Inkubazioan zehar *Betaproteobacteria*-en eta beste *Eubacteria*-en portzentaian aldaketa esanguratsurik ikusi ez baziren ere, *Alfaproteobacteria*-k eta *Bacteroidetes*-ek bilakaera desberdinak izan zituzten. *Alfaproteobacteria* eta *Bacteroidetes* hasierako komunitateetan talde nagusiak izan ziren (%31,5 ± 2,7 eta %30,8 ± 4,7, hurrenez hurren), baina pisu espezifikoak %26,0 ± 4,5era eta %23,3 ± 4,9ra jaitsi zen 12 orduko inkubazioaren ondoren, eta %24,2 ± 3,1era eta %18,7 ± 2,3ra 24 orduko inkubazioaren ondoren. Alderantziz, *Gammaproteobacteria* nabarmen handitu zuten komunitateari egiten zioten ekarpena: %21,3 ± 3,1etik %33,9 ± 5,1era, 12 orduko inkubazioaren ondoren, eta %42,0 ± 2,9ra 24 orduren buruan. Beraz, aldaketa nabarmena gertatu zen bakterio-komunitatearen konposizioan 12 orduko inkubazio-denbora baino lehen.



**1.8. Irudia.** CARD-FISH bidez aztertutako bakterio-komunitatearen konposizioaren bilakaera, 4 ml-ko ganberetan, inkubazioaren hainbat unetan (0 h, 12 h, 24 h) detektatutako *Eubacteria* guztiekiko zunda positiboaren portzentaia gisa kalkulata. n = 10.

## Eztabaida

Ur-sistemetan arnasketa neurtzeko erabili ohi diren metodoek (Winkler metodoa, adibidez) lagineko disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa neurri etenak egitea eskatzen dituzte oxigeno-kontzentrazioan beherakada esanguratsuak detektatu ahal izateko, baita hainbat erreplika eta kasu askotan 24 orduetik gorako inkubazio-denbora luzeak ere (Bryan *et al.*, 1976; Hartwig & Michael, 1978; Williams & Jenkinson, 1982). Horrela, arnasketa, hasierako eta amaierako inkubazio-denborako disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioen arteko diferentziaren bidez estimatu izan da askotan, inkubazioan zehar oxigenoaren jaitsiera lineala onartuz eta, beraz, mikroorganismo-komunitatea egonkor mantentzen dela onartuz, bai kopuruari, bai jarduerari eta bai konposizioari dagokionez. Izan ere, eremu horretan egindako ikerlanen %70ek, gutxi gorabehera, onartu zuten inkubazioan zehar oxigeno-kontsumoa lineala izan zela (ikus Robinsonen berrikuspina, 2008), nahiz eta onarpen horren egiazkotasuna zalantzan jartzeko froga nahikoak egon. Esate baterako, Pomeroy-k eta bere laguntzaileek (1994) oxigeno-kontzentrazioa modu etenean neurtu zuten inkubazioaren hasieraren

eta amaieraren arteko tarteko puntuetan, Atlantikoko subtropikaleko eta tropikaleko ur-laginetan, eta aztertutako lagin gehienetan oxigeno-jaitsiera 12 orduko inkubaziotik aurrera ez zela lineala detektatu zuten. Briand-ek eta kolaboratzaileek ere (2004), Kaledonia Berriko aintziraren hego-mendebaldeko ur-laginekin egindako ikerketa batean, oxigeno-kontzentrazioaren jaitsiera etengabe monitorizatuz hiru joera ez-lineal bereizi zituzten, laginaren egoera trofikoaren menpekoak zirenak.

Lan honetan, aztertutako 120 laginetatik 5etan soilik ikusi ziren 24 orduz inkubazioak linealki behera egin zuela. Gainerako 115 laginetan oxigenoaren jaitsiera hasierako abiaduraren antzeko abiadura konstantean mantendu zen inkubazioaren lehenengo 3 edo 6 orduetan, eta ondoren linealtasuna galdu zen, arinago gertatuz bakterio-dentsitate baxua zuten laginetan. Inkubazio-denbora horiek orain arte arnasketa neurtzeko erabilitakoak baino askoz baxuagoak dira, seguru asko 6 orduetik beherako inkubazio-denborekin ez zutelako desberdintasun esanguratsurik lortzen hasierako eta amaierako oxigeno-kontzentrazioen neurketen artean ur-sistema naturalako lagin gehienetan (Pomeroy *et al.*, 1994). Kantauri Ekialdeko kostaldeko uretan, 12 orduko edo gehiagoko inkubazio-denbora luzeak erabiltzeko bakterioen arnasketa emendatzea ekarri zuen ia lagin guztietan, inkubazio-denbora laburrekin lortutako balioekin alderatuta ( $\leq 6$  ordu). Kontuan hartuta uretako hainbat sistematan egindako bakterioen arnasketaren estimazioen %92,6a 12 orduetik gorako inkubazio-denboren ondoren lortu zirela, emaitza horiek lortutako bakterioen arnasketaren neurri asko balioetsi ahal izan direla adieraz lezakete.

Frogatu da inkubazio-denborak eragina duela dentsitatean, biomasan, jardueran edo bakterio-komunitatearen konposizioan. Beste egile askok ere ikusi dute efektu hori (Biddanda *et al.*, 1994; Gasol & Morán, 1999; Massana *et al.*, 2001; Gattuso *et al.*, 2002; Briand *et al.*, 2004; Calvo-Díaz *et al.*, 2011). Bakterioak komunitate planktonikoaren beste partaideetatik bereizi behar dira bakterioen arnasketa determinatzeko oxigeno-kontsumoaren neurketa zuzenak erabiltzen direnean. Horren ondorioz, artefaktu potentzialak sartu ahal dira: komunitate

autotrofoetatik bereiztearen ondorioz materia organikoaren hornidurak kentzea, lehiakideak eta harrapariak ezabatzea (Fuhrman & Bell, 1985; Hopkinson *et al.*, 1989; Gasol & Morán, 1999; Robinson, 2008), botila-efektua ganberako horman materia organikoa adsorbitzearen eta kontzentratzearen ondorioz, laginaren aberastea iragazketaren bidez hautsitako zelulen ondorioz edo mantenugaien eta karbono organikoaren kantitatea handitzearen eta kalitatea aldatzearen ondorioz (Fuhrman & Bell, 1985; Gasol & Morán, 1999; Kiene & Linn, 1999; Sherr *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 2000; Massana *et al.*, 2001). Protozoo bakteriboroen eta fitoplanktonaren nutrizio-lehiakortasunaren eragin handia duten bakterio-komunitateetan, bakterioak fisikoki bereizteak haien hazkundera erraztu dezake; horrela, kontsumitutako oxigeno-kantitatea handituko da, komunitatearen arnasketa artifizialki aktibatuz eta, ondorioz, bakterioen arnasketa balioestea eraginez.

Gainera, materia organikoaren kantitatean eta kalitatean gerta daitezkeen aldaketek bakterio-komunitatearen erantzun metabolikoetan ere aldaketak eragingo lituzkete, bakterio-talde jakin batzuen jarduera areagotuz eta/edo murriztuz baldintza berrien arabera, eta bakterio-komunitatearen konposizioan aldaketak eraginez. Zenbait ikerketek frogatu dute komunitate planktonikoa bereizi ondorengo inkubazio luze batek DNA eduki handia duten bakterioen hazkundera errazten duela (Gasol & Morán, 1999; Massana *et al.*, 2001) eta hazteko potentzial handia duten bakterioen genotipoak agertzen direla (Sherr *et al.*, 1999). Horrela, talde nagusien hasierako konposizioa inkubazioan zehar ordezkari daiteke, *Gammaproteobacteria* bezalako bakterio oportunisten hazkundera erraztuz. Ondorioz, lagina zatitu eta 12 ordutik gorako inkubazioetan, bakterio-komunitateak ez du ingurune naturalean egingo lukeen bezala eboluzionatzen, eta haren jardueraren neurketak ez dira hasierako baldintzen adierazgarri. Horregatik, inkubazio-denborak hasierako denboratik ahalik eta gertuen erabiltzea funtsezkoa izan daiteke ahalik eta gehien murrizteko ur-sistema naturaleko lagina bereizi ondoren determinatutako bakterio-komunitatearen arnasketaren eta arnasketa errealaeren arteko aldea.

Bolumen handiagoko ontziak erabili beharrean (beste teknika batzuetarako erabiltzen direnak, adibidez) 4 ml-ko ganberak erabiltzean, bolumen-azaleraren erlazioa handitzen da eta, ondorioz, materia organikoaren adsortzioa handiago izan liteke ganberen hormetan. Era horretan, bakterio-komunitatea gehiago aktibatzea eta arnasketa-tasa altuagoak detektatzea gerta liteke. Hala ere, Hammes *et al.* (2010) ez zuten efektu bolumetriko horren ebidentziarik aurkitu. Gainera, etengabe monitorizatzeak disolbatutako oxigenoaren jaitsieraren dinamikan gertatzen diren aldaketak kontrolatzea eta inkubazio-denborak murriztu ahal izatea ahalbidetzen du. Beraz, arnasketaren neurria bakterio-komunitatean aldaketak gertatu aurretik lor daiteke, neurketarako erabiltzen den ontziaren bolumena edozein dela ere.

Bakterioen arnasketa, berez, bakterio-komunitateen jarduerari buruzko informazioa ematen digun parametroa da. Baina, gainera, beharrezkoa da bakterioen hazkuntza-efizientzia determinatzeko, eta, horretarako, bakterioen ekoizpena ere neurtu behar da. Bakterioen ekoizpena konposatu erradioaktiboan barneraketaren bidez lortzen da normalean, eta *in situ* baldintzetatik hurbil dagoen balioa lortzeko, inkubazio-denbora laburretan egiten da (normalean 1 - 2 h). Tradizionalki, beraz, bakterioen ekoizpeneko eta arnasketako neurriak denbora-eskala desberdinetan egin izan dira, eta inkubazio-denboran zehar hautemandako aldaketak direla eta, ziur aski komunitate desberdinekin, bai jarduerari dagokionez, bai konposizioari dagokionez. Hau da, bakterioen arnasketa eta ekoizpena zehazteko beharrezkoak diren inkubazio-denbora minimoetan zeuden denbora-desadostasunen ondorioz, ekosistemaren errealitatea adierazten ez zuten hazkuntza-efizientzien estimazioak egin ahal izan dira. Bi parametro hauek denbora-eskala berean neurtzeko beste aukera bat komunitatearen ekoizpen garbia kalkulatzeko datza, inkubazioan bakterioen dentsitatean edo biomasan izandako aldaketetatik abiatuta (24 ordu) (Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). Hala ere, ikerlan honetan ikusi dugu 24 orduan bakterioen dentsitatea esponentzialki handitzen dela, bakterioen arnasketaren dinamiken aldaketak aldakorak diren bitartean. Beraz, metodologia hori erabiltzeak



ziurgabetasuna gehitu besterik ez lieke egingo hazkuntza-efizientziaren neurri. Alternatiba gisa inkubazio-denbora 6 ordu baino gutxiagora murriztea proposatzen dugu, honek aukera ematen baitu bakterioen ekoizpena eta arnasketa denbora-tarte berean neurtzeko eta bakterioen hazkuntza-efizientziaren neurri zehatzagoak eta hasierako baldintzetatik hurbilagoak lortzeko.

Azken batean, 12 orduetik gorako inkubazio-denborak erabiltzeak bakterioen arnasketa balioestea eragiten du, baita aldatutako hazkuntza-efizientziaren estimazioak lortzea ere, bakterio-komunitatearen dentsitatean, tamainan, jardueran eta/edo konposizioan aldaketa esanguratsuak gertatzen direlako. Oxigeno-mikrosentsoreek oxigeno kontzentrazioaren jaitzieraren bilakaera etengabe monitorizatzeko aukera ematen dute; horrela, lagin bakoitzean arnasketa-dinamiketan gertatzen diren aldaketak banaka identifika daitezke, disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura lineala eta hasierakoaren antzekoa den denbora mugatu daiteke, eta horrela, inkubazio-denbora 6 orduetik beherako aldietara nabarmenki murriz daiteke. Metodologia honek bakterioen arnasketa-neurri zehatzak lortzea baimentzen du, ekosistemaren errealitatearekin bat datozen hazkuntza-efizientziaren balioak kalkulatzeko, ur-sistema naturaletako karbonoaren birziklapenari buruzko ezagutza hobetzea ahalbidetuz.

## 2. KAPITULUA:

Protozoo bakteriboroen harraparitzak  
disolbatutako materia organikoan  
eragindako eraldaketek bakterioen  
metabolismoan aldaketak sortzen ditu

Argitaralpena:

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.





## Laburpena

Kapitulu honetan, bakterioen hazkuntzak eta protozoo bakteriboroen harraparitzak disolbatutako materia organikoan eragindako aldaketek Kantauri Itsasoaren ekialdeko eta Mediterraneo Itsasoaren ipar-mendebaldeko kostaldeko bakterio-komunitateen metabolismoa nola aldatzen duten aztertu da. Itsas-ur naturalaren erdia harrapari-presa kurbaren funtsezko uneetan bildutako kalitate desberdineko disolbatutako materia organikoaz ordeztu ziren tratamenduak diseinatu ziren. Tratamendu hauetan ezaugarri metaboliko nagusiak neurtu ziren disolbatutako materia organiko fluoreszentean oinarrituta. Bi ekosistemetan, harrapariak eraldatutako disolbatutako materia organikoaren erabilerak bakterioen karbono-eskaria %200an handitzea eta hazkuntza-efizientzia Kantauri Itsasoan %56an eta Mediterraneo Itsasoan %46an murriztea eragin zuen. Bakterioen hazkuntza-efizientzia baxu horiek antzeko ekoizpenek eragin zituzten, baina arnasketa-tasak askoz altuagoak izan ziren, eta horiek, aldi berean, positiboki lotuta egon ziren leuzina aminopeptidasa entzima-jarduerarekin. Hala ere, Kantauri Itsasoko bakterio-komunitatean, non *Bacteroidetes* nagusitzen ziren (% 41), entzima-jarduera hidrolitikoek handitzeak Mediterraneo Itsasoan baino kostu metaboliko baxuagoarekin gertatu zen, non SAR11 nagusitzen zen (% 47). Horrek iradokitzen du *Bacteroidetes* hobeto egokitzen direla bakteriboroen harrapakaritzaren ondorioz eraldatutako disolbatutako materia organikora. Eraitza horien arabera, kostaldeko ekosistemetan protozoo bakteriboroen harraparitza bakterioen hazkuntza-efizientzian eragiten duen faktore garrantzitsua da, eta bakterio-komunitatearen konposizioa disolbatutako materia organikoaren kalitatea aldatu ondoren sortzen diren prozesu metabolikoen aldaketa nagusiekin erlaziona daiteke.

## Sarrera

Disolbatutako materia organikoa ozeanoko materia organiko guztiaren zati garrantzitsu bat da (Sharp, 2002) eta bakterio heterotrofoak eta arkeoak dira bere organismo kontsumitzaile planktoniko nagusiak (Pomeroy, 1974). Disolbatutako materia organikoaren eskuragarritasuna bakterio heterotrofoentzako bere konposizio biokimikoaren eta tamaina molekularren arabera da. Hau dela eta, disolbatutako materia organikoaren edozein egitura- edo konposizio-erlaketak bakterioen metabolismoaren zenbait alderdiri eragingo die; horien artean karbono-kontsumoari, hazkuntza-tasari, arnasketa-tasari, entzimen bidezko degradazioari eta mantengai ez-organikoen eskaerari (Findlay, 2003). Baliabideetatik eratorritako bakterioen aktibitatearen aldaketek ekosistemaren prozesuak aldatzeko ahalmena dute, hala nola arnasten den materia organikoaren frakzioaren eta goi-maila trofikoetara transferitzeko eskuragarri dagoen frakzioaren arteko oreka (Smith & Kemp, 2003; Lennon & Cottingham, 2008). Bakterioen hazkuntza-efizientzia oreka hori islatzen duen aldagaia da eta, beraz, karbono organikoaren horniduren norakoa balioztatzen du, bakterioek ur-ekosistemetan bitartekari (birziklatzaile) edo hustubide (mineralizatzaile) gisa jarduten duten zehaztuz (Sherr & Sherr, 1996; Giorgio & Cole, 1998; Carlson et al., 2007).

Itsasoan dagoen disolbatutako materia organikoak etengabeko aldaketak jasaten ditu, bai faktore abiotikoen eraginez, bai ultramore argiaren eraginez (Moran & Zepp, 1997; Schmitt-Kolpin *et al.*, 1998), bai bakterioek, protozooek eta birusek eragindako prozesu biologikoengatik (Nagata, 2000; Ogawa *et al.*, 2001; Motegi *et al.*, 2009). Disolbatutako materia organikoaren ezaugarri biokimikoen eta kalitatearen aldaketak haren propietate optikoei lotuta egon daitezke (Stedmon *et al.*, 2003); hala nola fluoreszentzia, erreodox egoerari kalitateari (material humikoak eta proteikoak), eta disolbatutako materia organikoaren erreaktibitate biologikoari eta fotokimikoari buruzko informazio fidagarria ematen duena (Miller *et al.*, 2006; Fellman *et al.*, 2010). Itsasoko materia organiko fluoreszentea bakterioen metabolismoaren azpiproduktutzat jo izan da nagusiki (Chen & Bada,

1992; Kramer & Herdl, 2004; Nieto Cid *et al.*, 2006; Yamashita & Tanoue, 2008), baina ikerketa batzuek erakutsi dute zelula eukariotoek ere sor dezaketela (Steinberg *et al.*, 2004; Urbano rico *et al.*, 2006; Ortega Retuerta *et al.*, 2009; Romera-Castillo *et al.*, 2010). Bakterioetatik eratorritako zenbait espezie molekular, besteak beste, porinak (Yamada & Tanoue, 2003), D-aminoazidoak (McCarthy *et al.*, 1998; Kaiser & Benner, 2008), azido muramikoa (Benner & Kaiser, 2003; Kaiser & Benner, 2008) eta lipopolisakaridoak (Wakeham *et al.*, 2003) detektatu dira itsasoan disolbatutako materia organiko errefraktarioan, ez liratekelarik guztiz eskuragarri egongo beste bakterio batzuetarako. Molekula horiek bakterioen hazkuntzan zuzenean iraitzi litezke (Jiao *et al.*, 2010). Bakteriboroen harraparitzak eta birusek eragindako lisiak, zeinei askotan bakterioen hazkuntza handiko aldiak jarraitzen dizkieten, inpaktu garrantzitsua izan dezakete disolbatutako materia organikoaren konposizioan (Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; Boras *et al.*, 2010). Protozoo bakteriboroen harraparitza-jarduerak digeritu gabeko osagaiak askatzen ditu, baita pisu molekular altuko eta baxuko disolbatutako konposatu organikoak ere (Taylor *et al.*, 1985), disolbatutako materia organikoaren konposizio kimikoan aldaketak eragiten dituztenak (Nagata & Kirchman, 1991; Strom *et al.*, 1997; Nagata, 2000; Carlson, 2002). Beste konposatu batzuen artean, disolbatutako aminoazido aske eta konbinatuak (Nagata & Kirchman, 1991), material koloidala (Koike *et al.*, 1990) eta entzimak (Nagata, 2000) identifikatu dituzte ikertzaileek. Gainera, disolbatutako materia organikoaren askapena mikroinguruneetan handia izatea espero da, non bakterioplanktonaren hazkuntza handia den eta harraparitzaren eta birusen lisiaren presio handia dagoen (Artolozaga *et al.*, 2002). Disolbatutako materia organiko eraldatuaren handipen horrek mikroheterogeneitatea eragin dezake karbono-iturrien labilitatean, baita mikroingurune horietara hurbiltzen diren beste bakterio batzuen metabolismoan eta portaera fisiologikoan ere. Baina, dakigunera arte, oraindik ez da aztertu bakteriboroen harraparitzak disolbatutako materia organikoan eragindako alterazioaren ondorioz bakterioen hazkuntza-efizientzian jaso daiken aldaketa.

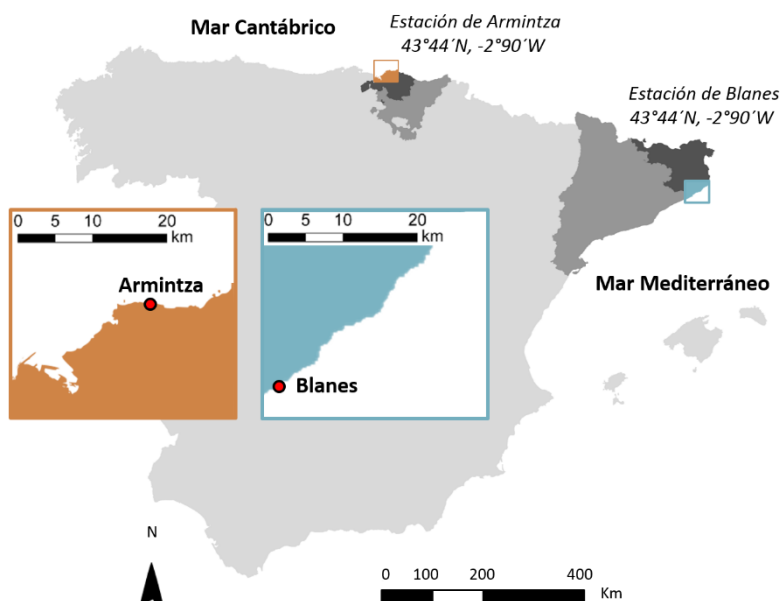
Epe laburrean, litekeena da bakterioentzat eskuragarri dagoen karbonoaren kalitatean edo kantitatean gertatzen den edozein aldaketak aldaketa fenotipikoak eragitea bakterioetan adierazpen genetikoaren erregulazioaren ondorioz. Baina epe luzera, mikrobiologikoki eraldatuta dagoen disolbatutako materia organikoaren presentziak, komunitatearen konposizioan ere aldaketak eragin ditzake (Findlay *et al.*, 2003). Jakina da bakterio talde ezberdinak disolbatutako materia organikoaren frakzio ezberdinak mineralizatzen dutela (Cottrell & Kirchman, 2000; Elifantz *et al.*, 2007) eta, beraz, disolbatutako materia organiko berri eta eraldatu baten aurrean bakterio-komunitate jakin baten erantzun metabolikoa duen konposizioaren araberakoa izango da. Ildo horretan, Comte-k eta del Giorgio-k (2011) erantzun fenotipiko horretarako faktore erabakigarria komunitateen berezko propietatea izan zitekeela adierazi zuten, bereziki filotipo nagusien plastikotasun funtzional eta metabolikoaren mailarekin lotutakoa.

Lan honen helburua, bakterioen hazkuntzaren eta protozooen harrapartzaren ondorioz eraldatzen den disolbatutako materia organikoak bakterioen hazkuntza-efizientziari nola eragiten dion aztertzea izan zen. Bakterioen arnasketa, ekoizpena eta hazkuntza-efizientzia kostaldeko bakterio-komunitateetan neurtu ziren, zeintzuek haien disolbatutako materia organiko naturalaren erdia ordezkaturik zeukaten. Ordezkapen hauek, harrapartza-presa bizikidetzaren une desberdinetatik eratorriak ziren disolbatutako materia organiko eraldatu desberdinekin egin ziren, besteak beste. Gure ustez, ezaugarri desberdinak dituen disolbatutako materia organikoa erabiltzearen ondorioz gertatutako aldaketa fenotipikoek kostu metaboliko handia eragiten dute bakterioentzat. Kostu metaboliko hori bakterioen hazkuntza-efizientzien murrizpenean islatzen da. Erantzun fenotipiko horietan bakterio-komunitatearen konposizioak duen zeregina zehazteko, haien artean oso ezberdinak diren kostaldeko bi ekosistemetan egin zen ikerketa hau: Armintzako estazioan (Kantauri Itsasoaren ekialdean) eta Blanes Badiako mikroorganismoen behatokian (Mediterraneo Itsasoaren ipar-mendebaldean).

## Materialak eta metodoak

### *Laginketa eta prozedura esperimental*

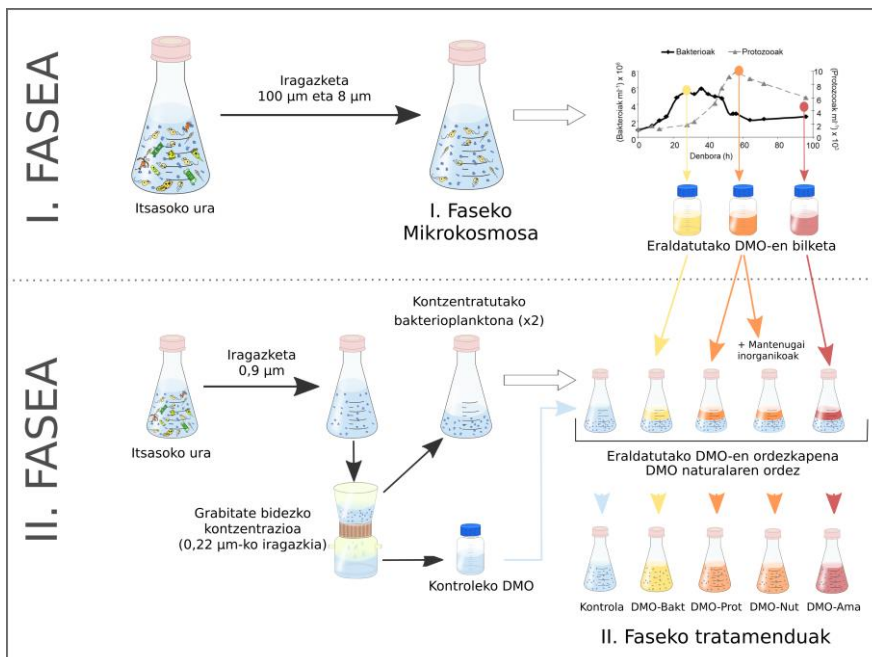
Bost esperimentu egin ziren itsasoko gainazal urarekin (0,5 metroko sakonera), kostaldeko bi itsas giroetatik zetozenak: Kantauri Itsasoan (Armintzako estazioa, 43°44'N, -2°90'W) hiru esperimentu egin ziren, 2007ko maiatzean (K1) eta ekainean (K2 eta K3); eta Mediterraneo Itsasoan (Blanes Badiako estazioa, 41°40'N, 2°48'W) bi esperimentu, 2008ko uztailean (M1) eta 2009ko uztailean (M2) (2.1. Irudia).



