



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias



# Diversidad de bacterioplancton en relación con los factores ambientales en las aguas superficiales de la costa de A Coruña

Trabajo de Fin de Grado presentado por  
**Tania Montes Morado**  
para optar al Grado en Biología

**2016**

Dirigido por:  
Marta M. Varela Rozados  
M<sup>a</sup> Esther Rodríguez Belmonte



# ÍNDICE

---

<b>Resumen .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>8</b>
3.1. Área de estudio y muestreo	
3.2. Concentración de nutrientes inorgánicos, clorofila-a y radiación fotosintéticamente activa	
3.3. Abundancia de Bacterias mediante Citometría de flujo	
3.4. Abundancia de los principales grupos procariotas mediante CARD-FISH	
3.5. Composición de la comunidad bacteriana mediante NGS-454	
3.6. Análisis estadístico	
<b>4. Resultados .....</b>	<b>11</b>
4.1. Variables ambientales	
4.2. Abundancia bacteriana	
4.3. Determinación de la abundancia de los grupos mayoritarios de Bacteria mediante (CARD)-FISH	
4.4. Composición de la comunidad bacteriana determinada mediante NGS (454 pyrosequencing)	
4.5. Relación entre la composición de la comunidad bacteriana y las variables ambientales	
<b>5. Discusión .....</b>	<b>18</b>
5.1. Distribución vertical de la abundancia y diversidad del plancton bacteriano	
5.2. Estructura de la comunidad bacteriana en función de las variables ambientales	
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>22</b>



# RESUMEN

---

La variabilidad espacial y temporal del bacterioplancton está relacionada con diversos factores tanto bióticos como abióticos. En este trabajo se estudió la estructura y composición de las comunidades bacterianas a lo largo de una sección perpendicular a la costa de A Coruña (43°N, 8°W) durante la campaña Hercules III (Julio 2012). Se estudiaron dos zonas de la columna de agua: la superficie (SUP, 0-30 m) y el máximo de clorofila (DCM [depth chlorophyll maximum], 30-100 m), con el objetivo de estudiar su relación con las variables medioambientales medidas en la columna de agua. La abundancia y composición bacteriana se determinó mediante citometría de flujo, hibridación fluorescente *in situ* (CARD-FISH), y el análisis de pirosecuenciación de la región HTS del 16S rRNA. *Proteobacteria* fue el filum más abundante a lo largo de la columna de agua, dominando *Alphaproteobacteria* en superficie y *Gammaproteobacteria* en el DCM. Mientras que la comunidad de la superficie estuvo compuesta por bacterias de la familia *Flavobacteriaceae* (filum *Bacteroidetes*) y el cluster SAR11 (*Alphaproteobacteria*), en el DCM dominaron la familia *Ocenospirillales* (*Gammaproteobacteria*) representada por el cluster SAR86. El análisis de escalamiento multidimensional nMDS mostró una correlación entre las variables ambientales estudiadas y los filos taxonómicos con la estructura de la composición de las comunidades bacterianas, indicando que existen diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de superficie y el máximo de clorofila. Mientras que la temperatura y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) determinan la diversidad bacteriana de superficie, en el DCM estos cambios estuvieron significativamente correlacionados con la salinidad, la concentración de clorofila a y de nutrientes inorgánicos. Nuestro estudio concluye que existe una clara estratificación vertical en la composición de las comunidades bacterianas, que se correlacionó significativamente con las variables ambientales medidas en la costa de A Coruña.