**2.1 Irudia.** Kantauri itsasoan (Armintza) eta Mediterraneo itsasoan (Blanes) dauden laginketa-estazioen kokapena.

Diseinu esperimental (2.2.Irudia) bi fasetan egin zen: lehenengoa, mikroorganismoen komunitateek eraldatutako disolbatutako materia organikoa lortzeko (I. fasea) eta, bigarrena, disolbatutako materia organiko eraldatu horiek bakterioplanktonean duten eraginak deskribatzeko (II. Fasea).



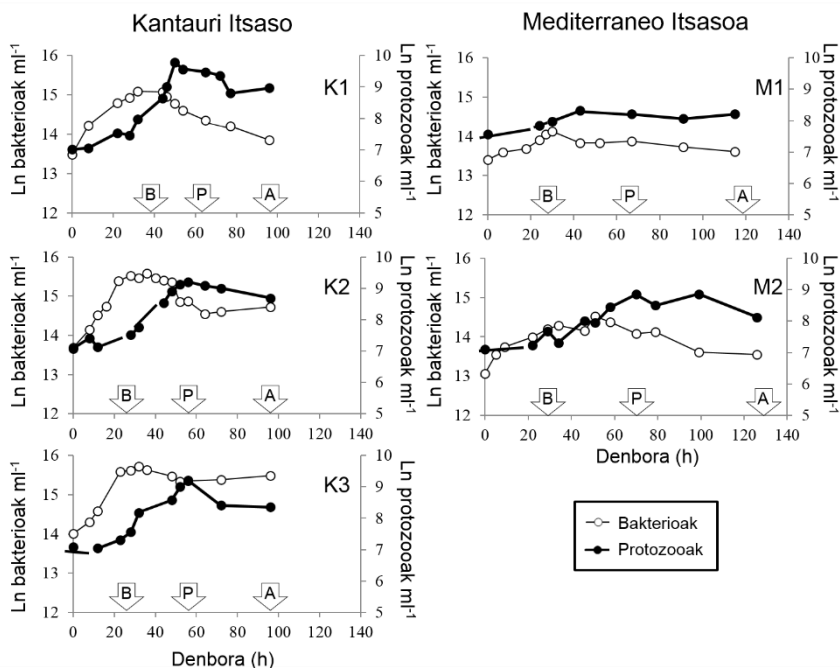


**2.2. Irudia.** Kantauri Itsasoan eta Mediterraneo Itsasoan egindako diseinu esperimentalaren eskema, bi fasetan egin: mikroorganismoen komunitateek disolbatutako materia organiko (DMO) eraldatuaren bilketa (*I. Fasea*) eta DMO naturalaren ordezkapena (*II. Fasea*).

***I. Fasea:*** Itsasoko ura 8 µm poro tamainako polikarbonatozko iragazkien bidez iragazi zen, mikro- eta mesozooplanktona kentzeko. Hasierako disolbatutako materia organikoaren konposizioa zehazteko alikuota bat jaso ondoren, esperimentu bakoitzerako 5 litroko mikrokosmos bat inkubatu zen 20°C-tan 96-120 orduz, eta bakterio eta protozoen dentsitateak 4 orduro monitorizatu ziren. Bi komunitate horiek esperimentu bakoitzean izan zuten eboluzioak 2.3. Irudia erakusten dira. Inkubazioan zehar, disolbatutako hiru materia organiko mota jaso ziren, disolbatutako materia organikoa eraldatuta zutenak jatorrizko itsasurarekin konparatuta: 1) DMO-Bakt, bakterioen dentsitatea maximoa zeneko unean; 2) DMO-Prot, protozoen dentsitatea maximoa zeneko unean; 3) DMO-Ama, sistemaren inkubazioaren amaieran edo gainbeheran.

Une horietako bakoitzean, mikrokosmosaren ur-bolumen bat iragazi zen erretako 0,22 µm poro tamainako zelulosazko ester iragazkien bidez (Whatman), eta material honen 500 ml -20°C-tan gorde ziren erabili arte. Jatorrizko materia

organikoaren (hartu berri den uraren laginean) eta eraldatutako hiru materia organiko horien kalitatea eta aldakortasuna disolbatutako materia organiko fluoreszentearen analisiaren bidez karakterizatu ziren.



**2.3. Irudia.** Bakterioen eta protozooen komunitateen denbora-bilakaera I. Faseko mikrokosmosetan, Kantauri Itsasoa egindako hiru esperimentueta (K1, K2 eta K3) eta Mediterraneo Itsasoa egindako bi esperimentueta (M1 eta M2). Geziek DMO-Bakt (B), DMO-Prot (P) eta DMO-Ama (A) laginak noiz hartu ziren adierazten dute.

**II. Fasea:** Fase honetan bakterio planktonaren suspentsioak lortu ziren (tratamenduak), eta laginaren jatorrizko disolbatutako materia organikoaren parte bat I. Fasean garatutako mikrokosmosetatik eratorritako disolbatutako materia organiko eraldatuekin ordeztu ziren. Horretarako, ahal bezain laster (I. Faseko disolbatutako materia organiko eraldatuaren azken bilketa egin eta 2-4 egunetara) berriro bildu zen laginketa-estazioko gainazaleko itsas-ura. Mikroorganismoen dentsitatea eta bakterio-komunitatearen konposizioa aztertu ziren. Bildu berri zen itsasoko ura aurreiragazi zen  $0,9 \mu\text{m}$  poro nominaleko tamainako beira-zuntzeko iragazkietan zehar (Millipore, AP25), bakterioak gainerako komunitate planktonikoetatik bereizteko. Ondoren, bakterio planktona

grabitate bidez kontzentratu zen 0,22  $\mu\text{m}$  poro tamainako ester-zelulosazko (Whatman) iragazki erre baten bidez, Itsas-uraren bakterio-dentsitatearen bikoitza lortu arte, gutxi gorabehera. Horrez gain, eraldatugabeko disolbatutako materia organikoko 500 ml lortu ziren, II. Fasean erabilitako hasierako lagina, 0,22  $\mu\text{m}$  poro tamainako ester-zelulosazko (Whatman) iragazki erreen bidez iragaziz. Kontzentratutako bakterioplanktona, disolbatutako materia organikoari dagokionez osaera desberdina zuten laginekin batera, 2.1. Taulan zehazten diren 5 tratamenduak ezartzeko erabili zen. Bakterioen kontzentratua eta MOD-Prot zuen beste tratamendu batean mantenugai ez-organikoak gehitu ziren (0,5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 0,05  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^-$  y 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ ) MOD-Nut tratamenduari, mantenugaiak mugatzaileak zirenentz egiaztatzearen.

**2.1. Taula.** Esperimentalean erabilitako tratamenduen konposizioa. DMO: disolbatutako materia organikoa.

Tratamendua	Kontzentratutako bakterioplanktona	Gehitutako bolumena eta DMO mota	Gehitutako DMO-ren jatorria	Mantenugai ez-organikoen aberasketa
Kontrola	500 ml	500 ml Eraldatugabeko DMO	II. Fasea	Ez
DMO-Bakt	500 ml	500 ml DMO-Bakt	I. Fasea	Ez
DMO-Prot	500 ml	500 ml DMO-Prot	I. Fasea	Ez
DMO-Nut	500 ml	500 ml DMO-Prot	I. Fasea	Bai
DMO-Ama	500 ml	500 ml DMO-Ama	I. Fasea	Ez

5 tratamenduetako bakoitzean, disolbatutako materia organikoa ordeztu eta berehala, alikuotak hartu ziren disolbatutako karbono organikoa eta disolbatutako materia organikoa fluoreszentea neurtzeko, 24 orduetara berriro neurtu zirenak. Gainera, bakterioen arnasketaren, ekoizpenaren eta zelulaz kanpoko entzima-jardueraren neurriak tratamendu eta kontrol guztietan neurtu ziren disolbatutako materia organiko eraldatu guztiak ordezkatu eta berehala.

### *Mikroorganismoen dentsitatea*

Bakterioen, protozooen eta birusen dentsitateak epifluoreszentzia-mikroskopiaren bitartez zenbatu ziren (Porter & Feig, 1980; Noble & Fuhrman, 1998). Bakterioen eta birusen kasuan laginak kaltzio-karbonatoarekin tanponatutako formalinarekin fixatu ziren eta tetraborato sodikoarekin tanponatutako formalinarekin nanoflagelatuen kasuan (azkeneko kontzentrazioa %2 v/v kasu guztietan). Laginak 4°C-tan iluntasunean biltegitatu ziren analizatu arte, beti ere 24 h pasatu baino lehen. Zenbaketak egiteko, bolumen ezaguneko azpilaginak hartu ziren (1 ml bakterioak zenbatzeko eta 4 ml nanoflagelatuak zenbatzeko), DAPIrekin (4'6'-diamidino-2phenylindole) 10 minutuz tindatu ziren (azkeneko kontzentrazioa 2 µg ml<sup>-1</sup>), eta 0,22 µm eta 0,8 µm poro-tamainako polikarbonatozko iragazki beltzen bidez (Whatman) iragazi ziren, bakterioak eta nanoflagelatuak zenbatzeko hurrenez hurren. Partikula birikoak zenbatzeko, 1 ml-tako azpilaginak Acrodisc iragazkien bidez iragazi ziren, 0,02 µm poro tamainakoak (Whatman), eta SYBR Green I-ren %0,2ko tanta batean jarri ziren, 15 minutuz tindatu ostean 0,02 µm-tatik iragazitako ur-distilatuarekin ikuzi ziren. Azkenik, iragazki guztiak beirazko portetan muntatu ziren, DAPI-rentzat UV argi eta SYBR Green-entzat argi urdinez hornitutako epifluoreszentzia-mikroskopiaoren azpian jarri ziren (Nikon Optiphot). Iragazki bakoitzean ausaz aukeratutako eremu mikroskopikoak ezarri ziren hiru mikrobiar komunitateak zenbatzeko. Gutxienez 20 eremu zenbatu ziren bakterio eta birusen dentsitatea kalkulatzeko, eta gutxienez 100 eremu nanoflagelatuen dentsitatea kalkulatzeko.

### *Bakterioen ekoizpena*

Bakterioen ekoizpena proteinen sintesi-abiaduratik abiatuta estimatu zen, leuzina tritiatuaren barneratze-metodoa erabiliz (Kirchman *et al.*, 1985). Isotopoa ([<sup>3</sup>H] - Leuzina) kontzentrazio asetzailan (amaierako kontzentrazioa 40 nM) 5 ml-tako hiru azpilaginetan gehitu zen, eta *in situ* tenperaturan eta iluntasunean inkubatu ziren 1 h Kantauri Itsasoko laginetan eta 2 h Mediterraneo Itsasoko laginetan. Aldi berean, prozedura bera errepikatu zen aurretik azido trikloroazetikoarekin (ATK) fixatutako 5 ml-ko 2 zurirekin (%50eko azken kontzentrazioa). Inkubazioa

gelditzea ATK gehituta (%5eko amaierako kontzentrazioa) eta laginak izotzean 5 minutuz sartuta lortu zen. Ondoren, laginak 0,22  $\mu\text{m}$  poro-tamainako zelulosa-azetatozko iragazkien bidez (Sartorius) iragazi ziren, eta bost aldiz ikuzi ziren 5 ml %5eko ATKrekin. Iragazkiak airean lehortzen utzi, izarniadura-bialetan sartu eta etilo-azetatozko 500  $\mu\text{l}$ -rekin nahastu ziren 20 minutuz. Azkenik, izarniadura-kokteleko 4 ml gehitu ziren (Ultima Gold, Perkin Elmer) eta erradioaktibitatea Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR izarniadura-kontagailu batean neurtu zen, iraungitzea zuzentzeko kanpoko estandarrak erabiliz. Bakterioen biomasaren ekoizpena 1,55 kg C mol leu<sup>-1</sup> konbertsio-faktore teorikoa erabiliz kalkulatu zen, isotopoaren barne-diluziorik ez dagoela onartzen duena (Simon & Azam, 1989). Bakterio-komunitate osoaren ekoizpena kalkulatzeko, 0,9  $\mu\text{m}$  poro-tamainako iragazkian atxiki ziren bakterioen proportzioa eta haien biomasa kontuan hartu ziren. Jarduera espezifikoa kalkulatzeko, bakterioen ekoizpenaren balioa lagin horren bakterioen dentsitatearekin zatitu zen.

### *Bakterioen arnasketa*

Bakterioen arnasketa neurtzeko, kontrol eta tratamendu bakoitzeko azpilagin bi kanpoaldearekin oxigeno-trukea saihesteko diseinatutako 4 ml-tako beirazko ganberetan sartu ziren. Ganbera barruan gertatutako oxigeno kontzentrazioaren jaitziera, neurketa jarraituak baimentzen dituen mikroarnasketa-sistema eta oxigeno-mikrosentsore bat (OX-MR) (Unisense) erabiliz monitorizatu zen (Briand *et al.*, 2004). Beirazko ganberak tenperatura kontrolatuta zeukan bainu batean sartu ziren, tenperatura aldaketek oxigeno-kontzentrazioaren neurketan eragin dezaketen aldaketak saihesteko. Bakterio-komunitatearen arnasketa kalkulatzeko, denboraren eta oxigeno-kontzentrazioaren arteko erregresioaren aldapa negatiboa erabili zen, 6 h baino beherako denboraldiak bakarrik kontuan hartuz. Arnastutako oxigenoa karbono-arnasketa abiaduran bihurtu zen 1-eko arnas-kozientea erabiliz (del Giorgio *et al.*, 2006). Bakterio-komunitate osoaren arnasketa kalkulatzeko, 0,9  $\mu\text{m}$  poro-tamainako iragazkian atxiki ziren bakterioen proportzioa eta haien biomasa kontuan hartu ziren. Jarduera espezifikoa

kalkulatzen, bakterioen arnasketaren balioa lagin horren bakterioen dentsitatearekin zatitu zen.

#### *Bakterioen hazkuntza-efizientzia eta karbono-eskaria*

Bakterioen karbono-eskaria (BKE) eta bakterioen hazkuntza-efizientzia (BHE) honako ekuazio hauen bidez kalkulatu ziren:

$$BKE = BA + BE$$

$$BHE = \frac{BE}{BE + BA} * 100$$

non BA bakterioen arnasketari dagokion eta BE bakterioen ekoizpenari.

Bakterioen karbono-eskari espezifikoa lagin horretako bakterioen dentsitatearekin zatituz kalkulatu zen.

#### *Zelulaz kanpoko entzima-jarduerak*

Analizatutako  $\alpha$ -glukosidasa ( $\alpha$ -Glu),  $\beta$ -glukosidasa ( $\beta$ -Glu) eta leuzina-aminopeptidasa (LAP) zelulaz kanpoko entzima-jarduerak fluorimetria bidez estimatu ziren Hoppe-ren (1983) metodoa jarraituz. Substratu fluorogenikoetako analogoen (4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glukosidoa (MUF- $\alpha$ -Glu), 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glukosidoa (MUF- $\beta$ -Glu), eta L-leuzina-7-amido-4-metil-kumarina (AMK-Leu)) disoluzio egokiak metilzelosolbean prestatu ziren. Substratu hauek 3 ml-tako hiru azpilaginetan gehitu ziren, jarduera bakoitzerako kontzentrazio asetzaillean (MUF- $\alpha$ -Glu eta MUF- $\beta$ -Glu 250  $\mu$ M; AMK-Leu 350  $\mu$ M). Hiru substratuen kontzentrazio asetzailak alde aurretik egindako esperimentuetan zehaztu ziren, entzima bakoitzak 0 eta 1,5  $\mu$ M arteko kontzentrazio-tartean lortutako gehieneko abiaduraren arabera aukeraturik. Laginak *in situ* tenperaturan inkubatu ziren 6 ordu baino gutxiagoko inkubazioetan. Substratuen hidrolisiak Perkin Elmer LS50B espektrofluorimetroa erabiliz antzeman ziren, kitzipapen/igorpen 342 nm/453 nm-ko uhin luzerekin glukosidasen jardueraren kasuan eta 360 nm/445 nm-ko uhin-luzerekin LAP-aren jardueraren kasuan. Fluoreszentziaren igoera lineala jardueran bihurtzeko MUF (0 – 0,5  $\mu$ M) eta AMK (0 – 1  $\mu$ M) fluorokromoen kontzentrazio desberdinekin osotutako zuzen estandarra erabili zen. Entzima-

jarduera espezifikoak lagin horretako bakterioen dentsitatearekin zatituz kalkulatu zen.

#### *Bakterio-komunitatearen konposizioa*

Bakterio-komunitatearen konposizioa CARD-FISH teknikaren bidez determinatu zen Pernthaler-ek *et al.* (2002) deskribatutako teknikaren bitartez. Horretarako, talde espezifikoak detektatzeko diseinatuta zeuden HRP-arekin (peroxidase horseradish) markatutako oligonukleotidoetako zundak erabili ziren: *Bacteria* domeinua (EUB I-ren (Amann *et al.*, 1990) eta EUB II-III-ren (Daims *et al.*, 1999) arteko nahasketa) eta hauetako lau talde filogenetikorik garrantzitsuenak detektatzeko: ALF968 (Neef, 1997) *Alfaproteobacteria*-entzako, ROS537 (Eilers *et al.*, 2001) eta SAR11-441R (Morris *et al.*, 2002) barne, *Rhodobacteraceae* eta SAR11 taldeentzat, hurrenez hurren; BET42a (Manz *et al.*, 1992) *Betaproteobacteria*-entzako; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) *Gammaproteobacteria*-entzako; eta CF319a (Manz *et al.*, 1996) *Bacteroidetes*-entzako. *Eubacteria*-entzako kontrazentzuzko zunda NON338 (Wallner *et al.*, 1993) kontrol negatibo bezala erabili zen. Hibridazio guztiak 35°C-tan 2 orduz burutu ziren, eta jarraian 15 minututako anplifikazioa egin zen tiramida-Alexa488-arekin. Hibridazio-tanpoiko formamidaren kontzentrazioa %55-ekoa izan zen zunda guztientzako ALF968 eta NON338 zundetarako izan ezik, %45koa eta %20koa izan zirenak hurrenez hurren. Hibridazioa egin zen iragazkien sekzioak DAPI-rekin tindatu ziren, ondoren bakterioak epifluoreszentziazko mikroskopiaren bidez zenbatzeko eta zunda bakoitzak bakterio totalarekiko osatzen zuen hibridazio-ehunekoa kalkulatzeko.

#### *Disolbatutako karbono organikoaren neurketa*

Disolbatutako karbono organikoa Benner-en eta Strom-en metodoaren (1993) arabera determinatu zen. Laginak alde aurretik 450°C-tan 4 orduz erretako GF / C (Whatman) iragazkietatik iragazi ziren, azidoz irakuzitako iragazketa-sistema bat erabiliz. Iragazkinaren lehenengo frakzioa baztertu ondoren, itsasoko uraren 10 - 15 ml-tako laginak hartu ziren hirukoiztuta, erretako beirazko anpoiletan. Lagin hauek azido ortofosforikoarekin azidotu ziren pH ~ 2ra, termikoki zigilatu eta

analisia egin arte 4°C-ko iluntasunean biltegitatu ziren. Disolbatutako karbono organikoa Shimadzu TOC-CVS karbono organikoaren analizatzaile batean neurtu zen,  $\pm 0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ -ko doitasunarekin. Ekipoa egunero estandarizatu zen hidrogeno eta potasio ftalato estandar batekin. Disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioa neurtzeko, Milli-Q uraz (Merck) prestatutako zuriaren azalera laginaren batez besteko azalerari kendu zitzaion, eta kurba estandarren maldarekin zatitu zen.

*Disolbatutako materia organiko fluoreszentearen neurketa*

Disolbatutako materia organiko fluoreszentea Nieto-Cid-ek *et al.* (2006) deskribatutakoaren arabera determinatu zen I. Faseko (itsas-ur naturaleko disolbatutako materia organikoa, DMO-Bakt, DMO-Prot eta DMO-Ama) zein II. Faseko (tratamenduak eta kontrolak) laginetan. Neurketa indibidualak kuartzozko 1 cm-tako kubeta ez-fluoreszentetan burutu ziren Perkin Elmer LS50B espektrofluorometro bat erabiliz Kantauri Itsasoko laginen kasuan eta LS55B bat erabiliz Mediterraneo Itsasoko laginen kasuan. Kitzipapen / igorpen uhin-luzerarako arteka-zabalerak 10 nm-takoak izan ziren eta esplorazio-abiadura 250 nm  $\text{min}^{-1}$ -takoa. Erabilitako Kitzipapen / igorpen uhin-luzerak Coble-k (1996) ezarrirakoak izan ziren: 280 nm / 350 nm (T-pikoa) proteina antzeko substantzien adierazle bezala, eta 340 nm / 440 nm (C-pikoa) eta 320 nm / 410 nm (M-pikoa) humikoen antzeko substantzien adierazle bezala. Fluoreszentzia-neurriak kinina sulfato unitatetan (KSU) bihurtu ziren 0,05 mol  $\text{l}^{-1}$  azido sulfurikoan disolbatutako kinina sulfato dihidratoarekin egindako estandar-kurbak erabiliz, Kitzipapen / igorpen uhin-luzerak 340 nm / 440 nm izanda, eta 1 KSU  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  fluoreszentzia-emisioaren baliokidea izanik. Milli-Q uraz (Merck) prestatutako zuriaren fluoreszentzia lagin guztiei kendu zien. II. Fasean konposatu fluoreszenteen kontsumoa edo ekoizpena detektatzeko, tratamenduak 24 orduz inkubatu ziren, eta disolbatutako materia organiko fluoreszentea inkubazioaren hasieran eta amaieran neurtu zen.



### *Analisisa estatistikoa*

U-Mann Whitney-ren proba ez-parametrikokoak eta Wilcoxonon proba bikoitiak erabili ziren ekosistemen eta horiekin lotutako laginen edo tratamenduen arteko desberdintasun esangarriak identifikatzeko. Erregresio lineal sinpleak egin ziren inkubazio-denboran zehar disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura lortzeko ( $p < 0,05$ ). Analisisa estatistiko hauek Windowsen IBM SPSS Statistics 20 bertsioarekin egin ziren.

## **Emaitzak**

### *1. Fasea: Disolbatutako materia organiko eraldatuaren bilketa eta karakterizazioa*

Mikrobio-komunitateen hazkuntzak harrapari-presa sistema baten bilakaera tipikoa erakutsi zuen (2.3. Irudia). Bakterio-komunitatea esponentzialki hazten hasi zen inkubazioaren lehen orduetan,  $1,45 \pm 0,28$  egun<sup>-1</sup>-eko batez besteko hazkuntza-tasarekin Kantauri Itsasoan eta  $0,55$  eta  $0,82$  egun<sup>-1</sup> bitarteko tartearekin Mediterraneo Itsasoan. Lehenengo 28 - 40 orduetan lortu zuen bere dentsitate handiena ( $4,9 \times 10^6 \pm 9,0 \times 10^5$  zel ml<sup>-1</sup> Kantauri Itsasoan eta  $1,4 \times 10^6$  eta  $1,5 \times 10^6$  zel ml<sup>-1</sup> arteko tartea Mediterraneo Itsasoan). Bakterioak dentsitate maximora heltzean, protozooen dentsitatea maximoa izan aurretik, DMO-Bakt jaso zen. Presa kopuruaren gorakadari erantzunez, protozoook esponentzialki hazten hasi ziren inkubazioko 56 - 70 ordura arte, une horretan DMO-Prot bildu zelarik. Protozoook  $1,65 \pm 0,49$  egun<sup>-1</sup>-eko hazkuntza-tasa espezifikoak aurkeztu zituzten Kantauri Itsasoan, eta  $0,72$  egun<sup>-1</sup>-ekoak Mediterraneo Itsasoan ( $0,63$ - $0,80$  egun<sup>-1</sup> bitartekoak). Era honetan,  $1,4 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$  zel ml<sup>-1</sup>ko dentsitateak atzitu zituzten Kantauri itsasoan, eta  $3,7 \times 10^3$  eta  $7,0 \times 10^3$  zel ml<sup>-1</sup> bitarteko tartea Mediterraneo Itsasoko esperimenduetan. Azkenik, DMO-Ama bi komunitatetan hazkuntzarik antzeman ez zenean jaso zen, 96 - 120 orduko inkubazioaren ondoren.