## SUMMARY

Spatial and temporal variability of bacterioplankton are related to several biotic and abiotic factors. In this work, the structure and composition of bacterial along a line perpendicular to the coast of A Coruña communities section (43 ° N, 8 ° W) were studied during the Hercules III campaign (July 2012). Two areas of the water column were studied: the surface (SUP, 0-30 m) and chlorophyll maximum (DCM [chlorophyll maximum depth], 30-100 m), in order to study its relation to environmental variables measured in the water column. Bacterial abundance and composition was determined by flow cytometry, fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH), and pyrosequencing analysis of 16S rRNA region HTS. *Proteobacteria* was the most abundant phylum throughout the water column, dominating *Alphaproteobacteria* in the surface and *Gammaproteobacteria* in DCM. While the surface community was composed of bacteria *Flavobacteriaceae* family (phylum *Bacteroidetes*) and SAR11 cluster (*Alphaproteobacteria*), in DCM dominated *Ocenospirillales* family (*Gammaproteobacteria*) represented by the SAR86 cluster. The nMDS multidimensional scaling analysis showed a correlation between environmental variables and taxonomic phyla with the structure of the composition of bacterial communities, indicating that there are significant differences between the surface and chlorophyll maximum bacterial communities. While temperature and photosynthetically active radiation (PAR) determine the surface bacterial diversity, in DCM these changes were significantly correlated with salinity, chlorophyll a and inorganic nutrients. Our study concludes that there is a clear vertical stratification in the composition of bacterial communities, which were significantly correlated with environmental variables measured on the coast of A Coruña.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

El bacterioplancton juega un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas marinos debido a su enorme contribución en abundancia, biomasa y diversidad, siendo además el principal mediador de los ciclos biogeoquímicos. Tanto la abundancia como la actividad bacteriana disminuyen con la profundidad (Valencia *et al.* 2003, Teira *et al.* 2003). Este patrón está determinado por la variabilidad vertical en las condiciones físicas y químicas de los ecosistemas pelágicos, lo cual contribuye también a la estratificación vertical de la composición de las comunidades bacterianas.

El estudio de la composición de las comunidades bacterianas mediante técnicas moleculares basadas en ADN puede ser abordado por diferentes aproximaciones, dependiendo de la finalidad del estudio. Los métodos de huella genética (e.g. ARISA) han resultado ser un instrumento muy útil para describir la estructura de la comunidad procariota en la columna de agua (Yokokawa *et al.* 2010, Lekunberri *et al.* 2015). Además, mediante la técnica de CARD-FISH se han identificado y cuantificado los taxones bacterianos más abundantes, encontrándose que una fracción considerable de los taxones bacterianos está presente en toda la columna de agua, aunque la contribución en abundancia varía con la profundidad (Mary *et al.* 2006, Alonso-Sáez *et al.* 2007, Varela *et al.* 2008). Recientemente, se han comenzado a usar las técnicas de “Next Generation Sequencing, NGS” aplicadas al estudio de la genómica de los microorganismos marinos, que permiten obtener un gran número de lecturas de ADN a través de la secuenciación masiva de regiones hipervariables del gen 16S del ARNr, proporcionando una mayor resolución taxonómica. Gracias al uso de esta plataforma, se ha encontrado que la variación de la composición de las comunidades microbianas no sólo se atribuye a los taxones más abundantes, sino también a variaciones de aquellos filotipos menos abundantes (“biosfera rara”) (Alonso-Sáez *et al.* 2015). Agogué *et al.* (2011), mediante estudios de secuenciación por técnicas de NGS realizados en el Atlántico norte, comprobaron que las OTUs de menor abundancia, como *Gemmatimonadetes*, presentan una mayor especificidad por determinadas profundidades que las OTUs más abundante, y que, por tanto, eran también responsables de las variaciones verticales en la composición filogenética de la comunidad bacteriana.

Las características físico-químicas del medio pelágico controlan la distribución de abundancia y composición de las comunidades bacterianas. Un estudio reciente ha encontrado que las variables físico-químicas (temperatura, salinidad) están correlacionadas con la variación en la abundancia y diversidad de las comunidades bacterianas (Furhman *et al.* 2015). Existen antecedentes que indican que las bacterias y el fitoplancton compiten por los nutrientes inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo en aguas marinas (Joint *et al.* 2002, Lovdal *et al.* 2008), y al mismo tiempo, la liberación de materia orgánica por parte del fitoplancton estimula la incorporación de compuestos carbonados por parte de las comunidades bacterianas heterótrofas (Martinez-García *et al.* 2010).