Disolbatutako materia organikoa karakterizatzeko, T-pikoaren (substantzia proteikoen adierazlea) eta C- eta M-pikoen (substantzia humikoen adierazleak)

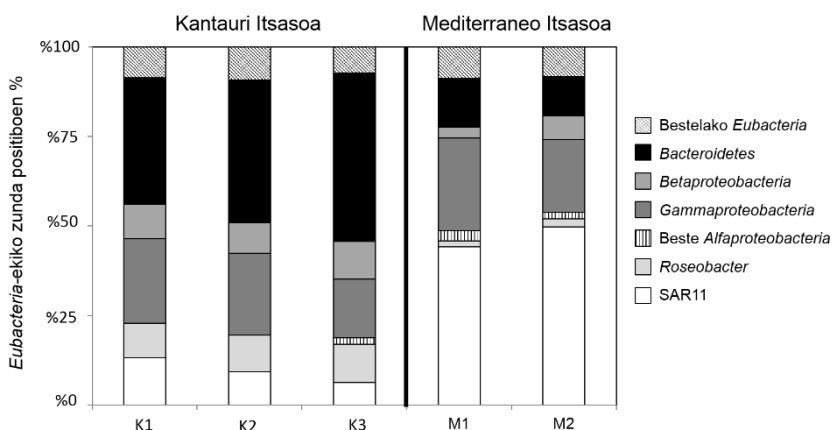
fluoreszentziak determinatu ziren. C- eta M-pikoen fluoreszentziek joera bera izan zuten eta elkarren artean desberdintasun nabarmenik detektatu ez zenez (erakutsi gabeko datuak), substantzia humikoen piko bien batuketa eginez aztertu ziren. Inkubazioa hasi baino lehen mikrokosmosetan zegoen disolbatutako materia organikoak aztertzean, Kantauri Itsasokoak Mediterraneo Itsasokoak baino substantzia humiko eta proteiko gehiago zituztela detektatu zen (2.2.A. Taula). Hala ere, bi ekosistemetan, I. Fasean protozoo bakteriboroen harraparitza gertatu ondoren bildu ziren disolbatutako materia organiko eraldatuek, hasierakoa baino substantzia humiko eta proteiko gehiago zeuzkaten (Wilcoxon proba,  $p = 0,028$  ekosistema bientzat). Konposatu humikoen kontzentrazioak gora egin zuen bakterioen hazkuntzan zehar, eta ondoren, gora egiten jarraitu zuen protozooen dentsitate maximoko unera arte. Gorakada hori askoz handiagoa izan zen Mediterraneo Itsasoko esperimentuetan: hasierako balioekin alderatuta, substantzia humikoek gora egin zuten DMO-Bakt eta DMO-Prot materia organiko eraldatuetan, %4,8ean eta %5,1ean Kantauri Itsasokoetan, eta %21,3 eta %72,1 Mediterraneo Itsasokoetan. Era berean, substantzia proteikoen kontzentrazioak (T-pikoa) ere gora egin zuen inkubazioko lehen 70 orduetan, batez ere protozooen hazkuntzan zehar (batez beste %26,2a Kantauri Itsasoan eta %24,9a Mediterraneo Itsasoan). Beraz, DMO-Prot materia organikoak DMO-Bakt-ek eta DMO-Ama-k baino substantzia humiko eta proteiko gehiago edukitzeagatik karakterizatu zen bi ekosistemetan.

**2.2 Taula.** (A) Kantauri itsasoan eta Mediterraneo itsasoan I. Faseko mikrokosmosetan detektatutako konposatu humikoak (M- eta C-pikoak) eta proteikoak (T) (kinina sulfatoaren unitateak, KSU). Laginak inkubazioaren hasieran, bakterioen dentsitate maximoan (DMO-Bakt), protozooen dentsitate maximoan (DMO-Prot) eta inkubazioaren amaieran (DMO-Ama) neurtu ziren. (B) konposatu humikoen eta proteikoen kontsumo (-) edo ekoizpen (+) erlatiboak (%), II. Faseko tratamenduetan bi itsas-sistemetan. Datuak Kantauri Itsasoko balioen batez besteko  $\pm$  desbideratze estandar gisa aurkezten dira (3 esperimentu), eta Mediterraneo Itsasorako balioen batez besteko eta tarte gisa (2 esperimentu); e. d.: ez dago daturik.

<b>A) Disolbatutako materia organiko fluoreszentearen karakterizazioa (I. Faseko mikrokosmosak)</b>								
	KANTAUARI ITSASOAN (n = 3)				MEDITERRANEO ITSASOAN (n = 2)			
	Hasiera	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama	Hasiera	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama
<b>Humikoak (KSU)</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]	e. 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>Proteikoak (KSU)</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]	e. 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>T- / (M+C)-pikoak</b>	0,52	0,57	0,62	e. d.	1,48	0,93	1,61	1,29
<b>B) Disolbatutako materia organiko fluoreszentearen kontsumoa (-) edo ekoizpena (+) (II. Faseko tratamenduak)</b>								
	KANTAUARI ITSASOAN (n = 3)				MEDITERRANEO ITSASOAN (n = 2)			
	KONTROLA	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama	KONTROLA	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama
<b><math>\Delta</math> Humikoak (%)</b>	74,3 $\pm$ 33,8 [50,4 – 98,2]	e. d.	96,3 $\pm$ 0,0 [96,3 - n.d.]	e. 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> Proteikoak (%)</b>	- 25,4 $\pm$ 8,1 [(-31,1) - (-19,6)]	e. d.	- 49,3 $\pm$ 0,0 [(-49,3) - n.d.]	e. 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]

*II. Fasea: Tratamenduak. Kantauri eta Mediterraneo Itsasoetako bakterio-komunitateen ezaugarriak*

Ez zen desberdintasun esangarririk aurkitu dentsitatean edo bakterio-talde nagusien proportzio erlatiboan komunitate naturalaren eta kontrolen artean. Iragaketa bidezko kontzentrazioaren eta ondorengo komunitatearen diluzioaren ostean, bakterioen dentsitatea  $2,4 \times 10^6 \pm 9,2 \times 10^5$  zel  $\text{ml}^{-1}$ -takoa izan zen Kantauri Itsasoan, eta  $5,4 \times 10^5$  y  $5,9 \times 10^5$  zel  $\text{ml}^{-1}$  Mediterraneo Itsasoan (berreskurapen-mailak:  $\%80,3 \pm 10,8$  eta  $\%94,8 \pm 5,4$ , hurrenez hurren). Hasierako bakterio-komunitatearen konposizioan desberdintasun esangarriak antzeman ziren bi ekosistemen artean (2.4. Irudia). Kantauri Itsasoan *Bacteroidetes* izan zen nagusi ( $\%41,0 \pm 3,3$ ), eta SAR11ren ekarpena ( $\% 9,7 \pm 2,0$ ) txikia izan zen; Mediterraneo Itsasoan, berriz, SAR11 izan zen talderik ugariena (*Eubacterioen*  $\%47,0 \pm 2,8$ ).



**2.4. Irudia.** CARD-FISH bidez neurtutako bakterio-komunitatearen konposizioa Kantauri Itsasoko (K1, K2 eta K3) eta Mediterraneo Itsasoko (M1 eta M2) II. Faseko tratamenduetan.

Bakterioen jardueri buruzko emaitzak 2.3. Taulan laburbiltzen dira. Kontroletan, bakterioen arnasketa espezifiko batez beste 4,5 aldiz txikiagoa izan zen Kantauri itsasoan Mediterraneo itsasoan baino; bakterioen ekoizpen espezifiko, berriz, batez beste 2,8 aldiz handiagoa izan zen Kantauri itsasoan. Ondorioz, karbono-eskaria espezifiko txikiagoa izan zen Kantauri Itsasoan Mediterraneo Itsasoan

baino, nahiz eta batez besteko bakterioen hazkuntza-efizientzia 10,3 aldiz handiagoa izan ekosistema honetan (%28,9 Kantauri Itsasoan eta %2,8 Mediterraneo Itsasoan). Hala ere, aztertutako lagin-kopuru txikia dela eta (3 Kantauri Itsasorako eta 2 Mediterraneo Itsasorako), ez zen desberdintasun esangarririk ikusi %95eko konfiantza-tartearekin hiru parametro hauentzako (U-Mann Whitney,  $p = 0,083$  hiruretan).

LAP izan zen bi ekosistemetan zelulaz kanpoko entzima-jarduerarik erabiliena. LAP espezifikoa 1,6 aldiz handiagoa izan zen Kantauri Itsasoan ( $181,6 \times 10^{-8} \pm 87,7$  nmol zel<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup>) Mediterraneo Itsasoan baino ( $115,3 \times 10^{-8}$  nmol zel<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup>, 106,2 nmol zel<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup>-etik 124,3 nmol zel<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup>-era doazenak). Aldiz, glukosidasa biren jarduera espezifikoen batura 1,3 aldiz txikiagoa izan zen Kantauri Itsasoan Mediterraneo Itsasoan baino. Ondorioz, hautemandako LAP:Glu proportzioa bi aldiz handiagoa izan zen Kantauri Itsasoan (20,9) Mediterraneo Itsasoan baino (10,1).

Disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioa batez beste 1,3 aldiz altuagoa izan zen Kantauri Itsasoan ( $146,7 \pm 39,0$   $\mu$ M) Mediterraneo Itsasoan baino (109,2  $\mu$ M; 100,9  $\mu$ M-tik 117,4  $\mu$ M-ra), nahiz eta desberdintasunak estatistikoki esanguratsuak ez izan (2.4. Taula).

**2.3. Taula.** Bakterioen jardueraren datuak // Faseko kontroletan eta tratamenduetan (DMO-Bakt, DMO-Prot eta DMO-Ama). Bakterioen arnasketa espezifikoa (BA sp), bakterioen ekoizpen espezifikoa (BE sp), bakterioen karbono-eskari espezifikoa (BKE sp), bakterioen hazkuntza-efizientzia (BHE), aminopeptidasa jarduera espezifikoa (LAP sp),  $\alpha$ -glukosidasa jarduera espezifikoa ( $\alpha$ -Glu sp) eta  $\beta$ -glukosidasa espezifikoa ( $\beta$ -Glu sp). Datuak Kantauri Itsasorako balioen batez besteko  $\pm$  desbideratze estandar eta tarte gisa aurkezten dira (3 esperimendu), eta Mediterraneo Itsasorako balioen batez bestekoa eta tarte gisa (2 esperimendu).\* Glu-k  $\alpha$ -glukosidasaren eta  $\beta$ -glukosidasaren balioen batuketari egiten dio erreferentzia.

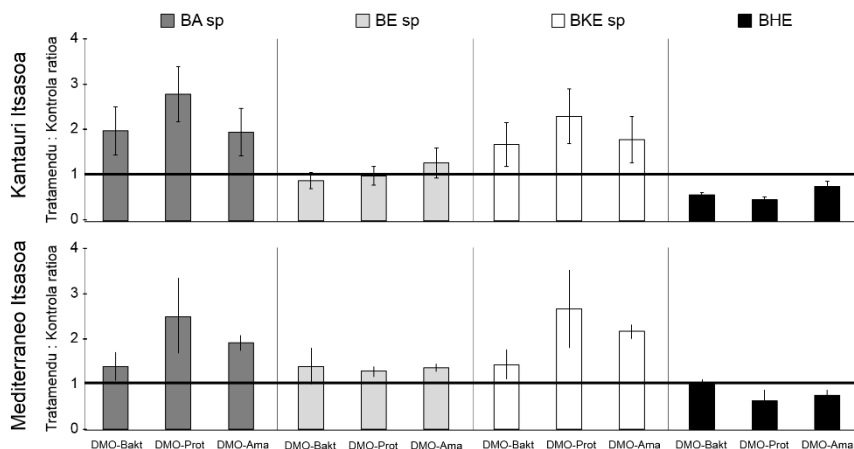
	KANTAUARI ITSASOA (n = 3)				MEDITERRANEO ITSASOA (n = 2)			
	KONTROLA	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama	KONTROLA	DMO-Bakt	DMO-Prot	DMO-Ama
<b>BA sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C zel}^{-1}$ egun $^{-1}$ )	42,1 $\pm$ 20,5 [18,9 – 57,7]	83,6 $\pm$ 69,6 [34,5 – 163,2]	121,5 $\pm$ 92,0 [41,1 – 221,8]	77,2 $\pm$ 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>BE sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C zel}^{-1}$ egun $^{-1}$ )	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>BKE sp</b> ( $\times 10^{-9}$ $\mu\text{g C zel}^{-1}$ egun $^{-1}$ )	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>BHE (%)</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 zel $^{-1}$ egun $^{-1}$ )	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 zel $^{-1}$ egun $^{-1}$ )	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 zel $^{-1}$ egun $^{-1}$ )	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

**2.4. Taula.** Disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioa ( $\mu\text{M}$ ) Kantauri Itsasoko (K1, K2, K3) eta Mediterraneo Itsasoko (M1, M2) // Faseko esperimientuen kontroletan eta tratamenduetan (DMO-Bakt, DMO-Prot eta DMO-Ama). Datuak batez besteko  $\pm$  errore estandar gisa aurkezten dira.

<b>KANTAURI ITSASOA (n=3)</b>				
	<b>KONTROLA</b>	<b>DMO-Bakt</b>	<b>DMO-Prot</b>	<b>DMO-Ama</b>
<b>K1</b>	112,6 $\pm$ 0,6	105,7 $\pm$ 0,5	103,7 $\pm$ 0,3	97,9 $\pm$ 0,5
<b>K2</b>	138,2 $\pm$ 0,3	130,3 $\pm$ 0,5	132,1 $\pm$ 0,4	132,0 $\pm$ 0,2
<b>K3</b>	135,2 $\pm$ 0,2	128,7 $\pm$ 0,4	127,1 $\pm$ 0,5	120,4 $\pm$ 0,3
<b>MEDITERRANEO ITSASOA (n=2)</b>				
	<b>KONTROLA</b>	<b>DMO-Bakt</b>	<b>DMO-Prot</b>	<b>DMO-Ama</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

*II. Fasea: Tratamenduak. Biologikoki eraldatu dagoen disolbatutako materia organikoaren eragina bakterioen jardura metabolikoan*

Tratamendu bakoitzaren eta dagokion kontrolaren arteko bakterioen arnasketaren, ekoizpenaren, karbono-eskariaren eta hazkuntza-efizientziaren batez besteko balio espezifikoaren konparaketa 2.5. Irudian erakusten dira. Antzemandako desberdintasunen analisiak, disolbatutako materia organiko eraldatuaren presentziari erantzuteko, bakterioek aldaketa metaboliko handiak jasten dituztela iradokitzen du. Bi ekosistemetan behatu ahal izan zen haien arnasketa espezifikoa nabarmenki handiagoa izan zela disolbatutako materia organiko eraldatuarekin egindako tratamenduetan kontroletan baino (Wilcoxon proba,  $p < 0,05$ , hiru tratamenduetarako). Nabarmendu behar da alderik handiena DMO-Prot zuten tratamenduetan hauteman zela (Kantauri Itsasoko eta



**2.5. Irudia.** Bakterioen arnasketa espezifikoaren (BA sp), bakterioen ekoizpen espezifikoaren (BE sp), bakterioen karbono-eskari espezifikoaren (BKE sp) eta bakterioen hazkuntza-efizientziaren (BHE) tratamendu : Kontrola ratioa disolbatutako materia organiko eraldatu desberdinetan (DMO-Bakt, DMO-Prot eta DMO-Ama). Datuak Kantauri Itsasorako batez bestekoak  $\pm$  desbideratze estandar gisa aurkezten dira (3 esperimentu), eta Mediterraneo Itsasorako balioen batez besteko eta tarte gisa (2 esperimentu) (lerro bertikalak). Lerro horizontalak tratamenduak eta dagokin kontrolak balio bera aurkezten duteneko balioa adierazten du. Lerro horizontalaren azpitik dauden zutabeek tratamenduaren balioa kontrolean baino txikiagoa izan zela adierazten dute, eta lerroaren gainetik dauden zutabeek tratamenduaren balioa kontrolean baino handiagoa izan zela adierazten dute.

Mediterraneo Itsasoko kontrolak baino 2,7 eta 2,4 aldiz handiagoa, hurrenez hurren). Bakterio-komunitate horiek, baina, ez zuten neurri berean aldatu beren ekoizpen espezifikoa: tratamenduetan lortutako balioak kontroletan lortutakoak baino apur bat handiagoak edo txikiagoak baino ez ziren izan. Eraitza bera lortu zen mantengai ez-organikoekin aberastutako DMO-Prot zuen tratamendu gehigarrian (DMO-Nut). Hiru disolbatutako materia organiko eraldatuek (DMO-Bakt, DMO-Prot eta DMO-Ama) karbono-eskari espezifiko altuagoa eta hazkuntza-efizientzia baxuagoa eragin zuten bi ekosistemetan; salbuespen bakarra Mediterraneo Itsasoko DMO-Bakt hazkuntza-efizientzia izanik. Hala ere, soilik aurkitu ziren desberdintasun esangarriak DMO-Prot tratamenduko bakterioen karbono-eskari espezifikoan (Wilcoxon proba,  $p < 0,05$ ) eta DMO-Prot eta DMO-Ama tratamenduetako bakterioen hazkuntza-efizientzian (Wilcoxon proba,  $p < 0,05$ ) kontrolarekiko estandarizatutako datuekin. Detektatutako bakterioen hazkuntza-efizientzia baxuagoak disolbatutako materia organiko



berriaren eta mikrobiologikoki eraldatuaren presentzia bakterioen arnasketa espezifikoa altuagoa izateagatik izan ziren.

Disolbatutako materia organikoen presentziak eta erabilerak bakterioen zelulaz kanpoko entzima-jardueretan ere aldaketak ekarri zituen, kostaldeko bi itsas-ekosistemetan desberdinak izan ziren arren (2.2. Taula). Bi sistemetan, LAP espezifikoaren gorakada nabarmena ikusi zen DMO-Prot-aren presentzian: %68,5eko igoera Kantauri Itsasoko kontrolekin alderatuta, eta %26koa Mediterraneo Itsasoko kontrolekin alderatuta. Hala ere, glukosidasen jarduera espezifikoaren batura %30 murriztu zen Kantauri itsasoan, eta Mediterraneo itsasoan, berriz, %20 handitu zen. Horrela, Kantauri Itsasoko uretan LAP:Glu ratioa, harraparitzaren ondorioz eraldatutako materia organiko disolbatuaren presentzian, 2,4 aldiz handitu zen; Mediterraneo Itsasoko uretan, berriz, ratio hori kontroletan ikusitakoaren oso antzekoa mantendu zen.

Nahiz eta entzima-jardueretan aldaketa horiek gertatu, bakterioak ez ziren gai izan substantzia humikoak kontsumitzeko, edo, behintzat, ez ziren kontsumitzen sortze-abiadura baino azkarrago, bi ekosistemetako kontroletan eta tratamenduetan metatu baitziren (2.2.B Taula). Substantzia proteikoei dagokienez, Mediterraneo Itsasoan DMO-Prot eta DMO-Ama tratamenduetan metatu ziren bitartean, Kantauri Itsasoko bakterio-komunitateak gai izan ziren substantzia horiek eraginkortasunez kontsumitzeko: kontrolean eta DMO-Prot tratamenduetan zeuden substantzia proteikoen %25,4 eta %49,3 kontsumitu ziren inkubazioko 24 orduetan zehar.

Bi ekosistemetan, DMO-Bakt zeukaten tratamenduetan disolbatutako karbono organikoaren edukia kontroletan baino baxuagoa izan zen; batez beste %5,5 baxuagoa Kantauri Itsasoan eta %5,9 baxuagoa Mediterraneo Itsasoan (2.4. Taula). Disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioak antzekoak izan ziren DMO-Bakt eta DMO-Prot zeukaten tratamenduetan; DMO-Ama zeukaten tratamenduetan, berriz, beherakada arina ikusi zen bi ekosistemetan DMO-Prot-

arekiko (%4,2 eta %9,9 Kantauri Itsasoan eta Mediterraneo Itsasoan, hurrenez hurren).

## **Eztabaida**

Lortutako emaitzek argi eta garbi erakusten dute bi itsas ekosistemetan mikroorganismoen jarduerak (bakterioen hazkuntzak, baina batez ere ondorengo protozoa bakteriboroen hazkuntzak eta harraparitzak) aldaketak eragiten dituztela itsasoko disolbatutako materia organikoaren osaeran, eta horrek, aldi berean, aldaketa metaboliko garrantzitsuak eragiten dituela bakterio-komunitateetan. Mikrobiologikoki eraldatutako itsasoko materia organikoa eta, bereziki, protozoen harraparitzaren ondorioz eraldatutako materia organikoa (DMO-Prot) erabiltzeak bakterioen karbono-eskari espezifikoa %200ean baino gehiago handitzea dakar, bai eta hazkuntza-efizientzia %56an eta %46an murriztea ere Kantauri Itsasoko eta Mediterraneo Itsasoko bakterio-komunitateentzat, hurrenez hurren. Bakterioen hazkuntza-efizientziaren murrizketa horiek ez ziren ekoizpenaren jaitsieraren ondorio izan, antzekoak mantendu baitziren, baizik eta arnasketa askoz altuagoen ondorio, karbono-kontsumoaren igoera azaltzen dutenak. Tratamenduetan disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioa kontrolatzea baino pixka bat baxuagoa izan zen, ziur asko esperimenteren /*i*. Fasean zehar kontsumitu zelako, mikroorganismoen biomasan eta CO<sub>2</sub>-an transformatzeko. Alabaina, ez zen harreman argirik aurkitu disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioaren alde txiki horien eta bi ekosistemetan bakterioen hazkuntza-efizientzian detektatutako aldaketen artean. Ildo horretan, Mediterraneo Itsasoan DMO-Bakt tratamenduen eta kontrolaren artean disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioan behatutako diferentziak ez ziren lotuta egon bakterioen hazkuntza-efizientzian detektatutako desberdintasunekin. DMO-Prot zeukaten tratamenduen hazkuntza-efizientzia esangarriki baxuagoa izan zen DMO-Bakt zeukaten tratamenduetan baino, nahiz eta disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioan diferentziarik ez aurkitu. Kantauri Itsasoan egindako esperimenteretan ere ez zen inolako loturarik aurkitu. Beraz, bakterioen

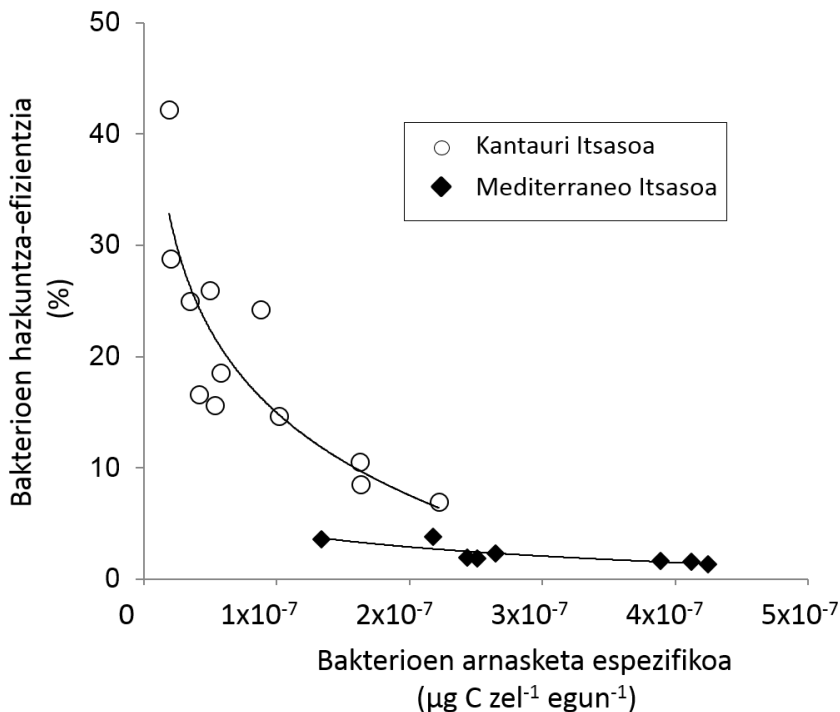
metabolismoan behatutako efektuak batez ere materia organikoaren kalitateari egotz dakizkiokeela, eta ez gehitutako kantitateari, iradokitzen da lan honetan. Bestalde, disolbatutako materia organiko eraldatuak eragindako aldaketa metabolikoak maskara zitzakeen edozein mantenugai-muga frogatu zen, DMO-Prot zuen tratamendu gehigarri batean mantenugai ez-organikoak gehituz; kasu honetan ez zen desberdintasun esangarririk aurkitu bakterioen arnasketan, ekoizpenean edo hazkuntza-efizientzian, mantenugai gehigarririk ez zeukan tratamenduarekin konparatuz (erakutsi gabeko datuak).

Bi sistemetako erantzun metabolikoen antzekotasun handia aipagarria izan zen, Kantauri Itsasoko eta Mediterraneo Itsasoko kontroletako bakterio-komunitateak erabat desberdinak baitziren, bai konposaketari dagokionez, bai jarduera metabolikoari dagokionez. Kantauri Itsasoko bakterio-komunitatea pixka bat ugariagoa izan zen, *Bacteroidetes* taldeak menperatua eta karbonoaren prozesamenduan hamar aldiz eraginkorragoa (bakterioen hazkuntza-efizientzia handiagoa) Mediterraneo Itsasoko komunitatea baino. Aldiz, Mediterraneo Itsasoko bakterio komunitateko %50a baino gehiago SAR11-k osatzen zuen, hiru aldiz karbono gehiago kontsumitu zuen, ia hiru aldiz karbono gutxiago ekoitzi zuen eta Kantauri Itsasoko bakterioek baino lau aldiz eta erdi karbono gehiago arnastu zuen. Alde horien guztien ondorioz, batez besteko hazkuntza-efizientzia %28,9koa izan zen Kantauri Itsasoan, Mediterraneo Itsasoko bakterio-komunitatearentzat lortutako batez besteko hazkuntza-efizientzia baino hamar aldiz handiagoa (%2,8koa). Cottrell-ek eta Kirchman-ek (2003) bakterio-talde ezberdinen arteko zelula aktiboen portzentaian (leuzina eta timidina gehitzean) funtsezko aldaketak aurkitu zituzten Delawareko estuarioan gazitasun-gradiente batean zehar, non *Alfaproteobacteria*-k *Bacteroidetes*-ek baino hiru aldiz <sup>3</sup>H-leuzina gehiago asimilatu zituzten. Hala ere, <sup>3</sup>H-leuzinaren asimilazioa Kantauri Itsasoan Mediterraneo Itsasoan baino 3 aldiz handiagoa izan zen. Honek bi ekosistema horien artean karbonoaren prozesamenduan eta bakterioen hazkuntza-efizientzian alde zorrotzagoak egon ditzaketela iradokitzen du, urtean zehar bai Kantauri Itsasoan (**3. Kapitulua**), bai Mediterraneo Itsasoan (Schauer *et al.*, 2003;

Alonso-Sáez *et al.*, 2007a) bakterio-talde nagusien konposizioan eta dentsitate erlatiboan gertatzen diren aldaketak direla eta.

Ikerketa honetan erabilitako prozedura esperimentalari esker, bakterio-komunitate jakin batek disolbatutako materia organiko mota desberdinen aurrean aurkeztutako erantzun metabolikoak behatu ahal izan dira denbora laburrean (6 ordu baino gutxiagoan). Bi ekosistemetako bakterio-komunitateen konposizioan eta funtzioan desberdintasun handiak zituen arren, biek antzeko aldaketa metabolikoak izan zituzten bakterioen hazkuntzak eta ondorengo protozooen hazkuntzak eta harraparitza bakteriboroak eraldatu zuten disolbatutako materia organikoarekin kontaktuan jarri ondoren. Kasu guztietan, erantzunik deigarriena protozooen harraparitzan zehar eta ondoren jasotako disolbatutako materia organikoak sortutakoa izan zen. Aldaketa nabarmenena bakterioen arnasketa espezifikoaren gorakada izan zen, aldi berean bakterioen hazkuntza-efizientziari eragin ziona. Izan ere, erlazio semilogaritmiko negatiboa ikusi zen bi aldagai horien artean (2.6. Irudia), bai Kantauri Itsasoan (Efizientzia =  $-10,71 \ln(\text{Arnasketa}) - 157,61$ ;  $r^2 = 0,80$ ,  $p < 0,001$ ), bai Mediterraneo Itsasoan (Efizientzia =  $-2,01 \ln(\text{Arnasketa}) - 28,07$ ;  $r^2 = 0,75$ ,  $p = 0,006$ ). Erlazio horiek bakterioen arnasketa espezifikoaren gorakadak bi bakterio-komunitateetan hazkuntza-efizientziaren murrizketaren %70a azalduko lukeela adierazten dute. Hala ere, kurbaren malda eta bakterioen arnasketa espezifikoaren balio-tartea oso desberdinak izan ziren bi itsas sistemetan. Bakterioen hazkuntza-efizientziak baliabideen optimizazio-maila adierazten duela onartuz gero, emaitza horiek adieraziko lukete Kantauri Itsasoko komunitatea, zeinetan bakterioen talderik ugariena *Bacteroidetes* den, hobeto prestatuta egongo litzatekeela arnasketan bariazioak eragin dezaketen aldaketei aurre egiteko; egokitzapen horiek hazkuntza-efizientziaren balio aldakorretan islatuko liriteke. Alabaina, Mediterraneo Itsasoko bakterio-komunitateak, SAR11 nagusia izanik, arnasketa espezifiko oso aldakorrek izan zituen, hazkuntza-efizientzia baxu eta nahiko homogeneoei zegozkienak. Emaitza horiek bat datoz bakterioen hazkuntza-efizientzia sistema eutrofikoenetan handiagoa izateko joera ezagunarekin

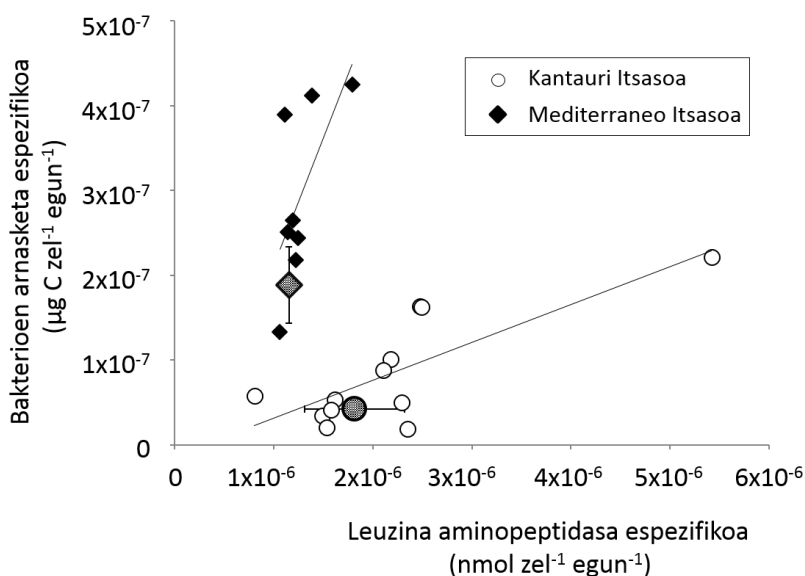
(Giorgio & Cole, 1998), normalean ingurune horietako komunitatearen konposizioan *Bacteroidetes*-en ekarpena handiagoa izaten delarik (Rappé *et al.*, 2002; Lefort & Gasol, 2013).



**2.6. Irudia.** Bakterioen arnasketa espezifikoaren (BA sp) eta hazkuntza-efizientziaren (BHE) arteko erlazioa Kantauri Itsasoko (BHE =  $-10,71 \ln(\text{BA sp}) - 157,61$ ;  $r^2 = 0,80$ ,  $p < 0,001$ ) eta Mediterraneo Itsasoko (BHE =  $2,01 \ln(\text{BA sp}) - 28,07$  ( $r^2 = 0,75$ ,  $p = 0,006$ )). Faseko tratamenduetan.

Gainera, kontuan hartu behar da ikerketa honetan bakterioen ekoizpena <sup>3</sup>H-leuzinaren barneraketaren bidez neurtu dela. Bakterioen ekoizpenak hazkuntza-efizientziaren balioen aldakortasunean daukan ekarpena txikia dela kontuan hartuta ere, *Bacteroidetes* eta SAR11 taldeen artean <sup>3</sup>H-leuzina barneratzeko gaitasunean aurkitu diren ezberdintasunek (Cottrell & Kirchman, 2003), ikerketa honetan Kantauri Itsasoko eta Mediterraneo Itsasoko bakterio-komunitateen hazkuntza-efizientzietan aurkitutako ezberdintasunak areagotzen lagun lezakete. Gure emaitzek erakutsi zuten, halaber, bi komunitatetan zelulaz kanpoko entzima-jarduera espezifiko handiagoa zela disolbatutako materia organiko

erlaturaren presentzian, konfinamenduan hau entzimen ekoizpen-tasa handiagoekin erlazionatzen dena. Entzimen sintesia garestia da bakterioentzat (Middelboe & Søndergaard, 1993; Sinsabaugh *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 2007), eta bakterioen arnasketa-tasa espezifiko handiek islatzen duten energia-ekarpena eskatzen du (Giorgio & Cole, 1998; Baltar *et al.*, 2009). Izan ere, zelulaz kanpoko entzima nagusiaren (LAP) jardura espezifiko eta bi ekosistemetako bakterio-komunitateen arnasketa espezifikoaren artean erlazio positiboa aurkitu da (2.7 irudia), baina berriro ere alde nabarmenekin kostaldeko bi ekosistemen artean: malda 6 aldiz txikiagoa izan zen Kantauri itsasoko komunitatean Mediterraneo itsasoko komunitatean baino, eta gainera, balioen tartea oso desberdinak izan ziren bi ekosistemetan.



**2.7. Irudia.** Leuzina aminopeptidasa espezifikoaren (LAP) eta bakterioen arnasketa espezifikoaren (RB) arteko erlazioa // Faseko tratamenduetan (RB = 0,044LAP - 2 x 10<sup>-8</sup>, r<sup>2</sup> = 0,564, Kantauri itsasoan eta RB = 0,265LAP - 8 x 10<sup>-8</sup>, r<sup>2</sup> = 0,383, Mediterraneo itsasoko uretan). Punturik handienek eta itzalezatuek kontrolen batez besteko balioak eta desbideratze estandarrak adierazten dituzte Kantauri itsasoan (biribila) eta Mediterraneo itsasoan (diamantea).

*Bacteroidetes* nagusi den Kantauri itsasoko bakterio-komunitatean aurkitutako LAP espezifikoaren balio-tarte zabalak eta malda baxuek bakterio horiek ingurune aldakor batera ondo egokitzen direla adierazten dute. Mediterraneo itsasoko komunitatearekin alderatuz, aurkitutako malda altuak (bakterioen arnasketa

espezifikoa aldaketa handiak LAP jarduera espezifikoaren aldaketa txiki bakoitzeko), SAR11 nagusia den komunitate honetan, substratu polimerikoaren kantitate jakin bat hidrolizatzeko kostu metabolikoa oso handia dela iradokitzen du, hazkuntza-efizientzia baxuetan islatzen dena. Middelboe-k eta Søndergaard-ek (1993) iradoki zuten zelulaz kanpoko entzima-jarduerari lotutako energia-eskariak karbonoaren erabileraren eraginkortasuna murriztea dakarrela. Zelulaz kanpoko entzima-jardueren aldaketak zelula-ordeztea bezain azkar gertatzen diren heinean (Findlay & Sinsabaugh, 2003), horien eragina berehala isla daiteke bakterioen hazkuntza-efizientzian.

Beraz, entzima hidrolitikoak sintetizatzeko beharra faktore garrantzitsua izan daiteke bi bakterio-komunitateetan hautemandako energia-eskaera handia azaltzeko. Itsas ekosistemaren baldintza fisiko-kimikoez gain, zelulaz kanpoko entzimen profil jakin baten adierazpenean eragiten duten faktore nagusiak bi dira: i) bakterio-komunitatearen konposizioa, potentzial genetikoa edo komunitatearen gaitasuna zehazten baitu, eta ii) materia organikoaren osaera entzima hidrolitikoaren adierazpenaren edo sintesiaren erregulatzaile gisa (Chróst & Siuda, 2002; Hoppe *et al.*, 2002). Komunitatearen konposizioari dagokionez, Kantauri itsasoko bakterioek LAP jardueraren adierazpen handiagoarekin lotutako energia-kostu baxuagoa (ikus kontrolen balioak 2.7 irudian) lotuta egon liteke udan *Bacteroidetes*-ek ekosistema honetan duten nagusitasunarekin. *Bacteroidetes* pisu molekular handiko materia organikoaren erabileran bakterio espezializatzen hartzen dira (Cottrell & Kirchman, 2000; Elifantz *et al.*, 2005), proteina eta polipeptido kopuru esanguratsua duena (Coffin, 1989; Rosenstock & Simon, 1993; Kroer *et al.*, 1994; Keil & Kirchman, 1999). Horrela, Kantauri Itsasoko komunitatea epe laburrean prest egongo litzateke bakterioen hazkuntzaren eta protozoo bakteriboroen bidezko harraparitzaren ondorioz transformatutako materia organikoa prozesatzeko.

Aldiz, Mediterraneo Itsasoko kostaldeko bakterio-komunitatearen konposizioa udan nabarmenki desberdina izan zen: *Bacteroidetes*-en presentzia urria izan zen (batez beste %11 inguru), eta bakterio nagusiak SAR11 taldekoak izan ziren (batez

beste %47). SAR11 taldeko bakterioek glukosa bezalako pisu molekular txikiko konposatuak nahiago dituzte (Alonso & Pernthaler, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2012) edo aminoazido libre disolbatuak eta dimetilsulfoniopropionatoa (DMSP) (Malmstrom *et al.*, 2004). Mediterraneo Itsasoko bakterioen konposizio hau bat dator LAP jardueraren adierazpenari lotutako energia-kostu handiagoein. Bi komunitateetan entzima-jardueraren profiletan dagoen beste desberdintasun bat jarduera aminopeptidasaren eta glukosidasen batuketaren ( $\alpha$ -glukosidasa +  $\beta$ -glukosidasa) arteko ratioa da, Kantauri itsasoan (20,9) Mediterraneo itsasoan (10,1) baino bi aldiz handiagoa izan zena. Jakina da bakterio talde desberdinek entzima-jarduera hidrolitikoaren maila desberdinak adieraz ditzaketela (Martínez *et al.*, 1996; Pinhassi *et al.*, 1999). Horrela, ratio ezberdin hauek komunitatearen osaeraren menpe egon daitezke, eta disolbatutako materia organiko eraldatuen presentzian daudenean era desberdinean aldatuko dira. Kantauri Itsasoan ratioak gora egin zuen bitartean (1,4-2,9 aldiz), Mediterraneo itsasoan egonkor mantendu zen.

Materia organikoaren osaera ere eragin handia du bakterio-komunitate baten zelulaz kanpoko entzima-adierazpenean (Chróst & Siuda, 2006), konposatu organikoaren geroko xurgapenean (Apple & del Giorgio, 2007) eta dagokion energia-kostuan. Ikerketa honetan, disolbatutako materia organikoaren karakterizazioa frakzio fluoreszentearen konposatu humiko eta proteikoaren kuantifikazioan oinarritu zen, kostaldeko ekosistemetan disolbatutako karbono organikoaren %70a suposa daikeena (Chen & Bada, 1992; Chen *et al.*, 2002; Kowalczyk *et al.*, 2010). I. Fasean garatutako mikrokosmosetan materia organikoaren hasierako osaera desberdina izan zen arren, bere bilakaera antzekoa izan zen bi ekosistemetan. Kantauri Itsasoko urak apur bat aberatsagoak izan ziren konposatu hezeetan eta zertxobait urriagoak konposatu proteikoetan (0,52ko proteikoak/humikoak ratioa) Mediterraneo itsasokoak baino (1,48 ratioa). Hala ere, bakterioen hazkuntza eta protozoo bakteriboroen bidezko harraparitzan, bi ekosistemetan konposatu humiko eta proteikoaren metaketa progresiboa hauteman zen, baina Mediterraneo Itsasoan neurri handiagoan.



Bakterioek konposatu humiko asko aska ditzakete, bai esponentzialki hazten direnean, bai fase egonkor eta senteszentean daudenean (Romera-Castillo *et al.* 2011). Konposatu proteikoen kasuan, bakterioen hazkuntza esponentzialaren fasean haien kontzentrazioak gora egiten duela dokumentatu da, eta behera egiten duela bakterioen populazioak hazkuntza egonkorraren fasera iritsi ondoren (Kawasaki & Benner, 2006; Romera-Castillo *et al.*, 2011). Beraz, konposatu humikoen eta proteikoen metaketa protozoek gauzatutako irazpen prozesuetatik etorriko litzateke nagusiki. Aurrez aipatutako azterketetan oinarrituta, Kantauri Itsasoko mikrokosmosen kasuan, konposatu humikoen eta proteikoen areagotze handiagoak espero genituen Mediterraneo itsasoko mikrokosmosekin alderatuta. Izan ere, Kantauri itsasoan bakterioak eta protozoak azkarrago hazi ziren, dentsitate handiagoak lortu zituzten, eta protozoo ratioa, harraparitza presio indikatzaile gisa erabiltzen dena, ere handiagoa izan zen ( $4,4 \times 10^{-3}$  vs.  $1,8 \times 10^{-3}$ ) Mediterraneo Itsasoan baino. Kontuan hartu behar da metaketa askapenaren eta kontsumoaren arteko desorekaren emaitza dela; izan ere, etengabe askatzen ari den materia organikoaren zati bat etengabe kontsumitzen du bakterioen komunitateak. Alde horretatik, bi komunitateak disolbatutako materia organiko eraldatuen presentzian egon zirenean, Kantauri Itsasoko komunitatea gai izan zen disolbatutako materia organiko fluoreszentearen frakzio proteikoa kontsumitzeko, bai kontroletan, bai DMO-Prot bidezko tratamenduetan; Mediterraneo Itsasoko komunitatearen kasuan, berriz, konposatu organikoen metaketa baino ez zen ikusi, aurreko iradokizuna berresten duena. Bakterio-taldeek karbonoa erabiltzeko hainbat estrategia dituztenez (adibidez, Alonso Sáez & Gasol, 2007), bakterio-komunitatearen konposizioa funtsezko faktorea da disolbatutako materia organiko erregogorraren ekoizpena eta dinamika erregulatzeko.

Laburbilduz, ikerketa honek erakusten du bakterioen hazkuntzak, baina bereziki protozooen ondorengo hazkuntzak eta harraparitzak, alterazioak eragiten dituela itsasoko disolbatutako materia organikoan, zeinak aldaketa metaboliko garrantzitsuak eragiten dituen bakterioen komunitatean. Epe laburrean, erantzun

metaboliko hori honako honetan datza: kostu energetikoa dakarren zelulaz kanpoko entzima-jarduera handitzen da, bakterio-ekoizpenarekin zerikusirik ez duen karbono-kontsumoa handituz eta, ondorioz, bakterioen hazkuntza-efizientzia nabarmenki murriztuz. Badirudi prozesu horien abiadura eta hedapena bakterio-komunitatearen konposizioaren arabekoak direla.

### 3. KAPITULUA:

Bakterioen hazkuntza-efizientziaren erabilpena ingurumen aldaketen aurrean duten egokitzapen mailaren isla gisa.

Argitaralpena:

Baña, Z., Abad, N., Uranga, A., Azúa, I., Artolozaga, I., Unanue, M., Iriberrri, 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.





## Laburpena

Ekialdeko Kantauri Itsasoko kostaldeko ingurumen aldaketen aurrean mikroorganismoek duten erantzuna aztertu zen, lau urtetan zehar bakterioen metabolismoarekin eta komunitatearen konposaketarekin batera aldagai multzo zabal bat neurtuz. Bi egoera egonkorrez osatutako urtaroko ziklo errepikakorra antzeman zen, bata bakterioen metabolismo-jarduera baxuagatik bereizgarria (neguan), urritik martxora, eta bestea metabolismo-jarduera altuagatik (udan), maiatzetik abuztura. Bi kontraste egoera horiek trantsizioaldi laburren bidez lotuta daude apirilean eta irailean. *Alfaproteobacteria* eta *Bacteroidetes* talde filogenetikoak nagusi izan ziren neguan eta udan, hurrenez hurren, eta horien alternantzia batez ere apirilako trantsizioaren aurreko fitoplankton eukariotoaren loraketak eta iraileko trantsizioaren aurreko fitoplankton prokariotoaren loraketak bultzatu zuten. Bakterioen hazkuntza-efizientzia altu eta egonkor mantendu zen neguan eta udan, baina bi trantsizio-aldietan zorrozki jaitsi zen. Lortutako emaitzen arabera, bakterioen hazkuntza-efizientzia oso propietate elastikotzat hartu beharke litzateke, zeinek urteroko zikloan zehar kostaldeko ekosistema honetan gertatzen diren ingurumen aldaketen aurrean bakterio-komunitatearen konposizioak jasaten duen egokitzapen etapa desberdinak islatzen duen.

## Sarrera

Bakterioen hazkuntza-efizientziak biomasaren ekoizpenerako desbideratzen duten kontsumituko karbonoaren frakzioa adierazten du. Ezaugarri fisiologiko hori funtzionalki garrantzitsua da, bakterio-komunitatearen metabolismoari zuzenean dagokiolako. Gainera, bakterioen hazkuntza-efizientziak informazio esanguratsua ematen du bakterioplanktonak ur-sistemen dinamika biogeokimikoan duen eraginari buruz: bakterioek hustubide gisa jardun dezakete disolbatutako materia organikoa mineralizatzen dutenean, edo bitartekari gisa sare trofikoaren barruan, sisteman dagoen disolbatutako materia organikoaren zati bat goiko maila trofikoetara transferitzen dutenean (Sherr & Sherr, 1996; del Giorgio & Cole, 1998; Carlson *et al.*, 2007). Aldagai horren garrantzia agerian geratzen da bakterioen hazkuntza-efizientziaren eta faktore fisikoen, kimikoen eta biologikoen arteko erlazioan zentratzen diren ikerlanetan, hala nola temperatura (Rivkin & Legendre, 2001; Apple *et al.*, 2006), irradiazioa (Cottrell *et al.*, 2008; Hörtnagl *et al.*, 2011), mantenu gaien eskuragarritasuna (Biddanda *et al.*, 2001; Lemée *et al.*, 2002; Pradeep Ram *et al.*, 2003), disolbatutako materia organikoaren kontzentrazioa eta kalitatea (Eiler *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2005; Apple & del Giorgio, 2007; Lee *et al.* 2009), bakterio-komunitatearen egitura eta konposizioa (Comte & del Giorgio, 2011; Warkentin *et al.*, 2011) edo bakterioen hilkortasun-tasa harrapakaritzaren eta / edo birusek eragindako lisiaren ondorioz (Middelboe *et al.*, 1996; **2. Kapitulu**).

Hala ere, lortutako emaitzak askotan kontraesankorrak izan dira bakterioen hazkuntza-efizientzia zein faktorek kontrolatzen duten eta kontrol hori nola gertatzen den zehazteko orduan. Emaitza desberdin horiek, estrategia esperimentalean egon daitezkeen alde nabarmenak direla eta izan daitezke. Faktore bakar batek bakterioen hazkuntza-efizientzian duen eragina mikro- edo mesokosmosetan egindako manipulazio esperimentalen bidez determinatu dira askotan (Giorgio & Cole, 1998 eta aipatutako erreferentziak; Eiler *et al.*, 2003; Eichinger *et al.*, 2010), zeintzuek bakterio-komunitatearen ezaugarri garrantzitsuen aldaketa artifizialak (egitura, konposizioa edo metabolismoa)

azken ondorioak desbideratu ditzaketen (Bier *et al.*, 2015). Bestalde, bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasun naturala aztertzean, ikerketa gehienek aldakortasun espazialari heltzen diote, denbora-sekuentziaren analisia gutxiago aztertuta dagoen bitartean (Lemee *et al.* 2002; Reinthaler & Herndl, 2005; Eichinger *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Bonilla-Fidji *et al.* 2010). Azkenik, bakterioen hazkuntza-efizientziaren neurketa biomasaren ekoizpenean eta arnasketan oinarritzen da, zeinen neurketek aldakortasun handia eta eztabaidagarria aurkezten duten konbertsio-faktoreak behar dituzten (del Giorgio & Cole, 2000; Sherry *et al.*, 2002; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b; del Giorgio *et al.*, 2011), **1. Kapitulu**an azaltzen den moduan. Gainera, bakterioen arnasketa metodo tradizionalekin neurtzeko inkubazio luzeak erabili behar dira, sarritan 48 ordutik gorakoak, eta honek desbiderapen gehigarria eragin ditzake bakterio-komunitateak denbora horretan pairatzen dituen aldaketan ondorioz (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002).

Bakterio-komunitatea osatzen duten kideen metabolismo-jarduera desberdina denez (Alonso-Sáez & Gasol, 2007), urtaroko zikloan zehar komunitate horrek izan dezaken konposizio-aldaketak garrantzitsuak izan daitezke sisteman ematen diren aldaketa metabolikoak azaltzeko. Izan ere, bakterio-komunitateko talde filogenetiko nagusien artean konposizioaren eta funtzioaren arteko loturak antzeman dira (Findlay *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2006; Langenheder *et al.*, 2006; Comte & del Giorgio, 2009). Hala ere, Comte & del Giorgio (2010) bakterio-konposizioaren eta komunitatearen funtzioaren arteko lotura espazioan eta denboran une jakin batzuetan eta ingurumen-baldintza jakin batzuetan soilik antzeman daitezkeela iradoki zuten. Bakterioek duten plastikotasun metaboliko handiari esker (Meyer *et al.*, 2004; Mou *et al.*, 2008), bakterioen metabolismoa ingurumen-aldaketa txikitara egokitu daiteke, komunitate mailaren konposizioan edo funtzioan aldaketa esanguratsurik sortu gabe. Hala ere, bakterio-komunitatearen konposizioan aldaketak espero daitezke, baldin eta ingurumen faktoreak edo aldaketaren abiarazleak komunitateko kideek duten aldatzeko gaitasuna baino gehiago aldatzen badira. Hau gertatzekotan,

komunitateko konposizioaren eta funtzioaren arteko bategite estuagoa gertatuko litzateke (Comte & del Giorgio, 2010 eta 2011). Ildo horretan, Bizkaiko Golkoak urtaroko ziklo oso markatua aurkezten du, urtean zehar gertatzen den gainazal-uraren estratifikazioak eta ur-nahasketak eraginda batez ere (Serret *et al.*, 1999). Estratifikazioa martxo-apirila inguruan hasten da, gainazal-uren beroketarekin batera, iraila-urriak arte luzatzen den udako piknoklina egonkor batean amaitzen dena, gainazal-tenperatura jaisten denean eta ur sakonagoekin nahasketa gertatzen denean (Serret *et al.*, 1999). Beraz, aztertutako itsas-sisteman, arrazoizkoa da urtean zehar bakterio-komunitatearen konposizioan aldaketa garrantzitsuak espero izatea ingurumen-asaldura zikliko horiei erantzuteko.