La costa de Galicia posee un alto grado de hidrodinamismo, lo que se traduce en una elevada variabilidad en la estructura y funcionamiento de de las comunidad microplantónica (Cermeño *et al.* 2006). Durante los eventos estacionales de afloramiento entre los meses de Abril y Septiembre la advención de agua rica en nutrientes es la responsable de la elevada productividad de este ecosistema. Los pulsos de afloramiento van seguidos de periodos de relajación, durante los cuales se estratifica la columna de agua y disminuyen los nutrientes inorgánicos en la capa fótica. A pesar de que existe un avanzado conocimiento de la variabilidad de las condiciones oceanográficas y las variables biogeoquímicas (Alvarez-Salgado

*et al.* 2009, Bode *et al.* 2004), así como de la abundancia y diversidad del fitoplancton (Varela *et al.* 2008, Bode *et al.* 2011 ), no existen estudios sobre la variabilidad de la diversidad bacteriana y su relación con las variables bióticas como el fitoplancton (Sapp *et al.* 2007, Gilbert *et al.* 2009) y abióticas como la temperatura y la concentración de nutrientes inorgánicos (principalmente nitrógeno y fósforo).

## 2. OBJETIVOS

---

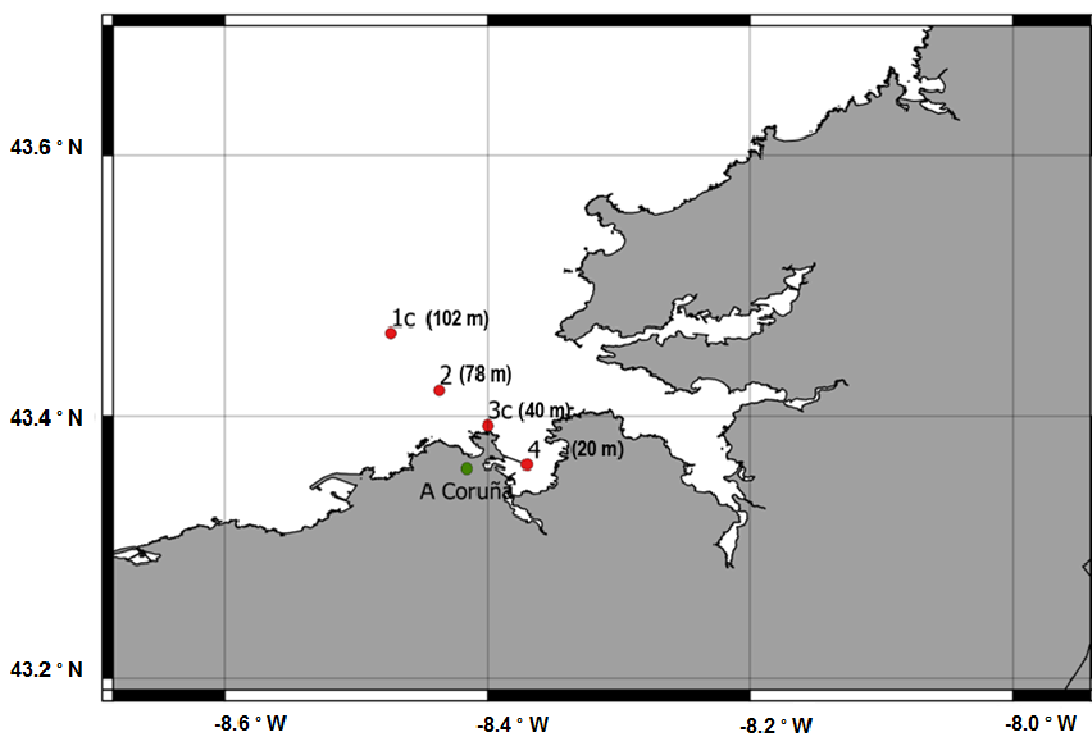
- Determinar la abundancia y diversidad de las bacterias marinas en la costa de A Coruña durante la campaña Hércules III (Julio 2012).
- Analizar la relación entre la diversidad bacteriana y las variables medioambientales de la zona de estudio.



# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

## 3.1. Área de estudio y muestreo

Las muestras objeto de estudio en este trabajo se recogieron durante la campaña oceanográfica HÉRCULES III llevada a cabo a bordo del B/O Lura (Instituto Español de Oceanografía) el 16, 17, 18 y 20 de Julio de 2012. Las estaciones muestreadas se localizaron a lo largo de una sección perpendicular a la costa de A Coruña (Figura 1). En cada una de las estaciones se realizaron perfiles verticales con una sonda CTD (*Conductivity, Temperature and Depth*) acoplada a una roseta oceanográfica equipada con botellas tipo Niskin, hasta una profundidad máxima de 100 m. Se recogieron muestras de agua a dos profundidades diferentes (SUP, superficie y DCM, “depth chlorophyll maximum” [máximo de clorofila]) para la determinación de la concentración de nutrientes inorgánicos, concentración de clorofila y abundancia y diversidad bacteriana.



**Figura 1.** Mapa de situación del área de estudio de la campaña oceanográfica HÉRCULES III y localización de las estaciones en la sección de A Coruña. Los números entre paréntesis indican la profundidad de cada estación.

### **3.2. Concentración de nutrientes inorgánicos, clorofila-a y radiación fotosintéticamente activa**

Para la determinación de nutrientes inorgánicos (nitrato + nitrito, fosfato y silicato) se tomaron muestras de agua de cada profundidad en botellas de polietileno y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por métodos colorimétricos estándar con un analizador de flujo segmentado Bran-Luebbe (Hansen and Grasshoff, 1983).

Para la determinación de la concentración de clorofila-a en cada profundidad se filtraron 250 ml de agua de mar a través de filtros GF/F. Los filtros se introdujeron en viales de vidrio con 10 ml de acetona al 90% y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12 h para la extracción de los pigmentos fotosintéticos. La determinación de la concentración de clorofila-a se realizó usando un fluorómetro Turner 10-AU previamente calibrado mediante la utilización de patrones de clorofila-a comerciales.

Para las mediciones de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) en la columna de agua se usó un sensor Li-Cor sumergible adosado a un medidor digital portátil.

### **3.3. Abundancia de Bacterias mediante Citometría de flujo**

La abundancia total de procariotas se determinó por citometría de flujo siguiendo los protocolos de Gasol *et al.* (1999). A bordo se recogieron muestras de 2 mL que se fijaron con paraformaldehído y glutaraldehído (2-4%), se congelaron en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. En el laboratorio en tierra las muestras se procesaron a temperatura ambiente tiñéndolas con Syto 13 en oscuridad durante 10 minutos. A continuación, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de beads (aproximadamente  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) como control interno. Los organismos procariotas se contaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) de acuerdo con las características de luz transmitida y dispersada, al paso de las células, y la fluorescencia verde.

### **3.4. Abundancia de los principales grupos procariotas mediante CARD-FISH**

En todas las estaciones se recogieron muestras de 10-20 mL, se fijaron con formaldehído (2-4%) y se incubaron en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12-18 horas. Transcurrido este período, las muestras se filtraron a través de filtros de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore GTTP, 25 mm de diámetro), aclarando el exceso de formaldehído con dos lavados de 10 mL de agua Milli-Q. Posteriormente, los filtros se guardaron en viales eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis en el laboratorio. La determinación *in situ* de la abundancia de los principales grupos bacterianos mediante CARD-FISH se realizó siguiendo el protocolo descrito por Teira *et al.* (2004). Los filtros se cortaron en secciones para la hibridación con sondas de oligonucleótidos Eub338I-III (Bacterias totales) (Daims *et al.* 1999) y Non338 (control negativo) (Wallner *et al.* 1993), así como sondas de grupos específicos de bacterias: Gam42a (*Gammaproteobacteria*) (Manz *et al.* 1992), CF319a (*Bacteroidetes*) (Manz *et al.* 1996), Ros537 (*Roseobacteria*) (Eilers *et al.* 2001), SAR11-732 (Morris *et al.* 2002) y SAR86-1249 (Eilers *et al.* 2000). La hibridación se realizó a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 12-15 horas. Para la amplificación se usó PBS-T-Mix. Para la enumeración de los distintos grupos de células se llevó a cabo una tinción con DAPI-Mix [4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, concentración 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), solución tampón fosfato (PBS, 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Vectashield (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Citifluor (5.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )]. Los contajes se llevaron a cabo con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i), equipado con una lámpara de mercurio (100 W) y un set de filtros apropiados para DAPI, Cy3 y Alexa488. Para cada muestra se contaron al menos 20 campos (lo que equivale a  $\approx 300$  células).