Ikerketa honen helburua bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasuna detektatzea eta eragin diezaioketen faktoreak identifikatzea izan zen. Helburu orokor hori betetzeko, lau urtez ekialdeko Kantauri Itsasoko kostaldeko bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasuna, metabolismoa, konposizioa eta ingurumen-aldagai multzoa aztertu ziren. Honen bitartez posiblea izan zen bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasuna komunitatearen konposizioan gertatzen ziren aldaketei lotuta ote zeuden antzematea, eta beraz, bakterioen komunitateak bere ingurumenarekiko zuen egokitzapen-mailaren isla zenentz detektatzea. Laginak ontziratuta edukitzeak dakarren akatsak saihestearren eta bakterioen hazkuntza-efizientziaren estimazio fidagarriak lortzeko asmoz, bakterioen hazkuntza-efizientzia estimatzeko bai bakterioen ekoizpena zein bakterioen arnasketa 6 orduetik beherako inkubazio laburrak erabiliz neurtu ziren.

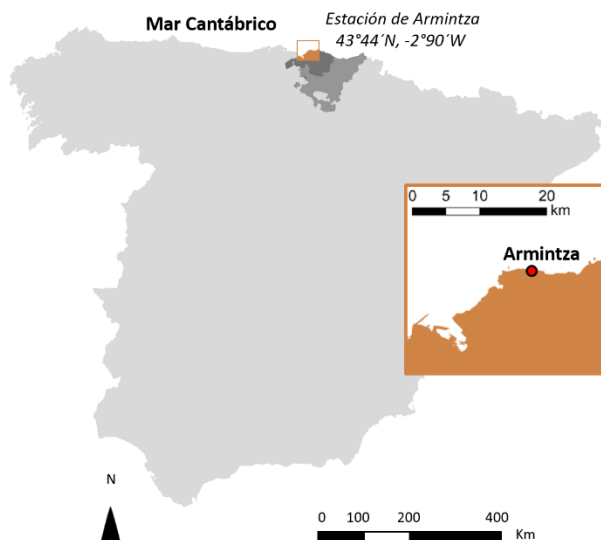
## **Materialak eta metodoak**

### *Laginketa estrategia*

Itsasoko gainazal-ura (0,5 m) Armintzako laginketa-puntuan bildu zen (43°44'N, 2°90'W), ekialdeko Kantauri Itsasoko kostaldean kokatuta dagoena (3.1. Irudia). Guztira 31 lagin bildu ziren 2008ko martxotik 2012ko abendura arte. Itsasoko ur-laginak 100 µm-tako nylon sare batetik zehar aurreiragazi ziren mikro- eta mesozooplanktona kentzeko, eta izotzean eta iluntasunean laborategira garraiatu



ziren 2 h pasa baino lehen. Temperatura eta gazitasuna *in situ* neurtu ziren eroankortasuna neurtzeko aparatua erabiliz (EC300 VWR).



**3.1 Irudia.** Laginketa-estazioaren kokapena Armintzan (Bizkaia).

### *Mikroorganismoen dentsitatea*

*Synechococcus* eta *Prochlorococcus* itsas-zianobakterioen dentsitateak fluxu-zitometriaren bitartez neurtu ziren (Marie *et al.*, 1999). Fixatu gabeko laginak abiadura handian prozesatu ziren ( $100 \mu\text{l min}^{-1}$  gutxi gorabehera) 488 nm-tara igortzen duen laser urdinarekin hornitutako FACScalibur Becton-Dickinson fluxu-zitometro baten bidez. Lateraliki sakabanatutako argi-intentsitatearen eta laranja (BP 585/42 nm-tako iragazkia; fikoeritina duten zelulen adierazlea) eta gorrian (LP 670 nm-tako iragazkia; klorofila duten zelulen adierazlea) emititutako fluoreszentiaren arabera populazio desberdinak bereiztu ziren.

Bakterioen, nanoflagelatu heterotrofikoen eta birusen dentsitateak Nikon Optiphot epifluoreszentzia-mikroskopiaren bitartez zenbatu ziren (Porter & Feig, 1980; Noble & Fuhrman, 1998). Bakterioen eta birusen kasuan laginak kaltzio-karbonatoarekin tanponatutako formalinarekin fixatu ziren eta tetraborato sodikoarekin tanponatutako formalinarekin nanoflagelatuaren kasuan (azkeneko

kontzentrazioa %2 b/b). Laginak 4°C-tan iluntasunean biltegitatu ziren analizatu arte, beti hurrengo 24 h igaro baino lehen. Zenbaketak egiteko, bolumen ezaguneko azpilaginak hartu ziren (1 ml bakterioak zenbatzeko eta 4 ml nanoflagelatuak zenbatzeko), DAPIrekin (4'6'-diamidino-2-phenylindole) (azkeneko kontzentrazioa 2 µg ml<sup>-1</sup>) 10 minutuz tindatu ziren, eta 0,22 µm eta 0,8 µm poro tamainako (Whatman) polikarbonatozko iragazki beltzen bidez iragazi ziren, bakterioak eta nanoflagelatuak zenbatzeko, hurrenez hurren. Partikula birikoak zenbatzeko, 1 ml-tako azpilaginak Acrodisc iragazkien bidez iragazi ziren, 0,02 µm poro tamainakoak (Whatman), eta SYBR Green I-ren %0,2ko tanta batean jarri ziren, 15 minutuz tindatu ostean 0,02 µm-tatik iragazitako ur-distilatuarekin ikuzi ziren. Iragazki guztiak beirazko portetan muntatu ziren, epifluoreszentzia mikroskopioaren azpian jarri ziren eta iragazki bidez ausaz hautatutako eremu mikroskopikoak ezarri ziren hiru mikroorganismo-komunitateen zenbaketetarako. Gutxienez 20 eremu zenbatu ziren bakterio eta birusen dentsitatea kalkulatzeko, eta gutxienez 100 eremu nanoflagelatuaren dentsitatea kalkulatzeko.

#### *Bakterioen komunitatearen konposizioa*

Bakterio-komunitatearen konposizioa CARD-FISH teknikaren bidez determinatu zen Pernthaler-ek *et al.* (2002) deskribatutako teknikaren bitartez. Talde espezifikoak detektatzeko diseinatuta zeuden HRP-arekin (peroxidase horseradish) markatutako oligonukleotidoetako zundak erabili ziren: *Bacteria* domeinua (EUB I-ren (Amann *et al.*, 1990) eta EUB II-III-ren (Daims *et al.*, 1999) arteko nahasketa) eta bere lau talde filogenetikorik garrantzitsuenak detektatzeko: ALF968 (Neef, 1997) *Alfaproteobacteria*-entzako; BET42a (Manz *et al.*, 1992) *Betaproteobacteria*-entzako; GAM42a (Manz *et al.*, 1992) *Gammaproteobacteria*-entzako; eta CF319a (Manz *et al.*, 1996) *Bacteroidetes*-entzako. *Eubacteria*-entzako kontrako zentzuzko NON338 zunda (Wallner *et al.*, 1993) kontrol negatibo bezala erabili zen. Hibridazio guztiak 35°C-tan 2 orduz burutu ziren, eta jarraian tiramida-Alexa488-arekin anplifikatu ziren 15 minutuz. Hibridazio-tanpoiko formamidaren kontzentrazioa %55-ekoa izan zen zunda

guztientzako ALF968 eta NON338 zundetarako izan ezik, %45koa eta %20 izan zirenak, hurrenez hurren. Hibridazioa egin zen iragazkien sekzioak DAPI bidez tindatu ziren, ondoren bakterioak epifluoreszentiako mikroskopiaren bidez zenbatzeko eta zunda bakoitzak bakterioen totalarekiko osatzen zuen hibridazio-ehunekoa kalkulatzeko.

#### *Bakterioen metabolismoa eta zelulaz kanpoko entzima-jarduera*

Itsasoko ur-laginak emeki iragazi ziren ponpa peristaltiko baten bidez, 0,9  $\mu\text{m}$ -ko poro tamainako beira-zuntzeko iragazkien bidez (Millipore, AP2504700), bakterioak gainerako komunitate planktonikotik bereizteko. Berreskuratzearen eraginkortasuna  $\%87,3 \pm 9,9$ koa izan zen. Lagina iragazi bezain laster azpilaginetan banatu zen, bakterioen arnasketa, ekoizpena eta zelulaz kanpoko entzima-jarduerak neurtzeko.

Bakterioen arnasketa neurtzeko, iragazitako itsasoko 31 ur-laginak kanpoaldearekin oxigeno-trukea saihesteko diseinatutako 4 ml-tako beirazko ganberetan sartu ziren. Ganbera barruan gertatutako oxigeno kontzentrazioaren jaitziera neurketa jarraituak baimentzen dituen mikroarnasketa-sistema eta oxigeno-mikrosentsoreak (OX-MR) (Unisense) erabiliz monitorizatu zen (Briand *et al.*, 2004). Beirazko ganberak tenperatura kontrolatzen duen bainu batean sartu ziren, tenperatura aldaketek oxigeno-kontzentrazioaren neurketan izan dezaketen akatsak saihesteko. Bakterio-komunitatearen arnasketa kalkulatzeko, denboraren eta oxigeno-kontzentrazioaren arteko erregresioaren aldapa negatiboa erabili zen, 6 h baino beherako inkubazioak bakarrik kontuan hartuz. Arnastutako oxigenoa karbono-arnasketa abiaduran bihurtu zen 1-eko arnas-kozientea erabiliz (del Giorgio *et al.*, 2006).

Bakterioen ekoizpena proteinen sintesi-abiaduratik abiatuta estimatu zen, leuzina tritiatuaren barneratze-metodoa erabiliz (Kirchman *et al.*, 1985). Isotopoa ( $[^3\text{H}]$  - Leuzina) kontzentrazio asetzailan (amaierako kontzentrazioa 40 nM) 5 ml-tako hiru azpilagini gehitu zitzaion, eta *in situ* tenperaturaren eta iluntasunean inkubatu ziren ordubetez. Aldi berean, prozedura bera errepikatu zen azido trikloroazetikoarekin (ATK) fixatutako 5 ml-ko 2 zurirekin, aurretik (%50eko azken

kontzentrazioa). Inkubazioa ATK gehituz (%5eko amaierako kontzentrazioa) eta laginak izotzean 5 minutuz sartuz gelditu egin zen. Ondoren, laginak 0,22 µm poro-tamainako zelulosa-azetatozko iragazkien bidez (Sartorius) iragazi ziren, eta bost aldiz ikuzi ziren 5 ml %5eko ATKrekin. Iragazkiak airean lehortzen utzi, izarniadura-bialetan sartu eta etilo-azetatozko 500 µl-rekin nahastu ziren 20 minutuz. Azkenik, izarniadura-kokteleko 4 ml gehitu ziren (Ultima Gold, Perkin Elmer) eta erradioaktibitatea Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR izarniadura-kontagailu batean neurtu zen, iraungitzea zuzentzeko kanpoko estandarrak erabiliz. Bakterioen biomasaren ekoizpena 1,55 kg C mol leu<sup>-1</sup> konbertsio-faktore teorikoa erabiliz kalkulatu zen, isotopoaren barne-diluziorik ez dagoela onartzen duena (Simon & Azam, 1989).

Komunitate osoaren bakterioen arnasketa eta ekoizpena *in situ* tenperaturan neurtu ziren, eta 0,9 µm poro-tamainako iragazkian atxiki ziren bakterioen proportzioa eta haien biomasa kontuan hartuta kalkulatu ziren. Bai bakterioen arnasketa zein ekoizpena denbora-eskala berdinean neurtu ziren, hau da, 6 ordutik beherako inkubazio-aldietan.

Bakterioen karbono-eskaria (BKE) eta bakterioen hazkuntza-efizientzia (BHE) honako ekuazio hauen bidez kalkulatu ziren:

$$BKE = BA + BE$$

$$BHE = \frac{BE}{BE + BA} * 100$$

non BA bakterioen arnasketari dagokion eta BE bakterioen ekoizpenari.

Analizatutako α-glukosidasa (α-Glu), β-glukosidasa (β-Glu) eta leuzina-aminopeptidasa (LAP) zelulaz kanpoko entzima-jarduerak Hoppe-n (1983) metodoaren arabera estimatu ziren fluorimetriaren bidez. Substratu fluorogenikoetako analogoen (4-metilumbeliferil-α-D-glukosidoa (MUF-α-Glu), 4-metilumbeliferil-β-D-glukosidoa (MUF-β-Glu), eta L-leuzina-7-amido-4-metil-kumarina (AMK-Leu)) disoluzio egokiak metilzelosolbean prestatu ziren. Substratu hauek 0,9 µm-ko beira-zuntzeko iragazkietan (Millipore, AP2504700) zehar

aurreiragazitako 3 ml-tako hiru azpilaginetan gehitu ziren, jarduera bakoitzerako kontzentrazio asetzailan (250  $\mu\text{M}$  MUF- $\alpha$ -Glu eta MUF- $\beta$ -Glu substratuentzako, eta 350  $\mu\text{M}$  AMK-Leu substratuarentzako). Hiru substratuen kontzentrazio asetzailak 0 eta 1,5  $\mu\text{M}$  arteko kontzentrazio-tartearekin aurretiaz egindako esperimenduetan zehaztu ziren, eta entzima bakoitzarentzat lortutako gehieneko abiaduraren arabera zehaztu ziren. Laginak *in situ* tenperaturan inkubatu ziren 6 ordu baino gutxiagoko inkubazioetan. Substratuen hidrolisiak Perkin Elmer LS50B espektrofluorimetroa erabiliz antzeman ziren, kitzipapen/igorpen 342 nm/453 nm-ko uhin luzerekin glukosidasen jardueraren kasuan eta 360 nm /445 nm-ko uhin-luzerekin LAP-aren jardueraren kasuan. Fluoreszentziaren igoera lineala jardueran bihurtzeko MUF (0 – 0,5  $\mu\text{M}$ ) eta AMK (0 – 1  $\mu\text{M}$ ) fluorokromoen kontzentrazio desberdinekin osotutako kalibratze-zuzena erabili zen.

Bakterioen arnasketaren, ekoizpenaren eta zelulaz kanpoko entzima-jarduera espezifikoak kalkulatzeko, aldagai metaboliko bakoitzaren balioa lagin horren bakterioen dentsitatearekin zatitu zen.

#### *Ingurumen faktoreak*

*a* klorofilaren edukia fotometrikoki neurtu zen iragazkietan atxikitako planktonaren estraktu azetonikotik abiatuta, APHA-AWWA-WEFek (1998) deskribatutako metodo estandarren arabera. Itsasoko uraren 1 litrotako hiru erreplika iragazi ziren GF/F (Whatman) iragazkien bidez, iragazkiak beirazko hodietan sartu ziren, zeinei 5 ml azetona gehitu zitzaizkien (% 90 b/b), 24 orduz *a* klorofila erauzteko 4°C-tan iluntasunean. Denbora hori igarota, hodiak indarrez astindu ziren eta erauzketa 4°C-tan 30 minutuz luzatu zen. Kontrol gisa laginik gabeko GF/F (Whatman) iragazki bat erabili zen, gainerako iragazkiak bezala prozesatu zena. Lau hodiak (hiru lagin eta kontrol bat) 3000 rpm-tan zentrifugatu ziren 20 minutuz, eta erauzkinak zituzten gainjalkinak bildu ziren. Absorbantzia lau uhin-luzera desberdinetan (750 nm, 664 nm, 647 nm eta 630 nm) zehaztu zen espektrofotometro (Implen) baten bidez, eta %90eko b/b azetona zuri gisa erabiliz. 664 nm-ko, 647 nm-ko eta 630 nm-ko xurgapenak partikula esekien ondorioz gertatutako uhertasuna adierazten duen 750 nm-ko xurgapena kenduz

zuzendu ziren. Lau erauzkinetako  $\alpha$  klorofilaren kontzentrazioa ekuazio honen bidez kalkulatu zen:

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

non  $\text{Chl}a$   $\alpha$  klorofila ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) den,  $v$  azetona-erauzkinaren bolumen (ml) eta  $V$  iragazitako laginaren bolumena (l). Kontrolean lortutako  $\alpha$  klorofilaren kontzentrazioa hiru errepliken batez bestekoari kendu zitzaion.

Mantenugai ez-organikoen neurketarako, itsasoko ur-lagineko 500 ml jaso eta berehala izoztu ziren  $-80^{\circ}\text{C}$ -tan analizatu arte. Nitratoak, fosfatoak eta silikatoak BRAN-LUEBBE AAIII autoanalizatzaile batekin analizatu ziren, Grasshoff-ek *et al.* (1983) segmentatutako fluxu bidezko mantenugaien analisia automatikorako deskribatutako metodoak jarraituz. Nitratoen kontzentrazioa Griess-Ilosvay-ren erreakzio kolorimetrikoaren (Griess, 1858) bitartez neurtu zen, Cd-Cu murriztapen-zutabea erabiliz nitritorako murriztapenaren ondoren; fosfatoen eta silikatoen kontzentrazioa molibdeno-urdinaren metodoaren bidez neurtu ziren.

Disolbatutako karbono organikoa Benner-en eta Strom-en metodoaren (1993) arabera determinatu zen. Laginak alde aurretik  $450^{\circ}\text{C}$ -tan azidoarekin garbitutako eta Milli-Q urarekin ikuziako iragazketa-sistema bat erabiliz iragazi ziren erretako GF / C (Whatman) iragazkien bidez. Iragazketaren lehen frakzioa baztertu ondoren, itsasoko uraren 10 - 15 ml-tako laginak hartu ziren hirukoiztuta, erretako beirazko anpoiletan, eta azido ortofosforikoarekin azidotu ziren  $\text{pH} \sim 2$ ra, termikoki zigilatu eta analisia egin arte  $4^{\circ}\text{C}$ -ko iluntasunean biltegiratu aurretik. Disolbatutako karbono organikoa Shimadzu TOC-CVS karbono organikoaren analizatzaile batean neurtu zen,  $\pm 0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$  zehaztasunarekin. Ekipoa egunero estandarizatu zen hidrogeno eta potasio ftalato estandar batekin. Disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazioa neurtzeko, Milli-Q uraz (Merck) prestatutako zuriaren azalera laginaren batez besteko azalerari kendu zitzaion, eta kurba estandarren maldarekin zatitu zen.

Disolbatutako materia organiko fluoreszentea Nieto-Cid-ek *et al.* (2006) deskribatutakoaren arabera determinatu zen. Neurketa indibidualak Perkin Elmer

LS50B espektrofluorometro batean burutu ziren kuartzozko 1 cm-tako kubeta ez-fluoreszente batean. Kitzipapen / igorpen uhin-luzerarako arteka-zabalerak 10 nm-takoak izan ziren eta esplorazio-abiadura 250 nm min<sup>-1</sup>-takoak. Erabilitako Kitzipapen / igorpen uhin-luzerak Coble-k (1996) ezarritakoak izan ziren: 280 nm / 350 nm (T pikoa) proteina antzeko substantzien adierazle bezala, eta 340 nm / 440 nm (C pikoa) eta 320 nm / 410 nm (M pikoa) humikoen antzeko substantzien adierazle bezala. Fluoreszentzia-neurriak kinina sulfato unitatetan (KSU) bihurtu ziren 0,05 mol l<sup>-1</sup> azido sulfurikoan disolbatutako kinina sulfato dihidratoarekin egindako estandar-kurbak erabiliz, Kitzipapen / igorpen uhin-luzerak 340 nm / 440 nm izanda, eta non 1 KSU 1 µg l<sup>-1</sup> fluoreszentzia-emisioaren baliokidea izan zen. Milli-Q uraz (Merck) prestatutako zuriaren fluoreszentzia lagin guztiei kendu zien.

#### *Analisisa estatistikokoak*

Lau egoeretako aldagaien arteko desberdintasun adierazgarriak identifikatzeko, Wilcoxon proba ez-parametrikoa erabili zen. Aldagaien arteko korrelazioak rho Spearman korrelazio-koefizienteen bitartez zehaztu ziren. Erregresio lineal sinpleak egin ziren inkubazio-denboran zehar disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura lortzeko ( $p < 0,05$ ). Analisisa estatistikoa hauek Windowsen IBM SPSS Statistics 20 bertsioarekin egin ziren.

Bakterio-komunitatearen konposizioak urtean zehar duen aldakortasuna aldagaien multzo baten arabera antolatzeko, erreduantzia-analisisa (RDA) erabiltzen zen, *decostand* funtzioa analisiaren aurreko estandarizazio-metodo gisa erabiliz (*vegan* R paketea; Oksanen *et al.*, 2015). Bakterioen konposizioan eta metabolismoan oinarritutako urtarokoaren joera ebaluatzeko, multzo hierarkikoa egin zen (*pvclust* R paketea; Suzuki & Shimodaira, 2006). Erlazionatutako hilabeteak dendrograma baten bidez identifikatu ziren, Bray-Curtis-en disimilazioa zuen Ward-en metodoa egokituz. Bai RDA bai talde hierarkikoa R-ren 3.1.0 bertsioan gauzatu ziren (Development core team R, 2016). Analisisa estatistikoa guztien esangarritasuna  $p < 0,05$ ean onartu zen.

## Emaizak

### *Urtaroko patroia*

Ekialdeko Kantauriar itsasoko kostaldeko itsas-estazioa 11 aldiz lagindu zen 2008ko martxotik 2009ko ekainera arte, eta beste 20 aldiz 2011ko otsailetik 2012ko abendura arte (guztira 31 lagin) (3.2. Irudia).

	Urtarrila	Otsaila	Martxoa	Apirila	Maiatza	Ekaina	Uztaila	Abuztua	Iraila	Urtia	Azaroa	Abendua
2008			●	●	●	●	●		●		●	
2009		●		●	●	●						
2011		●	●	●		●	●	●	●	●	●	
2012	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●

**3.2. Irudia** 2008, 2009, 2011 eta 2012 urteetan Armintzako estazioan laginketa egin zen hilabeteen laburpena. Guztira 31 lagin jaso ziren.

3.1. Taulan aztertutako aldagai guztietarako lortutako hileko batez besteko balioak jasotzen dira. Urtaroko joera hiru bakterio dinamikaren deskribatzaile orokorretan oinarritutako talde hierarkiko batetik abiatuta detektatu zen: bakterioen karbono-eskaria, bakterioek prozesatutako karbono-kantitate osoa adierazten duena; bakterioen hazkuntza-efizientzia, bakterio-komunitateak karbonoa goragoko maila trofikoetara transferitzeko duen eraginkortasuna erakusten duena; eta bakterio komunitatearen konposizioa, zunda fluoreszenteen *in situ* hibridazioaren bidez (CARD-FISH) antzemandako 4 talde filogenetiko nagusiren ugaritasuna bezala zehaztuta. Hilabeteetan identifikatutako laginak, urtaroko bi egoeratan taldekatu zirela ikusi zen (talde bat maiatzetik irailera, eta bestea urritik apirilera) (3.3. Irudia). Hala ere, talde bakoitzaren azken hilabeteko laginek, irailekoak eta apirilekoak, desadostasun nabarmenak erakutsi zituzten bere taldeko beste laginekin konparatuta, hala nola



bakterioen hazkuntza-efizientziaren eta ekoizpenaren balio oso baxuak, eta *Bacteroidetes*-en eta *Alfaproteobacteria*-en kodominantzia konposizioan. Desberdintasun horiek iradokitzen zuten lagin horiek bitarteko egoerak irudikatzen zituztela, eta beraz, analisi bereizi bat behar zutela. Horrela, ekosistema honen urtaroko zikloa bi egoera luzez adierazita egon liteke: uda (maiatzetik abuztura), metabolismo-jarduera altuaz eta *Bacteroidetes*-en dominantziaz karakterizatuta (12 lagin); eta negua (urritik martxora), metabolismo-jarduera baxuaz eta *Alfaproteobacteria*-en dominantziaz karakterizatuta (13 lagin). Negua eta uda bi trantsizio-aldi motzez bananduta aurkitu ziren, apirilean ( $T_A$ , 4 lagin) eta irailean ( $T_I$ , 2 lagin).

Aztertutako aldagai guztien aldi bakoitzeko batez besteko balioak 3.2 taulan agertzen dira. Lehen aipatutako hiru deskribatzaileez gain, beste ingurumen-aldagai batzuek ere urtaroko patroia errepikakorra erakutsi zuten. Itsasoko gainazaleko tenperaturak itsaso epeletako ohiko urtaroko-eredua erakutsi zuen, maiatzetik urrira aldi beroago batekin, eta ondoren azarotik apirilera aldi hotzagoarekin. Hala ere,  $T_A$  eta  $T_I$  trantsizio egoerak gainazal tenperaturaren aldaketak baino lehenago gertatu ziren (3.4. Irudia, gezi gorriak). *a* klorofilaren kontzentrazioa 0,2 eta 2,4  $\mu\text{g l}^{-1}$  artean egon zen, eta urtaroko balio maximoak neguan detektatu ziren urtero (2008, 2009, 2011 eta 2012),  $T_A$  udaberriko trantsizioa gertatu aurretik (3.4. Irudia, gezi berdea). Lehen mailako ekoizleen lehen loraketa hori nitratoen erreserbaren agortzearekin (3.4. Irudia) eta urtean zehar disolbatutako karbono organikoaren kontzentrazio handienekin erlazionatu zen (3.1. Taula).