### 3.5. Composición de la comunidad bacteriana mediante NGS-454

La biomasa microbiana se concentró por filtración de 6 L de agua a través de un filtro de Sterivex de 0.2  $\mu\text{m}$  (Durapore, Millipore) usando una bomba peristáltica. El Sterivex de 0.2  $\mu\text{m}$  se llenó con 1.8 mL de solución amortiguadora de lisis (Lysis buffer: 50mM Tris, 40mM EDTA y 0.75 M Sacarosa) para almacenarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Las extracciones de ADN se realizaron usando PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO). La región HTS del 16S rRNA de bacterias fue amplificada mediante PCR utilizando los primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') y los amplicones se pirosecuenciaron usando un secuenciador 454 Life Sciences GS-FLX en el Research and Testing Laboratory, Texas, USA (<http://www.researchandtesting.com/>). Para el análisis de las secuencias se usó MACQUIME (<http://qiime.org>) (Caporaso *et al.* 2010). Para minimizar los errores de secuenciación se realizó un algoritmo de eliminación y se descartaron las secuencias de baja calidad. Así mismo, los barcodes, primers y las secuencias quimera se eliminaron usando MACQUIME. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) basándose en un 97% de límite de similitud (equivalente a 0.03 de distancia límite) con el fin de evaluar los posibles errores de secuenciación y/o PCR que pudieran ocurrir durante la amplificación y/o la pirosecuenciación.

### 3.6. Análisis Estadístico

Los patrones de similitud entre muestras en base a la composición de OTUs bacterianos (estructura de la comunidad) se determinaron mediante un análisis jerárquico de grupos (CLUSTER, Hierarchical Cluster Analysis) a partir de una matriz de similitud usando el criterio de Bray-Curtis. Las diferencias significativas de la comunidad de bacterioplancton entre las diferentes muestras se determinaron mediante un análisis permutacional de varianza (PERMANOVA, permutational multivariate analysis of variance). Para correlacionar las variables ambientales con la estructura de la comunidad bacteriana se calculó el coeficiente de correlación de Spearman, y se representó mediante un gráfico de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS, non metric multidimensional scaling). Las variables ambientales correlacionadas mediante este análisis fueron temperatura (T,  $^{\circ}\text{C}$ ), salinidad (Sal), concentración de clorofila-a (Cla,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), radiación fotosintéticamente activa (PAR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y concentración de nutrientes inorgánicos (nitrato + nitrito, fosfato y silicato;  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). La matriz de similitud de variables ambientales se obtuvo empleando el criterio de similitud de distancia Euclídea. En el procesamiento de datos se utilizaron el software PRIMER v.6.1 (Clarke *et al.* 2006) y PERMANOVA+ for PRIMER (Anderson *et al.* 2008).