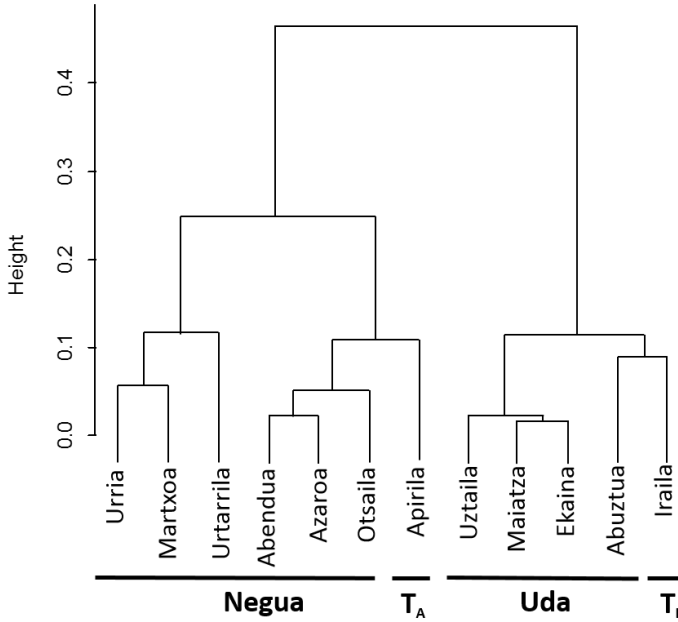
*Synechococcus* bere dentsitate maximoa uztailean eta abuztuan eskuratu zuen (batez besteko balioak  $8,2 \times 10^7$  zel  $\text{l}^{-1}$  eta  $4,4 \times 10^7$  zel  $\text{l}^{-1}$ , hurrenez hurren). Aldiz, *Prochlorococcus* urtarriletik uztaile arte ez zen detektagarria izan. Prokariota autotrofo hauen presentzia, gainazal tenperatura altuko, eta *a* klorofila eta nitrato kontzentrazio baxuko baldintzekin erlazionatu zen (3.4. Irudia).

**3.1. Taula.** Aztertutako aldagaien hileko batez besteko balioak  $\pm$  errore estandarrak. Trantsizio hilabeteak, apirila eta iraila, hondo grisean nabarmendu dira. DMOF<sub>Humik</sub>: disolbatutako material humiko fluoreszentea; DMOF<sub>Prot</sub>: disolbatutako material proteiko fluoreszentea; DMOF<sub>Prot:Humik</sub>: DMOF<sub>Prot</sub> y DMOF<sub>Humik</sub> arteko ratioa;  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu: zelulaz kanpoko  $\alpha$ - eta  $\beta$ -glukosidasa entzima-jardueren arteko ratioa. e.n.: ez neurtuta. e.d.: ez detektagarria.

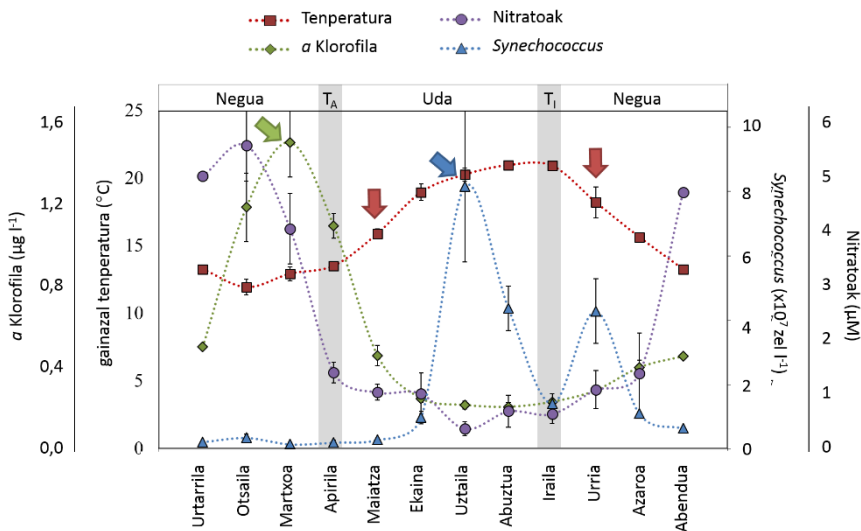
		Urtarrila	Otsaila	Martxoa	Apirila	Maiatza	Ekaina	Uztaila	Abuztua	Iraila	Urria	Azaroa	Abendua
Lagin kopurua		1	3	3	4	3	4	3	2	2	2	3	1
Gainazal tenperatura	°C	13,3	12,0 $\pm 0,6$	13,0 $\pm 0,5$	13,6 $\pm 0,3$	15,9 $\pm 0,3$	19,0 $\pm 0,6$	20,3 $\pm 0,5$	21,0 $\pm 0,3$	21,0 $\pm 0,1$	18,3 $\pm 1,2$	15,7 $\pm 0,3$	13,3
$\alpha$ klorofila	$\mu\text{g l}^{-1}$	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
Disolbatutako karbono organikoa	$\mu\text{M}$	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
Nitratoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	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
Fosfatoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	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 $\pm 0,06$	e.n.
Silikatoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	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
<i>Synechococcus</i>	$\times 10^6$ zel $\text{l}^{-1}$	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> zel l <sup>-1</sup>	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	e.d.	0,7 ± 0,7	19,3 ± 0,0	36,1 ± 5,3	21,7 ± 8,4	2,1
DMOF <sub>Humik</sub>	USQ	3,43	3,39 ± 0,19	3,80 ± 0,53	4,10 ± 0,52	3,30 ± 0,35	2,98 ± 0,25	1,90 ± 0,09	2,33 ± 0,34	3,14 ± 0,62	2,49 ± 0,97	4,46 ± 1,42	4,20	
DMOF <sub>Prot</sub>	USQ	1,57	1,98 ± 0,16	2,18 ± 0,23	2,69 ± 0,24	2,34 ± 0,35	2,89 ± 0,49	2,29 ± 0,10	2,98 ± 0,64	3,14 ± 0,87	2,93 ± 0,35	3,31 ± 0,73	1,83	
DMOF <sub>Prot:Humik</sub>		0,46	0,59 ± 0,08	0,60 ± 0,11	0,69 ± 0,12	0,71 ± 0,08	0,99 ± 0,21	1,21 ± 0,11	1,26 ± 0,09	0,98 ± 0,09	1,33 ± 0,38	0,66 ± 0,17	0,44	
Bakterioen dentsitatea	x10 <sup>9</sup> zel l <sup>-1</sup>	0,98	0,91 ± 0,38	1,26 ± 0,47	0,74 ± 0,09	1,06 ± 0,55	1,11 ± 0,18	1,52 ± 0,26	0,97 ± 0,04	1,56	0,99 ± 0,22	0,84 ± 0,05	0,71	
Nanoflagelatu heterotrofoen dentsitatea	x10 <sup>6</sup> zel l <sup>-1</sup>	0,28	0,82 ± 0,30	0,57 ± 0,11	0,70 ± 0,06	0,57 ± 0,13	2,02 ± 0,74	2,03 ± 1,17	0,51 ± 0,12	1,33 ± 0,48	0,85 ± 0,07	0,37 ± 0,09	0,28	
Nanoflagelatuak : Bakterioak		0,29	2,07 ± 1,63	0,73 ± 0,40	1,06 ± 0,17	0,88 ± 0,34	2,03 ± 0,80	1,62 ± 0,54	0,52 ± 0,40	0,54 ± 0,00	0,92 ± 0,27	0,42 ± 0,09	0,39	
Partikula birikoak	x10 <sup>10</sup> zel l <sup>-1</sup>	e.n.	0,49 ± 0,47	0,85 ± 0,49	1,27 ± 0,48	1,26 ± 0,31	1,27 ± 0,19	e.n.	3,70	3,85	2,20 ± 1,07	1,61 ± 0,40	2,00	
Barkterioen arnasketa	µg C l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>	30,8	69,3 ± 15,6	59,1 ± 14,8	79,2 ± 3,1	101,8 ± 15,7	92,2 ± 13,9	71,3 ± 6,6	110,9 ± 6,8	51,6 ± 12,5	60,0 ± 5,5	64,0 ± 3,6	49,1	
Bakterioen ekoizpena	µg C l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>	14,6	25,2 ± 4,5	31,3 ± 5,6	11,1 ± 2,4	52,5 ± 4,4	59,7 ± 11,5	43,6 ± 2,4	43,0 ± 5,7	10,7 ± 3,3	24,8 ± 0,6	28,4 ± 5,5	19,9	
Bakterioen hazkuntza-efizientzia	%	32,1	27,7 ± 6,0	35,4 ± 2,8	12,0 ± 2,3	34,8 ± 4,9	39,4 ± 3,6	38,2 ± 3,4	28,0 ± 3,9	16,9 ± 0,9	29,4 ± 2,5	30,4 ± 5,1	28,8	

<b>Bakterioen karbono-eskaria</b>	$\mu\text{g C l}^{-1}$ egun <sup>-1</sup>	45,4	94,5 $\pm 15,6$	90,4 $\pm 19,7$	90,3 $\pm 4,9$	154,3 $\pm 15,0$	151,8 $\pm 23,2$	114,9 $\pm 4,9$	153,9 $\pm 1,1$	62,3 $\pm 15,8$	84,8 $\pm 4,8$	92,4 $\pm 5,2$	69,0
<b>Leuzina Aminopeptidasa</b>	$\times 10^3$ nmol MCA l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>	1,80	1,77 $\pm 0,59$	2,64 $\pm 0,14$	2,24 $\pm 0,44$	9,12 $\pm 3,8$	4,34 $\pm 0,97$	5,59 $\pm 3,03$	1,93 $\pm 0,35$	2,42 $\pm 0,38$	1,83 $\pm 0,24$	1,37 $\pm 0,54$	1,58
<b><math>\alpha</math>-Glukosidasa</b>	nmol MUF l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>	14,7	46,5 $\pm 31,7$	42,9 $\pm 22,3$	62,2 $\pm 30,1$	63,6 $\pm 29,2$	49,1 $\pm 17,8$	16,1	9,4 $\pm 0,7$	113,4 $\pm 85,4$	9,7 $\pm 8,4$	18,0 $\pm 4,3$	18,6
<b><math>\beta</math>-Glukosidasa</b>	nmol MUF l <sup>-1</sup> egun <sup>-1</sup>	12,7	48,6 $\pm 28,6$	50,9 $\pm 12,9$	119,6 $\pm 25,3$	116,2 $\pm 48,9$	90,2 $\pm 28,5$	27,1	21,2 $\pm 3,9$	65,8 $\pm 52,9$	22,3 $\pm 16,6$	19,8 $\pm 7,7$	12,5
<b><math>\alpha</math>-Glu / <math>\beta</math>-Glu</b>		1,16	0,66 $\pm 0,08$	0,73 $\pm 0,23$	0,70 $\pm 0,15$	0,66 $\pm 0,21$	0,48 $\pm 0,10$	0,59	0,46 $\pm 0,12$	1,93 $\pm 0,25$	0,35 $\pm 0,12$	0,60 $\pm 0,24$	1,49
<b><i>Alfaproteobacteria</i></b>	%	46,3	41,5 $\pm 1,7$	37,5 $\pm 1,1$	34,5 $\pm 2,3$	27,7 $\pm 2,8$	23,7 $\pm 2,3$	28,3 $\pm 4,3$	26,3 $\pm 1,4$	27,3	40,6 $\pm 0,2$	41,0 $\pm 0,3$	39,9
<b><i>Bacteroidetes</i></b>	%	21,9	23,0 $\pm 2,9$	26,4 $\pm 4,9$	31,8 $\pm 1,4$	39,6 $\pm 2,4$	39,0 $\pm 1,4$	34,8 $\pm 4,5$	38,6 $\pm 5,6$	30,8	22,3 $\pm 0,8$	21,7 $\pm 2,3$	23,4
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	%	15,8	23,0 $\pm 5,4$	21,2 $\pm 2,0$	20,2 $\pm 1,4$	17,5 $\pm 3,3$	21,2 $\pm 2,0$	23,0 $\pm 1,7$	22,3 $\pm 3,2$	23,2	24,1 $\pm 0,4$	21,5 $\pm 0,6$	23,8
<b><i>Betaproteobacteria</i></b>	%	7,1	6,0 $\pm 0,8$	8,6 $\pm 2,3$	6,5 $\pm 0,6$	7,5 $\pm 1,8$	8,4 $\pm 0,3$	7,2 $\pm 1,6$	5,9 $\pm 0,9$	8,6	6,7 $\pm 2,0$	8,6 $\pm 2,3$	6,3
<b>Bestelako <i>Eubacteria</i></b>	%	8,9	6,6 $\pm 0,2$	6,2 $\pm 0,8$	7,0 $\pm 0,6$	7,7 $\pm 0,8$	7,6 $\pm 0,7$	6,7 $\pm 0,1$	6,8 $\pm 0,3$	10,1	6,3 $\pm 0,6$	7,3 $\pm 0,7$	6,6



**3.3. Irudia.** 2008 eta 2012 artean kalkulaturako bakterioen karbono-eskarian, hazkuntza-efizientzia eta komunitatearen konposizioan oinarritutako taldekatze hierarkikorako. Udako, neguko eta trantsizio-aldietako ( $T_A$  eta  $T_I$ ) hilabeteak lerroekin mugatuta daude.



**3.4. Irudia.** Itsasoko uraren gainazal temperaturaren,  $\alpha$  klorofilaren eta nitritoen kontzentrazioaren, eta *Synechococcus* dentsitatearen bilakaera tenporala. Gezi gorriek gainazal temperaturaren aldatetaren hasiera adierazten dute, trantsizio-aldien ondoren ( $T_A$  eta  $T_I$ ). Gezi berde eta urdinek  $\alpha$  klorofilaren eta *Synechococcus* espeziearen maximoak adierazten dituzte,  $T_A$  eta  $T_I$  baino lehenagokoak, hurrenez hurren. Barra grisek trantsizio-aldiak nabarmentzen dituzte.

**3.2. Taula** Aldi bakoitzeko aztertutako aldagaien batez besteko balioak (negua, uda eta trantsizioak)  $\pm$  errore estandarrak. Trantsizio-aldiak, apirila (TA) eta iraila (TS), hondo grisean nabarmendu dira. DMOF<sub>Humik</sub>: disolbatutako material humiko fluoreszentea; DMOF<sub>Prot</sub>: disolbatutako material proteiko fluoreszentea; MODF<sub>Prot:Humik</sub>: DMOF<sub>Prot</sub> y DMOF<sub>Humik</sub> arteko ratioa;  $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu: zelulaz kanpoko  $\alpha$ - eta  $\beta$ -glukosidasa entzima-jardueren arteko ratioa. e.d.: ez detektagarria.

		Negua		T <sub>A</sub>		Uda		T <sub>I</sub>	
		$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$	$\bar{x}$	$\pm ES$
Gainazal tenperatura	°C	14,2	0,7	13,6	0,3	18,9	0,6	21,0	0,1
a Klorofila	$\mu\text{g l}^{-1}$	0,84	0,20	1,10	0,19	0,29	0,5	0,23	0,04
Disolbatutako karbono organikoa	$\mu\text{M}$	168	36	251	67	144	12	166	
Nitratoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	3,42	0,75	1,42	1,02	0,75	0,18	0,65	
Fosfatoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	0,22	0,04	0,17	0,09	0,20	0,03	0,50	
Silikatoen kontzentrazioa	$\mu\text{M}$	3,69	0,73	1,22	0,42	2,93	0,60	5,25	
<i>Synechococcus</i>	$\times 10^6 \text{ zel l}^{-1}$	12,6	6,0	2,1	1,9	39,0	18,1	14,1	
<i>Prochlorococcus</i>	$\times 10^6 \text{ zel l}^{-1}$	15,1	7,0	e.d		0,2	0,2	19,3	
DMOF <sub>Humik</sub>	USQ	3,59	0,31	4,10	0,52	2,73	0,22	3,14	0,62
DMOF <sub>Prot</sub>	USQ	2,43	0,22	2,69	0,24	2,62	0,21	3,14	0,87
DMOF <sub>Prot:Humik</sub>		0,70	0,10	0,69	0,12	1,00	0,10	0,99	0,09
Bakterioen dentsitatea	$\times 10^9 \text{ zel l}^{-1}$	0,98	0,13	0,74	0,09	1,15	0,16	1,56	
Nanoflagelatu heterotrofoen dentsitatea	$\times 10^6 \text{ zel l}^{-1}$	0,58	0,09	0,70	0,06	1,41	0,40	1,33	0,48

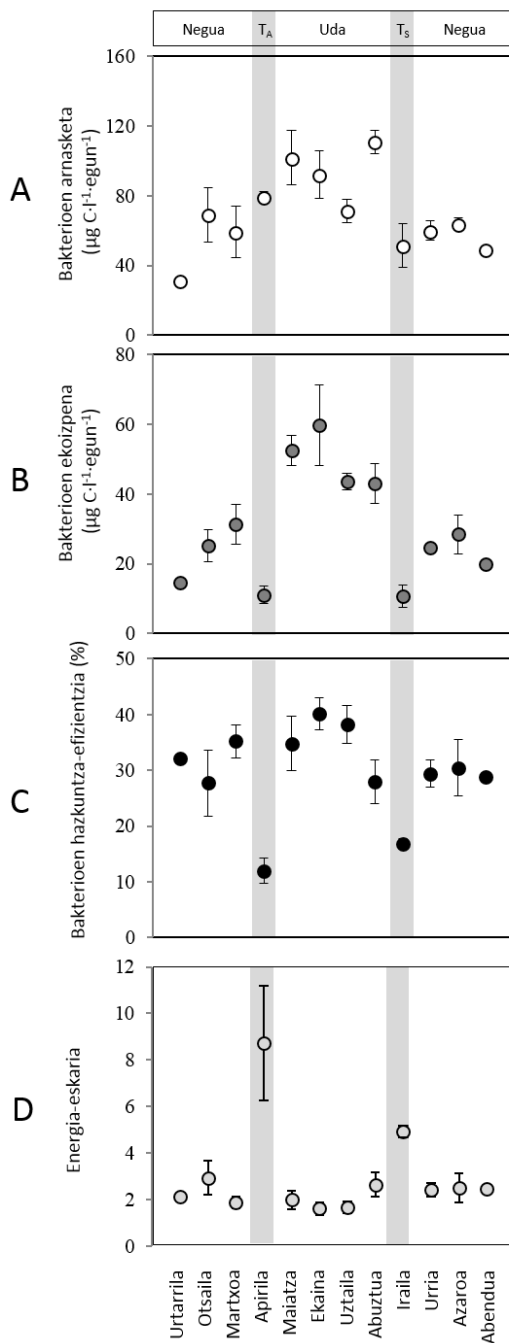
<b>Nanoflagelatuak : Bakterioak</b>		<b>0,94</b>	<b>0,38</b>	<b>1,06</b>	<b>0,17</b>	<b>1,37</b>	<b>0,35</b>	<b>0,54</b>	
<b>Partikula birikoak</b>	<b>x10<sup>10</sup> zel l<sup>-1</sup></b>	<b>1,32</b>	<b>0,31</b>	<b>1,27</b>	<b>0,48</b>	<b>1,67</b>	<b>0,42</b>	<b>3,85</b>	
<b>Bakterioen arnasketa</b>	<b>µg C l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>59,8</b>	<b>5,2</b>	<b>79,2</b>	<b>3,1</b>	<b>92,5</b>	<b>7,0</b>	<b>51,6</b>	<b>12,5</b>
<b>Bakterioen ekoizpena</b>	<b>µg C l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>26,0</b>	<b>2,2</b>	<b>11,1</b>	<b>2,4</b>	<b>51,1</b>	<b>4,3</b>	<b>10,7</b>	<b>3,3</b>
<b>Bakterioen hazkuntza-efizientzia</b>	<b>%</b>	<b>30,8</b>	<b>1,9</b>	<b>12,0</b>	<b>2,3</b>	<b>35,1</b>	<b>2,1</b>	<b>16,9</b>	<b>0,9</b>
<b>Bakterioen karbono-eskaria</b>	<b>µg C l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>85,8</b>	<b>6,4</b>	<b>90,3</b>	<b>4,9</b>	<b>143,5</b>	<b>9,2</b>	<b>62,3</b>	<b>15,8</b>
<b>Leuzina Aminopeptidasa</b>	<b>x10<sup>3</sup> nmol MCA l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>1,87</b>	<b>0,21</b>	<b>2,23</b>	<b>0,44</b>	<b>5,43</b>	<b>1,30</b>	<b>2,41</b>	<b>0,38</b>
<b>α-Glukosidasa</b>	<b>nmol MUF l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>27,4</b>	<b>7,7</b>	<b>62,2</b>	<b>30,1</b>	<b>42,2</b>	<b>12,2</b>	<b>113,4</b>	<b>85,4</b>
<b>β-Glukosidasa</b>	<b>nmol MUF l<sup>-1</sup> egun<sup>-1</sup></b>	<b>32,9</b>	<b>8,0</b>	<b>119,6</b>	<b>25,3</b>	<b>77,9</b>	<b>20,6</b>	<b>65,8</b>	<b>52,9</b>
<b>α-Glu / β-Glu</b>		<b>0,73</b>	<b>0,12</b>	<b>0,70</b>	<b>0,15</b>	<b>0,54</b>	<b>0,07</b>	<b>1,92</b>	<b>0,25</b>
<b><i>Alfaproteobacteria</i></b>	<b>%</b>	<b>40,6</b>	<b>0,8</b>	<b>34,5</b>	<b>2,3</b>	<b>26,3</b>	<b>1,5</b>	<b>27,3</b>	
<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b>%</b>	<b>23,3</b>	<b>1,3</b>	<b>31,8</b>	<b>1,4</b>	<b>38,0</b>	<b>1,8</b>	<b>30,8</b>	
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	<b>%</b>	<b>21,9</b>	<b>1,3</b>	<b>20,2</b>	<b>1,4</b>	<b>20,9</b>	<b>1,5</b>	<b>23,2</b>	
<b><i>Betaproteobacteria</i></b>	<b>%</b>	<b>7,4</b>	<b>0,8</b>	<b>6,5</b>	<b>0,6</b>	<b>7,5</b>	<b>0,6</b>	<b>8,6</b>	
<b>Bestelako <i>Eubacteria</i></b>	<b>%</b>	<b>6,8</b>	<b>0,3</b>	<b>7,0</b>		<b>7,3</b>	<b>0,3</b>	<b>10,1</b>	

Nanoflagelatu heterotrofoen dentsitatea neguan udan baino baxuagoa izan zen (Wilcoxon proba  $p < 0,05$ ) eta partikula birikoentzako joera bera antzeman zen, desberdintasunak estatistikoki adierazgarriak izan ez ziren arren. Tesi honetako **2. kapitulu**an adierazten den bezala, nanoflagelatu heterotrofoen eta bakterioen arteko ratioa, harraparitza presioaren adierazlea (Gasol, 1994), disolbatutako materia organikoaren aldaketarekin erlazionatuta dago. Erlazio honek korrelazio positiboa aurkeztu zuen LAP,  $\alpha$ -Glu eta  $\beta$ -Glu entzima-jarduera espezifikoekin, baita bakterioen arnasketa espezifikoarekin (Spearman rho = 0,52,  $p < 0,01$ ), bakterioen ekoizpenarekin (Spearman rho = 0,43,  $p < 0,05$ ) eta bakterioen karbono-eskariarekin (Spearman rho = 0,50,  $p < 0,01$ ) ere (TG.2. Taula gehigarria).

#### *Bakterioen metabolismoa eta zelulaz kanpoko entzima-jarduera*

Bakterio-komunitatearen metabolismoak urtaroko patroia errepikakor argia jarraitu zuen (3.2. Taula eta 3.5. Irudia). Kontsumitutako karbonoa 1,7 aldiz baxuagoa izan zen neguan udan baino ( $86 \pm 6 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$  vs.  $144 \pm 9 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ egun}^{-1}$ ; Wilcoxon proba,  $p < 0,001$ ). Bakterioen arnasketak eta ekoizpenak antzeko joerak erakutsi zituzten, neguan udan baino balio nabarmenki baxuagoekin ( $p < 0,001$  bientzat). Hala ere, bakterioen hazkuntza-efizientziak ez zuen bi egoera hauen artean desberdintasun adierazgarrikerik erakutsi (batez besteko balioa %31 neguan eta %35 udan; Wilcoxon proba,  $p > 0,1$ ). Trantsiziozko laginetan, bakterioen ekoizpenaren balioak urte osotik baxuenak izan ziren, eta ondorioz, bakterioen hazkuntza-efizientzia %18-ra jaitsi zen, detektatutako baliorik baxuenetara. Bakterioen arnasketaren eta ekoizpenaren arteko erlazioa, bakterio-biomasa unitate bakarra lortzeko beharrezko energia-eskariaren adierazle bezala erabili zen. Energia-eskari honen batez bestekoa  $7,5 \pm 1,0$  izan zen trantsizio-egoeretan ( $T_A$  eta  $T_I$  batera), neguan eta udan lortutako balioak baino estatistikoki altuagoa izan zena ( $2,4 \pm 0,2$  eta  $1,9 \pm 0,2$ , hurrenez hurren; Wilcoxon proba,  $p < 0,001$ ) (3.5.D. Irudia).





**3.5. Irudia** Bakterioen arnasketaren (A), ekoizpenaren (B), hazkuntza-efizientiaren (C) eta bakterioen arnasketaren eta ekoizpenaren arteko ratio gisa kalkulaturako energia-eskariaren (D) urtean zeharreko banaketa. Barra grisek trantsizio-aldiak nabarmentzen dituzte (T<sub>A</sub> eta T<sub>S</sub>). Batez besteko balioak  $\pm$  errore estandarra aurkezten dira.

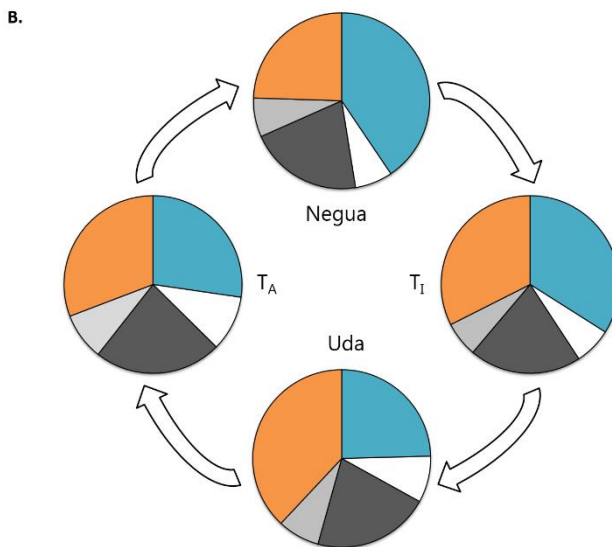
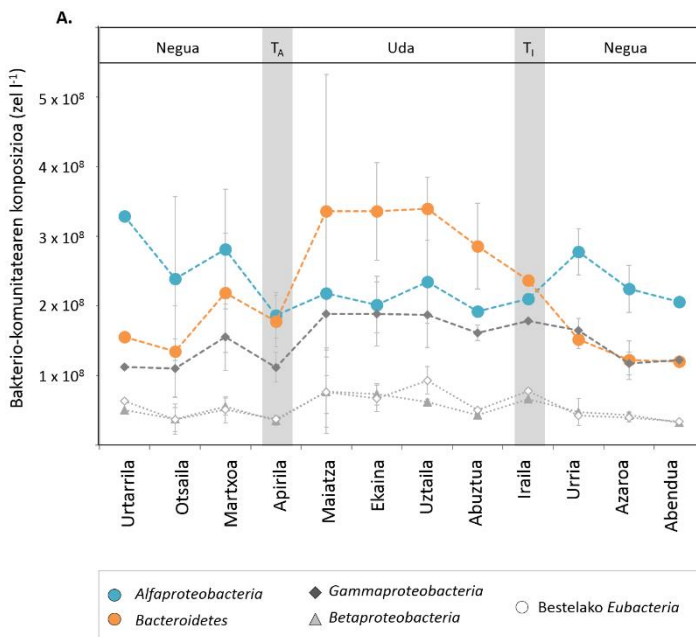
LAP,  $\alpha$ -Glu eta  $\beta$ -Glu zelulaz kanpoko entzima-jarduerei dagokienez, baxuagoak izan ziren neguan udan baino (3.2. Taula), nahiz eta batez besteko LAP espezifikoarentzako soilik aurkitu ziren desberdintasun esangarriak (Wilcoxon proba,  $p = 0,005$ ). Hala ere, korrelazio positibo hurbilak egon ziren LAP,  $\alpha$ -Glu,  $\beta$ -Glu eta bakterioen arnasketa espezifikoentzako. Gainera,  $\alpha$ -Glu eta  $\beta$ -Glu arteko erlazioa, disolbatutako karbohidratoen labilitatearen adierazlea (Decho & Herndl, 1995; Karner & Rassoulzadegan, 1995), neguan udan baino altuagoa izan zen. Erlazio honek negatiboki korrelazionatu zuen bakterioen karbono-eskariarekin (TG.2. Taula gehigarria) (Spearman rho = -0,60;  $p < 0,05$ ).

### *Bakterio-komunitatearen konposizioa*

Bi talde filogenetiko nagusien txandaketa, *Bacteroidetes* eta *Alfaproteobacteria*, oso nabaria izan zen ikerketan zehar (3.6. Irudia). Neguan, *Alfaproteobacteria* ( $2,6 \pm 0,3 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$ ) *Bacteroidetes* baino ugariagoak ( $1,5 \pm 0,2 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$ ) izan ziren; udan berriz, *Bacteroidetes* ( $3,3 \pm 0,4 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$ ) menderatu zuten *Alfaproteobacteria*-en gain ( $2,1 \pm 0,3 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$ ) ( $p < 0,001$  bi kasuetarako). Trantsizioko laginek bitarteko eta antzeko balioak erakutsi zituzten bi talde filogenetiko hauetarako. *Gammaproteobacteria* hirugarren talderik ugariena izan zen urtaroko ziklo osoan zehar ( $1,5 \pm 0,2 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$  ikerketa guztian), eta *Bacteroidetes*-en joera berdina jarraitu zuten, nahiz eta modu ez hain nabarmenean. *Betaproteobacteria* beti detektatu ziren portzentaia askoz baxuagoan ( $5,3 \pm 0,7 \times 10^7$  zel  $l^{-1}$ ) eta ez zuten urtarokotasunik erakutsi. Gainerako bakterioek, zunda espezifikoen bitartez ez zirenak identifikatu, inoiz ez ziren izan  $1,7 \times 10^8$  zel  $l^{-1}$  baino gehiago ( $5,6 \pm 0,7 \times 10^7$  zel  $l^{-1}$ ). Arkeoak ez ziren kuantifikatu, eskuarki itsas-kostalde honetan oso portzentaia baxuan aurkitzen baitira (Alonso-Sáez *et al.*, 2009).

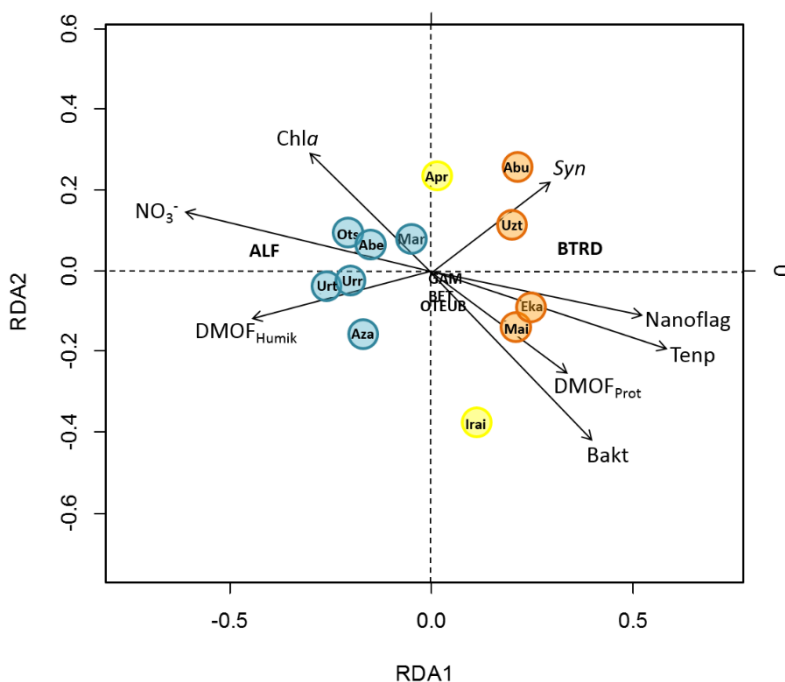
Azpimarratu beharrekoa da, *Bacteroidetes*-en proportzioak bakterioen karbono-eskariarekin korrelazio positibo estua erakutsi zuela (Spearman rho = 0,56;  $p < 0,01$ ), baita LAP jarduerarekin ere (Spearman rho = 0,60;  $p < 0,01$ ). *Alfaproteobacteria*-en proportzioak alderantziz korrelazionatu zuen bakterioen karbono-eskariarekin (Spearman-en rho = -0,51;  $p < 0,01$ ), LAP jarduerarekin

(Spearman rho = -0,60; p < 0,01) eta  $\beta$ -Glu jarduerarekin (Spearman rho = -0,50; p < 0,01) ((TG.2. Taula gehigarria).



**3.6. Irudia** (A) Bakterio-komunitatearen konposizioaren denbora-bilakaera. Datuak batez beste  $\pm$  desbideratze estandar gisa aurkezten dira. (B) Kantauri ekialdeko komunitateko bakterio-talde nagusien (*Alfaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* eta bestelako *Eubacteria*) proportzio erlatiboak ekosistemak igarotzen dituen lau aldietan: negua, lehen trantsizioa (T<sub>A</sub>), uda eta bigarren trantsizioa (T<sub>S</sub>). Barra grisek trantsizio-aldiak nabarmentzen dituzte.

Erredundantzia analisia bat egin zen (3.7. Irudia) bakterio-komunitatearen konposizioaren aldaketak aldagai multzo baten arabera laburbiltzeko: *a* klorofila, nitratoak, disolbatutako material fluoreszente humikoa eta proteikoa, gainazal tenperatura, eta nanoflagelatu heterotrofoen, bakterioen eta *Synechococcus*-en dentsitateak.



**3.7. Irudia.** Ingurumen-aldagaien (geziak) eta bakterio-komunitateko talde nagusien (letra lodiz) (*Alfaproteobacteria* (ALF), *Bacteroidetes* (BTRD), *Gammaproteobacteria* (GAM), *Betaproteobacteria* (BET) eta bestelako *Eubacteria* (OTUEB)) arteko erlazioaren erredundantzien analisia (RDA). Neguko hilabeteak urdinez irudikatuta daude, udako hilabeteak gorritz eta trantsizio-aldiak horiz. Aztertutako aldagaiak: *a* klorofila (*Chla*), nitratoen kontzentrazioa ( $\text{NO}_3^-$ ), disolbatutako materia organiko fluoreszente proteikoa eta humikoa ( $\text{DMOF}_{\text{Prot}}$  eta  $\text{DMOF}_{\text{Humik}}$ ), *Synechococcus*-en dentsitatea (*Syn*), gainazaleko tenperatura (*Tenp*), nanoflagelatu heterotrofoen dentsitatea (*Nanoflag*) eta bakterioen dentsitatea (*Bakt*).

Bakterio-komunitatearen konposizioaren aldaketaren %87,7-a aldagai hauei egokitu zitzaion, aldaketaren %12,3a beste faktore ezezagun batzuei egon zitzaion bitartean. Beraz, *Alfaproteobacteria* *a* klorofilaren, nitratoen eta disolbatutako material fluoreszente humikoen kontzentrazio altuko aldietan ugariagoak izan ziren, (neguko laginak bereizten dituzten aldagaiak); *Bacteroidetes*, berriz, gainazal tenperatura, nanoflagelatu heterotrofoen eta *Synechococcus*-en

dentsitate eta material fluoreszente proteikoen kontzentrazio altuekin ugariagoak izan ziren (udako aldagai bereizgarriak direnak). Gainazal tenperatura, nanoflagelatu heterotrofoen eta bakterioen dentsitatea eta disolbatutako material organiko fluoreszente proteikoa haien artean hertsiki erlazionatuta zeudela detektatu zen.

### **Eztabaida**

Gure emaitzek argi erakusten dute lau urtetan zehar (2008tik 2012ra) ekialdeko Kantauri Itsasoko kostaldeko uretan urtaroko ziklo errepikakor bat. Urтарoko ziklo hau funtzionalki egonkorak diren bi egoerez osatuta dago: negua (urritik martxora) eta uda (maiatzetik abuztura), zeintzuek bakterio-komunitatearen konposizioa eta karbonoaren erabilera-maila desberdinak aurkezten dituzten, baina bakterioen hazkuntza-efizientzia balio altu eta antzekoekin. Egoera hauek trantsizio-aldi motzen bidez lotuta daude,  $T_A$  (apirila) eta  $T_I$  (iraila), zeinetan bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioak nabarmenki jaisten diren eta bakterio-komunitatearen konposizioak eta metabolismoak aldaketa azkarrak jasotzen dituzten.

Mikroorganismoen hiru komunitate nagusiak, bakterioak, nanoflagelatuak eta birusak, ugariagoak dira udan neguan baino, eta bai bakterioen zein nanoflagelatu heterotrofoen dentsitateek positiboki korrelazionatzen dute itsas-uraren tenperaturarekin. Ez dira aurkitu gainazal tenperaturaren eta bakterioen karbono-eskariaren, ekoizpenaren edo arnasketaren arteko korrelazio esangarririk, beste ikerketa batzuetan ez bezala; Kantauri Itsasoko ekialdean eta zentrolean egindako beste ikerketa batzuetan (Iriberrí *et al.*, 1985; Huete-Stauffer *et al.*, 2015; Morán & Scharek, 2015), itsas-uretako tenperaturak mikroorganismoen jarduera heterotrofikoarengan duen efektu positiboa ikusi da. Beraz, emaitza hauek ez dute tenperatura sostengatzen ekialdeko Kantauri Itsasoko aldakortasunaren bultzatzaile zuzen moduan,  $T_A$ -rekin eta  $T_I$ -rekin erlazionatuko bakterioen hazkuntza-efizientzian eta komunitatearen konposizioan gertatzen diren aldaketak, tenperaturaren aldaketak gertatu baino lehen antzematen baitira. Beraz, urtarooan zehar gertatutako aldaketak eta

trantsizio-egoera bereziak azaltzen dituzten bestelako faktore batzuk kontuan hartu beharko dira.

Harraparien dentsitateaz gain, nanoflagelatu heterotrofoen eta bakterioen arteko erlazioa ere altuagoa izan zen udan neguan baino. Erlazio hau harraparitza-presioaren adierazlea kontsideratzen den heinean (Gasol, 1994; ikusi **2. Kapitulu**), hiru zelulaz kanpoko entzima-jarduerekin duen korrelazioak, zeinek aldi berean arnasketa espezifikoarekin korrelazionatzen duten, harraparitza-presioa eta bakterioen metabolismoa erlazionatzen duten gertaeren segida bat iradokitzen du. Nanoflagelatu heterotrofo bakteriboroen harraparitzaren emendioak, fitoplanktonak ekoiztutako disolbatutako materia organikoarekin alderatuta kalitate desberdina duen disolbatutako materia organikoaren ekoizpenarekin erlazionatu da (Strom *et al.*, 1997; Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; ikusi **2. Kapitulu**). Fitoplanktonak ekoiztutako materialen degradazioak aurrera doan heinean eta mikroorganismoen prozesatzearen bitartez materia organikoa kualitatiboki aldatu ahala, gainerako materialak degradatzeko zelulaz kanpoko entzima-jardueren adierazpen-maila altua behar dute. Honek, disolbatutako materia organikoa mikroorganismoen biomasan bihurtzeko behar duten energia-eskaria handitzea suposatzen du (Middelboe & Søndergaard, 1993; ikusi **2. Kapitulu**). Udan zehar antzematen den arnasketa espezifikoa altuak (eta ondorengo bakterioen karbono-eskaria altuagoa ere), negukoarekin konparatuz, hau islatzen du. Hala ere, bakterioek modifikatutako disolbatutako materia organikoaren aurrean duten erantzun metaboliko honek, ez du laguntzen trantsizio-egoeretan zehar bakterioen ekoizpenean eta hazkuntza-efizientzian era errepikakorrean gertatzen diren etengabeko jaitsiera nabarmenak azaltzen.

Bakterio-komunitatearen konposizioa CARD-FISH bidez estimatzeak mugatu egin dezake jarduera metaboliko jakin bat bakterio-talde jakin batekin erkatzeko aukera, teknika horren bidez lortutako bereizmen taxonomiko baxua dela eta (Fuchs *et al.*, 1998; Kubota, 2013). Talde taxonomiko handien barruan metabolismo-jarduera oso aldakorra dela suposa dezakegun arren, CARD-FISH

bidezko bakterio-komunitatearen konposizioaren analisiari esker, urtean zehar taxonomia-talde handien domeinuan gertatzen diren aldaketekin bat datozen komunitatearen funtzionamenduren aldaketak detektatu ahal izan dira. Ildo horretan, kostaldeko ur honetan, bi talde ugarienen dominantziaren txandaketa errepikakorra dago, *Bacteroidetes* eta *Alfaproteobacteria*, beste ekosistema batzuetan ikusitakoaren antzekoa (Pinhassi & Hagstrom, 2000; Kan *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008). Alabaina, eta nahiz eta *Bacteroidetes* eta *Alfaproteobacteria* talde taxonomikoki zabalak izan eta beharbada bere konposizio espezifikoa urtean zehar aldatzen duten, bakterio-komunitateak hazkuntza-efizientzia altua eta egonkorra mantentzen du ia urte osoan zehar (udan eta neguan). Hala ere, bakterioen hazkuntza-efizientzian bi jaitsiera zakar gertatzen dira: lehenengoa apirilean *Alfaproteobacteria*-en dominantziazatik *Bacteroidetes*-en dominantziara aldatzerakoan ( $T_A$ ), eta bigarrena irailean *Bacteroidetes*-en dominantziazatik *Alfaproteobacteria*-enera aldatzerakoan ( $T_I$ ).

Hainbat egilek akoplamendu bat ikusi dute fitoplanktonaren loraketaren agerpenaren eta bakterio-komunitatearen konposizioan gertatzen diren aldaketen artean (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; Sintes *et al.*, 2013). Urtean zehar loraketen presentzia adierazten duten bi une hauteman ditugu. Lehenengoan, martxoan *a* klorofilaren maximoa detektatu zen, silikato kontzentrazioen jaitsiera adierazgarriarekin batera, martxotik ( $2,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) apirilera arte ( $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , urte osoko baliorik baxuena), apirileko trantsizio-aldia baino lehen diatomeen loraketa baten garapena gertatu zela iradokiz hain zuzen ere (Sarhou *et al.*, 2005; Wasmund *et al.*, 2013). Calvo-Díaz *et al.*, (2008) ere aurkitu zituzten *a* klorofilaren balio maximoak neguaren amaieran edo udaberriaren hasieran Bizkaiako Golkoaren hegoaldean, tamaina handieneko fitoplanktonarekin erlazioatuta. Bigarren unea, aldiz, *Synechococcus*-en eta *Prochlorococcus*-en uztaileko eta abuztuko (iraileko trantsizioa baino lehen) dentsitate altuengatik bereiztu zen, gainazal tenperatura altuekin, eta nitratoen eta *a* klorofilaren kontzentrazio

baxuekin batera. Hau bat dator Kantauri Itsasoko kostaldean egindako beste ikerketa batzuekin (Agawin *et al.* 2000; Worden, *et al.*, 2004; Morán, 2007; Calvo-Díaz *et al.*, 2008).

Eukariotoen udaberriko loraketa eta fitoplankton prokariotoen udako loraketa ekialdeko Kantauri Itsasoko bakterio-komunitatearen konposizioaren aldakortasunaren bultzatzaile nagusiak izan litezke. Batetik, udaberriaren hasieran askatutako eta batez ere diatomeek ekoiztutako disolbatutako materia organiko berriak ( $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu ratioa  $<1$ , polisakarido konplexuen presentziaren adierazlea (Bhaskar & Bhosle, 2008)), *Bacteroidetes*-en hedapena faboratuko lukete eta bakterio-komunitatearen konposizioaren lehenengo aldaketa bultzatuko luke apirileko trantsizio-aldian. Talde hau hazkuntza azkarreko estrategiekin eta oso materia organiko konplexuaren lehenengo erasoarekin erlazionatu da (Kirchman, 2002; Bauer *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011). Badirudi, *Bacteroidetes* hobeto molda lezaketela materia organiko mota honetara, fitoplanktonaren zelula-hormaren osagai nagusiak eta pisu molekular altuko konposatuen garraiatzaileak diren sulfatatutako polisakaridoen degradazioan espezializatuko zelulaz kanpoko entzima sorta handia espresatzeko ahalmenari esker (Arnosti *et al.*, 2012; Gómez-Pereira *et al.*, 2012; Sarmiento & Gasol, 2012; Teeling *et al.*, 2012). Honek, aldi berean, *Alfaproteobacteria*-en murrizpena ekarriko luke, diatomeek oraintsu ekoiztutako disolbatutako materia organikoa erabiltzeko hornituta ez daudenak. Baina uda amaieran *Prochlorococcus*-ek eta *Synechococcus*-ek irazitzen dituzten substratu oso labilek ( $\alpha$ -Glu /  $\beta$ -Glu ratioa  $>1$  (Bhaskar & Bhosle, 2008)) (Biddanda & Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), bakterio-komunitatearen konposizioaren bigarren aldaketa nagusia eragin dezake iraileko trantsizioan, pisu molekular txikiko konposatuak eta degradazio errazeko loturak modu eraginkorrean asimilatzeke gai diren *Alfaproteobacteria*-en garapena bultzatuz (Teeling *et al.*, 2012).

Ekosistema honetan, udan eta neguan bakterioen dentsitatean, ekoizpenean, karbono-eskarian eta bakterio-komunitatearen konposizioan alde nabarmenak antzematen badira ere, bakterioen hazkuntza-efizientzia antzekoa eta altua



mantentzen da aldi bietan, trantsizio-egoeratan hazkuntza-efizientzia oso baxua dan bitartean. Honek bakterioen hazkuntza-efizientzia komunitateak ingurumen-baldintzetara duen egokitzapen-mailaren arabera dela iradokitzen dute. Ikerketa batzuen arabera, bakterio-komunitate desberdinek arnasketa, ekoizpen eta efizientzia maila desberdinak dituzte (Findlay *et al.* 2003; Fuhrman *et al.*, 2006; Kritzberg *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b); beste batzuek, berriz, konposizioaren eta funtzioaren arteko akoplamendua ahula izan daitekeela adierazten dute (Langenheder *et al.*, 2005; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Gasol *et al.*, 2009; Sjostedt *et al.*, 2012). Comte eta del Giorgiok (2010) bakterio-komunitatearen konposizioaren eta funtzioaren arteko lotura espazioan eta denboran une jakin batzuetan eta ingurumen-baldintza jakin batzuetan baino ezin dela adierazi iradokitzen dute. Gure hipotesia da, bakterioek plastikotasun metaboliko handia dutenez (Meyer *et al.*, 2004; Mou *et al.*, 2008), bakterio-komunitateek beren metabolismoa egokitu dezaketela ingurumen-aldaketa txikietara, konposizioan aldaketa esanguratsurik egin gabe. Hala ere, ingurumen-baldintzek aldaketa adierazgarriak jasaten dutenean, eskatzen diren doikuntza funtzionalak egokitzapen-mailatik kanpo aurkitzen dira. Egoera honetan, eman beharreko egokitzapen-prozesuaren eta segida ekologikoaren ondorioz (*sensu* Koskella & Vos, 2015) komunitatearen konposizioa aldatzen da. Baldintza hauetan, energia-eskaria handituko litzateke eta bakterioen hazkuntza-efizientzia zorrozki murriztu. Beraz, bakterio-komunitate horrek ingurumen-baldintzetara duen egokitzapen-mailak zehaztuko du mineralizatuko den disolbatutako materia organikoaren proportzioa eta goi-maila trofikoetara transferituko dena, eta ez bakterio-komunitatearen konposizioak.

Laburbilduz, gure emaitzek adierazten dute ekialdeko Kantauri Itsasoko mikroorganismo-komunitateak aurrean daitekeen urtean zeharreko ziklo bat jarraitzen dutela. Ziklo hau bi egoera funtzionalki egonkorrek osatzen dute, negua eta uda; mikroorganismoen konposizio desberdina dutenak eta metabolismoaren maila baxuagatik eta altuagatik bereizgarri direnak, hurrenez hurren. Bi egoera hauen arteko trantsizioak apirilean ematen den diatomeek menderatutako

udaberriko loraketak, eta iraileko zianobakterioen loraketak bultzatzen dituzte. Beraz, badirudi itsas-ur hauetako bakterioen jarduera eta konposizioa kontrolatzen duena eskuragarri dagoen disolbatutako materia organikoaren jatorria dela, eta beraz, ezaugarri hauek behetik gora kontrolatzen direla nagusiki; hau da, dauden nutrizio baliabideen arabera. Mikroorganismo-komunitateak trantsizioetako baldintzen aldaketen aurrean garatzen duen moldaketa ez da biomasan, dentsitatean edo plastikotasun fenotipikoan gertatutako aldaketen ondorioa (doikuntza-agertokia), baizik eta komunitatearen konposizioaren aldaketen ondorioa (ordezkapen-agertokia). Badirudi bakterioen hazkuntza-efizientzia ezaugarri oso elastikoa dela, zein trantsizio-ekitaldi laburren ondoren bizkor goi-maila erlatiboki altuetara (~ %30) eta egonkorretara zaharberritzen den, egoera bakoitzean eskuragarri dagoen disolbatutako materia organikora hobeto moldatzen diren mikroorganismo-komunitateko partaideen hautespenaren bitartez.



EZTABAIDA  
OROKORRA



Fitoplanktonak fotosintesiaren bidez egiten duen ekoizpen primarioaren zati handi bat ur-sistemetan materia organiko moduan dago, bakterio heterotrofoentzat ia bakarrik eskuragarri dagoena. Bakterio-komunitate heterotrofoa gai da, halaber, materia organiko hori zuzenean hartzeko molekula txikiez osatuta dagoenean, edo zeharka, zelulaz kanpoko entzimak adierazi ondoren ingurunean dagoen materia organiko partikulatua eskuratzeko. Bakterioek ugartasunean, aniztasunean eta jarduera metabolikoan menderatzen dute ozeanoa. Hau dela eta, bakterioen bidezko materia organikoaren xurgatzea karbono-fluxuaren eragile garrantzitsua da sistema honetan. Bakterio heterotrofoek, neurri handi batean, disolbatutako karbono organikoaren norakoa zehazten dute, bere biomasan txertatu dezaketelako edo mineralizatu eta atmosferara berriro askatu dezaketelako arnasketaren bidez. Bakterioen hazkuntza-efizientzia, biomasa ekoizteko erabiltzen den kontsumitutako karbonoaren zatiki gisa definitzen dena, funtsezko aldagaia da ur-sistemetan bakterio-komunitatearen materia organikoa birmineralizatze gaitasuna ezagutzeko. Bere aldakortasunak karbono-fluxu orokorra alda dezake ur-sistemetan.