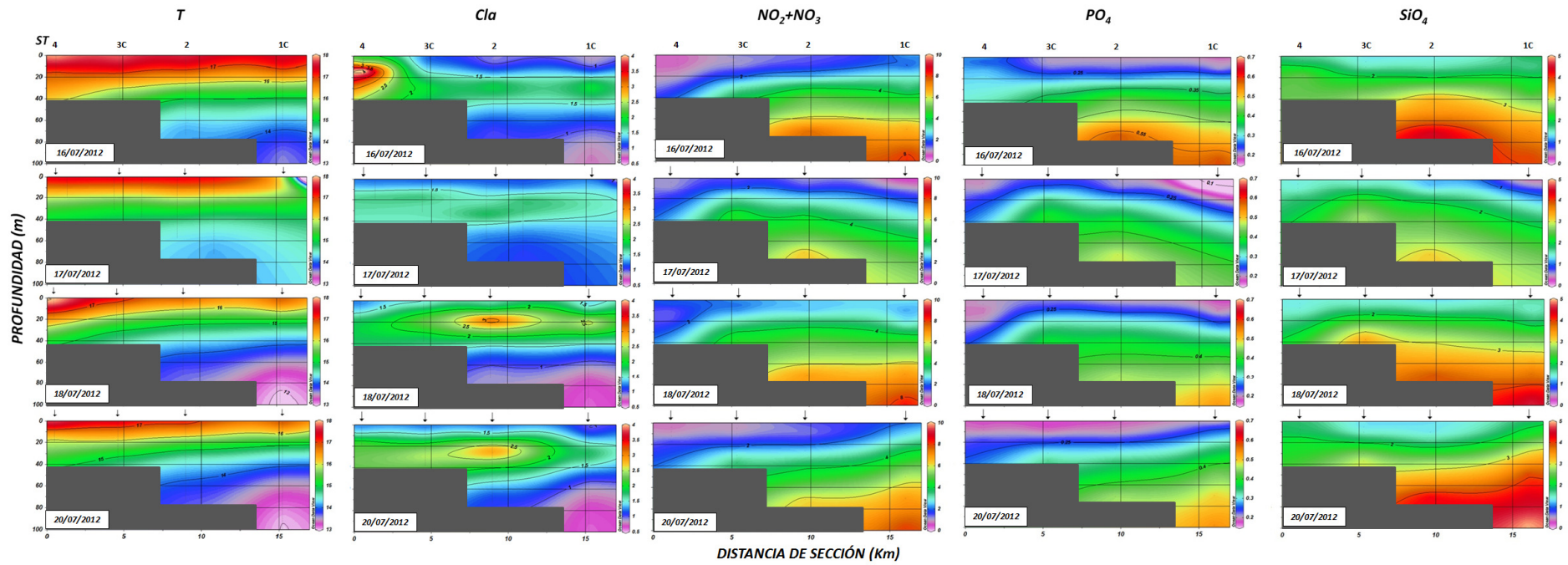
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Variables ambientales

Los datos obtenidos en el transecto realizado en la costa de A Coruña mostraron que durante la campaña Hércules se muestrearon condiciones de estratificación térmica típica de la época estival (Figura 2, Tabla 1). Como consecuencia de la fuerte estratificación, la distribución de clorofila mostró la existencia de un máximo subsuperficial. A excepción de la concentración de nitrato que se incrementó a medida que nos alejamos de la costa, no se observaron diferencias significativas entre estaciones en cuanto a las condiciones hidrográficas, concentración de nutrientes inorgánicos y biomasa de fitoplancton (Tukey-Kramer, ANOVA,  $p > 0.05$ ). Como consecuencia de la fuerte estratificación, en superficie se observaron valores más altos de temperatura, mientras que el máximo profundo de clorofila se caracterizó por valores más elevados de salinidad y concentración de nutrientes inorgánicos. Como consecuencia de la extinción exponencial que sufre la radiación solar en el medio acuático, las muestras de superficie estuvieron asociadas a valores más altos de radiación PAR.

**Tabla 1.** Características físicas y químicas de la superficie (SUP) y el máximo profundo de clorofila (DCM) del transecto realizado en la costa de A Coruña. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. St: estación; Prof: profundidad; T: temperatura; Sal: salinidad; Cla: concentración de Clorofila-a; PAR: radiación fotosintéticamente activa;  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ : concentración de nitrato + nitrito;  $\text{PO}_4$ : concentración de fosfato;  $\text{SiO}_4$ : concentración de silicato.