Begizta mikrobianoak karbonoaren zikloan duen garrantzi ekologikoa onartu zenetik, ikerketa asko bakterioen hazkuntza-efizientzia zehaztean eta hura arautzen duten faktoreak ezartzen saiatu dira, nahiz eta lortutako datuen aldakortasun handiak parametro hau fidagarritasunez aurreikustea oztopatu egin duen (Giorgio & Cole, 1998). Giorgio-k eta Cole-k (2000) egindako datu-bilketak adierazten du itsas-ekosistema naturalen hazkuntza-efizientiaren balioen tartea oso zabala dela, < % 1etik beherako eta % 60tik gorako balioen artean aldatzen baita, nahiz eta gehienak %5 eta %30 artekoak izan. Bestalde, berrikuspen honetan argi eta garbi adierazten da aldakortasun handia dagoela ekoizpen- eta arnasketa-balioen arteko erlazioan. Beraz, ekoizpen-balio jakin bat bi ordenetarainoko aldagarritasuna duen arnasketa-balioarekin erlazionatu ahal izango litzaiokeela. Bakterioen hazkuntza-efizientzia zehaztearekin lotutako arazo metodologikoek edo estrategia esperimentalaren desberdintasunek behatutako

aldakortasunean lagundu ahal izan dute (Briand *et al.*, 2004; Alonso-Sáez *et al.*, 2007b). Horrela, gaur egun oraindik zaila da bakterioplanktonak eraldatzen duen disolbatutako karbono organikoaren benetako magnitudea iragartzea, eta hori funtsezkoa da ur-ekosistemen ziklo biogeokimikoen funtzionamendua behar bezala ulertzeko. Ildo horretan, tesi honen helburu nagusia bakterioplanktonaren bidez ur-sistemetan karbono-fluxua ulertzen eta aurreikusten laguntzea izan da. Helburu hori betetzeko, lehenik eta behin, sentsibilitate handiko eta inkubazio-aldi laburreko itsaso naturaleko ur-laginetan bakterioplanktonaren arnasketa zehazteko metodologia egokitu zen (**1. Kapitulua**). Ondoren, bakterioen hazkuntza-efizientzia erregulatzen duten faktoreen ezagutzaren bi ikuspegitan sakondu zen: alde batetik, protozoo bakteriboroen harraparitzak bakterio-komunitatearen metabolismoan duen eragina espezifikoki aztertu zen, kostaldeko bi sistema desberdinetako (Kantauri Itsasoko eta Mediterraneo Itsasoko) disolbatutako materia organikoa aldatuz (**2. Kapitulua**); bestalde, Kantauri Itsasoko kostaldeko uretan bakterioen hazkuntza-efizientiaren urteko aldakortasuna aztertu zen lau urtetan zehar, bakterio-komunitatearen metabolismoarekin eta konposizioarekin eta ingurumen-aldagaien multzo zabal batekin batera (**3. Kapitulua**).

Bakterioen hazkuntza-efizientiaren determinazioarekin lotutako arazo nagusietako bat ur-sistema natural batean bakterioen arnasketa neurtzeak berez duen zailtasun metodologikoa da, tesi honen **1. Kapituluan** lantzen dena. Bakterioen arnasketa neurtzeko deskribatu izan diren metodo bakoitzaren abantailak eta desabantailak baloratu ondoren, oxigeno-mikrosentsoreen erabilera optimizatzea erabaki zen, ur-sistemetan komunitate naturalaren arnasketa-neurri zehatzak eta adierazgarriak lortzeko tresna gisa; izan ere, oxigenoaren jaitsieraren bilakaera etengabe monitorizatzea ahalbidetzen dute eta, beraz, dinamiketan aldaketak identifikatzea baimendu ere (Briand *et al.*, 2004). Lortutako emaitzek frogatu zuten inkubazioko 6 orduetatik aurrera bakterio-komunitatea ez dela egonkor mantentzen, ez kopuruan, ez jardueran, ezta konposizioan ere, eta ondorioz, disolbatutako oxigenoaren jaitsiera ez da

lineala inkubazio-aldiak luzeagoak direnean. 12 ordutik gorako inkubazio-aldiak erabiltzeak bakterioen arnasketaren balioa nabarmenki handitzea ekarri zuen (batez beste 3 aldiz handiagoa) 6 ordutik beherako inkubazio-aldiekin lortutako balioekin alderatuta. Eraitza hau esanguratsua da, orain arte bakterioen arnasketa neurtu izan duten lan gehienetan disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa linealki jaisten dela onartu baita (Robinson, 2008), nahiz eta 48 ordutik gorako inkubazio-denborak behar dituzten metodoak erabili. Litekeena da neurri horiek gainestimazio nabarmenak izatea bakterio-komunitate naturalaren arnasketaren balio errealekiko, inkubazioak iraun bitartean alda daitekeelako (Pomeroy *et al.*, 1994; Gattuso *et al.*, 2002). Hau horrela izanda, inkubazio luzeen erabilpena beste egile batzuek behatutako bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasunaren (adibidez, Giorgio & Cole, 1998) eragilea izan daiteke neurri batean.

Inkubazio-denbora ahalik eta laburrenak erabiltzea ezinbestekoa da bakterioen arnasketa-tasa zehatzak lortzeko. Alde horretatik, oxigeno-mikrosentsoreak tresna erabilgarriak dira bakterioen arnasketa modu fidagarrian neurtzeko; izan ere, komunitatearen jardura eta konposizioaren aldaketei lotuta dauden kontsumo-abiaduran aldaketak detektatzeko aukera ematen dute, baita inkubazio-denbora 6 ordutik beherako epeetara nabarmenki murrizteko ere. Gainera, inkubazio-denboraren murrizketa horrek aukera ematen du bakterioen ekoizpena eta arnasketa denbora-tarte berean neurtzeko eta bakterio-komunitate naturalaren hazkuntza-efizientziaren neurri zehatz eta adierazgarriak lortzeko.

Alderdi metodologikoz gain, argi dago bakterioen hazkuntza-efizientziaren balioetan ikusitako aldakortasuna bakterioen malgutasun fisiologikoaren isla izan daitekeela, baita haien prozesu anabolikoen eta katolikoen arteko akoplamendu edo desakoplamendu mailaren isla ere, ziurrenik ingurune natural aldakorraren aurrean haien biziraupena eta hazkuntza optimizatzeko haien hazkuntza-efizientzia moldatzen dutelako (Giorgio & Cole, 2000). Hain zuzen ere, bigarren alderdi horri heltzen zaio tesiaren **2. eta 3. Kapituluetan**. Bakterioen hazkuntza-

efizientziak bakterio-hazkuntzarekin eta bakterio-ekoizpenarekin lotura estua duenez (Giorgio & Cole, 1998), aldagai horietan eragina duten faktoreek bakterioen hazkuntza-efizientzian ere eragina izatea itxarongo litzateke. Egile askok iradokitzen dute bakterioen hazkuntza-efizientzia faktore fisikoek, kimikoek eta biologikoek arautu dezaketela, hala nola tenperaturak (Rivkin & Legendre, 2001; Apple *et al.*, 2006), irradiazioak (Cottrell *et al.*, 2008; Hörtnagl *et al.*, 2011), mantenugaien eskuragarritasunak (Biddanda *et al.*, 2001; Lemée *et al.*, 2002; Pradeep Ram *et al.*, 2003), disolbatutako materia organikoaren kontzentrazioa eta kalitatea (Eiler *et al.*, 2003; Kritzberg *et al.*, 2005; Apple & del Giorgio, 2007; Lee *et al.* 2009), bakterio-komunitatearen egitura eta konposizioa (Comte & del Giorgio, 2011; Warkentin *et al.*, 2011) edo harraparitzaren eta/edo birusen lisiaren ondorioz gertatzen den bakterioen hilkortasuna (Middelboe *et al.*, 1996). Hala ere, orain arte lortutako emaitzak oso aldakorrak izan dira, eta askotan kontraesankorrak, bakterioen hazkuntza-efizientzia nola kontrolatzen duten eta zer faktore dauden zehazterakoan.

Hazkuntza-efizientzia da bakterioen prozesu metaboliko osagarri guztiak hobekien integratzen dituen parametroa: garraioa, mantentzea, hazkuntza, ugalketa (Dawes, 1985). Horrek azaltzen du baldintza zehaztuta hazitako espezie individualen (kultibo puruak) hazkuntza-efizientzia kuantifikatzen duten bakterioen energetikaren inguruan lan ugari egotea (adibidez: Wieser-en (1994) edo Russell-en eta Cook-en (1995) berrikuspenak). Bildutako informazioa erabilgarria den arren, zoritxarrez, ezin zaie komunitate misto naturalei aplikatu. Espezie batek substratu jakin bat erabiltzen duenean duen hazkuntza-efizientziak zerikusi gutxi du bakterioplanktona osatzen duten espezieen nahasketak, biodegradagarritasun-maila desberdinak dituzten substratuen nahasketa konplexu batekin eta hainbat egoera fisiologikotan eta ingurumenekoetan haziz erakusten duenarekin. Gainera, bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasun naturala aztertzean, azterketa gehienek aldakortasun espaziala jorratzen dute, eta denbora-segidaren analisia, berriz, ez dago hain aztertuta (Lemée *et al.*, 2002;



Reinthalder & Herndl, 2005; Eichinger *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Bonilla-Fidji *et al.*, 2010).

**3. Kapituluau** ekialdeko Kantauri Itsaso kostaldeko bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasun naturala lau urtaro-ziklotan zehar aztertu zen. Emaitzek urtaroko ziklo errepikakor bat erakutsi zuten, bi egoera egonkor eta bakterioen hazkuntza-efizientzia handiarekin, negua (urritik martxora) eta uda (maiatzetik abuztura), non talde filogenetiko nagusiak *Alfaproteobacteria* eta *Bacteroidetes* izan ziren, hurrenez hurren. Neguaren eta udaren artean, bi trantsizio-aldi labur identifikatu ziren, apirilean eta irailean, hazkuntza-efizientzia baxukoak, eta non bi talde horiek nagusitasun argirik hauteman ez zuten. Lortutako emaitzek adierazten dutenez, *Alfaproteobacteria* eta *Bacteroidetes* arteko alternantzia materia organiko mota desberdinen erabilerara egokitze gaitasunak eta espezializazio-mailak bultzatu zuten batez ere. Apirileko trantsizioa baino lehen gertatutako fitoplanktonaren loraketan diatomeek nagusiki askatutako materia organiko oso konplexu berriak *Bacteroidetes-en* hedapena erraztu zezakeen, pisu molekular handiko konposatuaren exoenzima eta garraiatzaile sorta zabala adierazteko duen gaitasunari esker (Arnosti *et al.*, 2012; Gómez-Pereira *et al.*, 2012; Sarmiento & Gasol, 2012; Teeling *et al.*, 2012). Era berean, iraileko trantsizioa baino lehen fitoplankton prokariotoaren loraketan substratu oso labilak iraitzen dira (Biddanda & Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), *Alfaproteobacteria-en* areagotzea bultzatuz, degradatzeko errazak eta pisu molekular baxukoak diren konposatuak asimilatzea hobeto egokituta baitaude (Teeling *et al.*, 2012). Emaitza horiek iradokitzen dute bakterioen hazkuntza-efizientzia oso propietate elastikotzat hartu behar dela, eta horrek ekialdeko Kantauri Itsasoko bakterio-komunitatearen konposizioa urtean zehar gertatzen diren ingurumen-aldaketetara zenbateraino egokitzen den islatzen du.

Protozooen jarduera bakteriboroak eta kontsumo selektiboak eragin sakona dute bakterio-komunitatearen egitura fisiologikoan eta taxonomikoan, baita disolbatutako materia organikoaren konposizioan ere (Kujawinski *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2006; Boras *et al.*, 2010). Horregatik, interesgarria da harraparitza-

presio handiko mikroinguruneetan disolbatutako materia organiko eraldatuak bakterio-komunitateen metabolismoan izan zezakeen eragina aztertzea (**2. Kapitula**). Ikerketa hau kostaldeko bi ekosistema oso desberdinetan egin zen, Kantauri Itsasoko hego-ekialdean eta Mediterraneo Itsasoko ipar-mendebaldean. Esperimentuak laborategiko mikrokosmosetan egin ziren manipulazio kontrolatuaren bidez, eta ezaugarri metaboliko garrantzitsuenak neurtu ziren, harrapari-presa kurbako funtsezko une desberdinetatik zetorren disolbatutako materia organikoaren erdia zuten tratamenduetan. Mikroorganismoen jarduerak aldaketak eragin zituen disolbatutako materia organikoaren osaeran, eta horrek aldaketa metaboliko garrantzitsuak eragin zituen bakterio-komunitatetan. Bi ekosistemetan, disolbatutako materia organiko eraldatuaren erabilerak, eta bereziki, protozooen harraparitzak eraldatutako materia organikoaren erabilerak, bakterioen karbono-eskaria areagotzea eta hazkuntza efizientzia murriztea eragin zuen. Hau da, disolbatutako materia organiko eraldatuak bakterioplanktonean berrantolaketa metaboliko bat eragin zuen, zelulaz kanpoko entzima gehiago sortu ahal izateko. Aldaketa metaboliko horiek kostu metabolikoa eragin zuten bakterioentzat eta, horren ondorioz, arnasketa-abiadura handitu egin zen eta bakterioen hazkuntza-efizientzia murriztu. Hala ere, Kantauri Itsasoan, udan *Bacteroidetes* nagusia izanik, zelulaz kanpoko entzimen adierazpenari lotutako energia-kostua txikiagoa izan zen Mediterraneo Itsasoan baino, non udan SAR11 nagusia zen. Disolbatuako materia organiko eraldatu berri bat kontsumitzeak dakarren kostu metabolikoaren maila, beraz, komunitateen berezko propietate bat dela dirudi, zuzenean nagusi diren talde filogenetikoaren plastikotasun funtzionalaren eta egokitzeko gaitasunaren mende dagoena, eta bakterioen hazkuntza-efizientzian islatzen dena.

Ondorioz, tesi honetan oxigeno-mikrosentsoreak egokitu dira itsas-sistema naturaletan bakterioen arnasketa monitorizatzeko. Metodologia hori aplikatuz lortutako emaitzek bakterioen arnasketaren neurri fidagarriak lortzen lagundu dute, baita bakterioen hazkuntza-efizientziaren aldakortasuna hobeto ulertzen ere. Ikerlan honek, ur-sistema baten jardueran eta mikrobio-komunitatearen

konposizioan gertatzen diren aldaketak ingurumen-baldintzen aldakortasunarekin lotzen ditu, denbora-eskala desberdinean gertatzen direnean: epe laburrean, disolbatutako materia organikoaren kantitateak, tamainak, motak eta kalitateak zehazten dute bakterio-komunitatearen ekoizpena, arnasketa eta, ondorioz, hazkuntza-efizientziaren maila. Disolbatutako materia organikoaren osaeran eta/edo degradagarritasunean gertatzen diren aldaketek energia-kostu handiagoa dakarkite bakterio-komunitateari, eta kostu hori aldakorra da konposizio filogenetikoaren eta komunitate horren egokitzeko gaitasunaren arabera. Energia-kostu handiago horrek hazkuntza-efizientzia baxuagoak eragiten ditu epe luzera talde nagusietan, eta baldintza berri horietara hobekien egokitzen diren taldeen hazkuntza bultzatzen du. Behin bakterio-komunitate berria ingurunean dagoen disolbatutako materia organikora erabat egokituta, hazkuntza-efizientzia hasierako mailara itzultzen da. Beraz, hazkuntza-efizientziaren aldakortasuna, ekosistemaren egoera trofikoaren eta bakterio-komunitateek ingurumenean dagoen disolbatutako materia organikoarekiko duten egokitzapen-mailaren menpe egongo da.



ONDORIOAK



1. Ur-sistema naturaletako bakterioen arnasketa zehazterakoan, 12 ordutik gorako inkubazio-aldiak erabiltzeak aldaketa esanguratsuak eragiten ditu bakterio-komunitatearen dentsitatean, tamainan, jardueran eta konposizioan. Alterazio horrek bakterioen arnasketa gainestimatzeko laguntzen du eta, beraz, baita bakterioen hazkuntza-efizientzia gutxiesten ere.
2. Oxigeno-mikrosentsoreek oxigeno-jaitsieraren bilakaera modu jarraian monitorizatzeko aukera ematen dute; horrela, lagin bakoitzeko arnasketa-dinamiken aldaketak banaka identifika daitezke, disolbatutako oxigenoaren kontsumo-abiadura lineala zenbat denboran den mugatu eta, horrela, inkubazio-denbora 6 ordutik beherako aldi batera nabarmenki murriztu. Era honetan, bakterio-komunitate naturalaren arnasketa-neurri eta bakterioen hazkuntza-efizientzia adierazgarriak eta zehatzak lortzen dira.
3. Bakterioen hazkuntzak, baina bereziki protozooen ondorengo hazkuntzak eta harraparitzak, alterazioak eragiten ditu itsasoko disolbatutako materia organikoan, eta horrek aldaketa metaboliko garrantzitsuak eragiten ditu bakterioen komunitatean. Epe laburrean, erantzun metaboliko hori honako honetan datza: energia-kostua dakarren zelulaz kanpoko jarduera entzimatikoa handitzean, bakterio-ekoizpenarekin zerikusirik ez duen karbono-kontsumoa handitzen da eta, ondorioz, bakterioen hazkuntza-efizientzia nabarmenki murrizten da. Badirudi prozesu horien abiadura eta hedapena bakterio-komunitatearen osaerarekin lotuta daudela, eta haren menpe daudela.
4. Ekialdeko Kantauri Itsasoko mikroorganismoen komunitateak aurreikus daitezkeen urteko zikloari jarraitzen dio, funtzionalki egonkorak diren bi egoerez osatuta dagoena: negua (urritik martxora) eta uda (maiatzetik abuztura), metabolismo maila baxuaz eta altuaz karakterizatuta, hurrenez hurren. Bakterioen konposizioari dagokionez, neguan *Alfaproteobacteria* ziren nagusi eta udan, berriz, *Bacteroidetes*.
5. Eskuragarri dagoen materia organiko disolbatuaren jatorria da ekialdeko Kantauri Itsaso kostaldeko bakterio-komunitatearen jarduera eta konposizioa kontrolatzen duen faktore nagusia. Horrela, negu eta uda arteko trantsizioak

apirilean diatomeak nagusi diren udaberriko bloom batetik eta irailean zianobakterioen bloom batetik eratorritako materia organikoaren aldaketek bultzatzen dituzte.

6. Hazkuntza-efizientzia ur-sistemen bakterio-komunitatearen propietate oso elastikoa da. Balio baxuak ditu trantsizio-garaietako ezegonkortasun-uneetan eta bat-bateko ingurumen-aldaketetan, baina azkar lehengoritzen da maila altu samarretara ( $\sim$  % 30) eta egonkorretara, neguko edo udako aldi bakoitzean eskuragarri dagoen disolbatutako materia organikora hoberen egokitzen diren bakterio-komunitateko kideak hautatu ondoren.



**ERREFERENTZIAK**





- 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. & Suárez, 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., Gerdtts, 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.
- Hörtl Nagl, 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. & Gerdtts, 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.





**MATERIAL  
GEHIGARRIA**



**TG.1. Taula gehigarria** Oxigeno-mikrosentsoreen bidez  $\leq 6$  orduko (RB1) eta  $\geq 12$  orduko (RB2) inkubazio-denboretan neurtutako bakterioen arnasketa-balioak, ekialdeko Kantauri Itsasoko gainazalekin bildutako 120 laginetan.

		RB1 ( $\leq 6$ h)		RB2 ( $\geq 12$ h)				RB1 ( $\leq 6$ h)		RB2 ( $\geq 12$ h)				RB1 ( $\leq 6$ h)		RB2 ( $\geq 12$ h)			
Lagin kopurua	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Lagin kopurua	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Lagin kopurua	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Lagin kopurua	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$	Inkubazioa (h)	Arnasketa $\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$
1	2,1	26,8	12,0	33,6	41	3,5	31,8	14,2	43,3	81	6,0	37,4	16,1	75,1					
2	4,9	145,8	12,0	517,0	42	4,3	95,1	14,2	541,5	82	2,0	80,9	16,2	232,2					
3	4,9	206,8	12,0	539,4	43	6,0	18,8	14,2	201,2	83	5,3	24,9	16,7	77,2					
4	5,9	142,8	12,0	188,3	44	4,0	6,9	14,1	18,8	84	2,0	38,9	16,6	199,4					
5	6,0	58,7	12,0	368,9	45	3,0	7,5	14,1	13,4	85	5,0	28,9	16,8	78,7					
6	6,0	17,2	12,0	359,8	46	3,4	2,2	14,1	16,1	86	2,3	59,8	16,8	548,0					
7	5,2	46,4	19,7	693,5	47	3,4	7,1	14,1	25,2	87	5,0	70,4	16,6	80,6					
8	5,2	36,1	20,2	861,7	48	2,4	21,9	14,0	26,8	88	1,1	64,7	16,6	196,0					
9	3,9	36,5	24,0	430,4	49	6,0	41,2	14,6	108,2	89	6,0	57,8	20,1	31,3					
10	5,8	106,4	24,0	704,0	50	6,0	64,8	14,6	155,0	90	6,0	64,0	20,1	83,2					
11	5,4	48,4	20,0	656,7	51	4,0	25,5	12,7	37,6	91	6,0	54,7	20,7	57,8					
12	5,4	312,0	20,0	412,1	52	3,4	28,0	12,7	39,0	92	6,0	6,9	20,7	20,4					
13	3,5	146,3	14,5	527,6	53	6,0	28,9	18,1	40,9	93	4,3	28,6	20,7	441,4					
14	1,6	139,5	14,5	196,0	54	1,5	27,2	19,1	76,3	94	6,0	15,6	20,7	117,7					
15	3,9	109,6	12,0	367,5	55	1,5	61,0	19,1	78,0	95	3,4	58,4	20,7	74,1					
16	3,9	132,2	12,0	366,7	56	1,5	9,0	19,1	65,6	96	4,3	31,3	20,7	93,2					
17	6,0	0,5	12,0	153,7	57	6,0	136,2	18,9	160,6	97	4,1	39,8	16,7	73,4					
18	6,0	65,4	12,0	292,0	58	6,0	137,9	18,9	253,5	98	2,1	133,2	12,0	308,0					
*19	6,0	257,5	12,0	794,1	59	5,8	94,8	18,5	143,6	99	3,6	48,2	16,7	108,2					
*20	6,0	176,2	12,0	1474,4	60	5,8	57,0	18,5	182,0	100	2,4	104,0	12,0	264,6					
**21	6,0	119,3	12,7	283,9	61	2,3	8,8	18,5	77,9	101	6,0	59,1	14,7	139,8					
**22	6,0	63,7	12,7	136,9	62	2,3	63,4	18,1	154,9	102	6,0	72,8	16,7	134,0					
*23	6,0	27,0	12,0	61,3	63	3,9	116,6	18,5	134,8	103	5,1	54,6	16,8	74,5					
*24	6,0	78,7	12,0	138,2	64	3,9	88,0	18,5	150,3	104	5,2	111,5	12,0	321,5					
**25	4,4	343,4	12,0	995,7	65	6,0	70,0	12,7	145,2	105	4,5	170,8	16,6	257,2					
**26	4,4	297,7	12,0	1027,1	66	6,0	85,2	12,7	207,3	106	6,0	193,5	16,6	206,8					
*27	5,0	115,0	12,0	552,2	67	6,0	46,4	13,1	107,1	107	4,9	140,7	12,6	143,8					
*28	5,0	62,3	12,0	518,9	68	4,5	74,2	13,1	170,2	108	4,9	87,4	12,6	93,7					
**29	6,0	71,1	14,3	176,3	69	5,2	25,1	16,6	195,1	109	3,8	59,3	16,6	65,3					
**30	6,0	56,5	14,3	177,6	70	5,2	41,5	16,6	178,4	110	2,4	18,1	16,6	18,1					
*31	6,0	2,6	14,8	34,3	71	1,0	58,2	14,5	132,2	111	6,0	5,0	16,6	21,2					
*32	6,0	6,0	14,8	23,4	72	2,7	101,1	14,5	136,1	112	6,0	46,1	12,0	212,4					
**33	6,0	117,5	12,0	186,7	73	6,0	22,3	17,5	239,1	113	5,8	91,1	17,5	170,5					
**34	2,1	161,1	12,0	298,1	74	3,8	77,6	17,5	349,7	114	5,9	181,8	17,5	235,2					
*35	6,0	79,6	24,0	164,6	75	6,0	21,4	17,4	134,5	115	3,4	92,9	17,4	248,1					
*36	6,0	52,0	24,0	120,3	76	5,2	22,1	17,4	169,5	116	3,4	164,7	17,4	253,6					
**37	6,0	23,8	12,7	63,3	77	6,0	24,0	17,5	194,3	117	5,2	68,9	16,8	245,0					
**38	6,0	68,5	12,7	109,4	78	6,0	12,7	17,5	255,8	118	5,2	129,2	16,8	312,4					
*39	6,0	4,8	24,0	116,3	79	6,0	54,0	17,8	200,0	119	6,0	74,1	16,9	150,3					
*40	6,0	25,5	24,0	59,9	80	3,5	54,9	17,8	280,8	120	6,0	125,8	16,9	195,9					

**TG.2. Taula gehigarria** Spearman rho korrelazio-koefizienteak, aztertutako aldagaien arteko erlazio estatistikoki esanguratsuenak. Arrosaz korrelazio negatiboak eta urdinez positiboak. DKO: disolbatutako karbono organikoa; DMOF<sub>Humik</sub>: disolbatutako material humiko fluoreszentea; DMOF<sub>Prot</sub>: disolbatutako material proteiko fluoreszentea; DMOF<sub>Prot:Humik</sub>: DMOF<sub>Prot</sub> eta DMOF<sub>Humik</sub> arteko ratioa; α-Glu / β-Glu: α- eta β-glukosidasa zelulaz kanpoko entzima-jardueren arteko ratioa; sp: aktibitate espezifikoak. Esangarrtasuna: \* p < 0,05 edo \*\* p < 0,01.