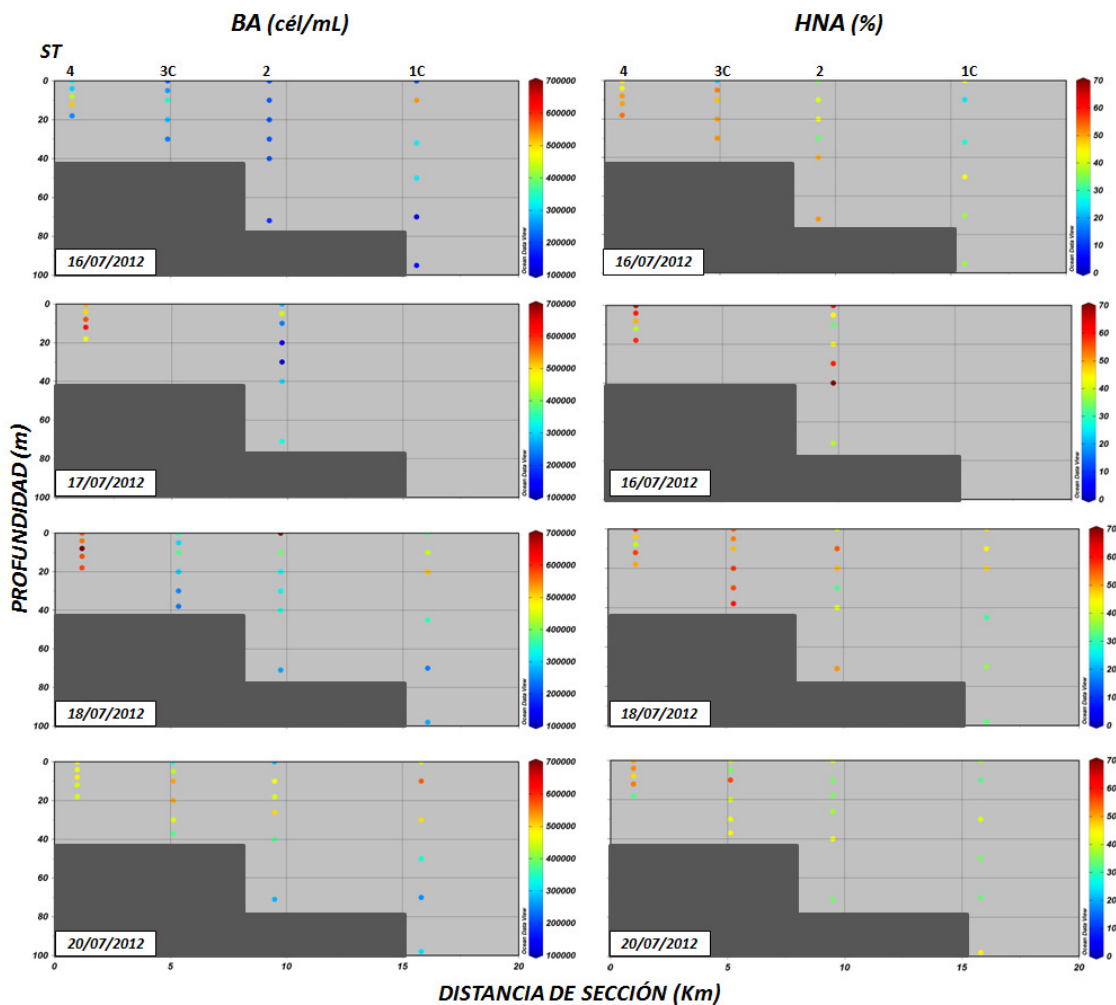
ST	PROF	T ° C	Sal	Cla $\mu\text{g L}^{-1}$	PAR $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{PO}_4$ $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{SiO}_4$ $\mu\text{mol L}^{-1}$
4	SUP	18,3 $\pm$ 0,4	33,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,3	229,1 $\pm$ 53,2	0,8 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,4
	DCM	15,9 $\pm$ 0,9	35,7 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 1,2	51,1 $\pm$ 21,8	1,5 $\pm$ 2,1	0,3 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,5
3C	SUP	17,5 $\pm$ 0,4	34,1 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,3	244,8 $\pm$ 53,2	1,0 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,4
	DCM	14,8 $\pm$ 0,9	35,8 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 21,8	4,8 $\pm$ 2,1	0,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,5
2	SUP	17,4 $\pm$ 0,4	33,8 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,3	178,5 $\pm$ 53,2	1,1 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,4
	DCM	14,4 $\pm$ 0,9	35,8 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 1,2	6,4 $\pm$ 21,8	5,7 $\pm$ 2,1	0,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,5
1C	SUP	17,6 $\pm$ 0,4	32,0 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,3	127,3 $\pm$ 53,2	2,2 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,4
	DCM	13,8 $\pm$ 0,9	35,8 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 1,2	4,5 $\pm$ 21,8	6,2 $\pm$ 2,1	0,5 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,5



**Figura 2.** Evolución de las variables físicas, químicas y biológicas en el transecto muestreado en la costa de A Coruña durante la campaña oceanográfica Hércules III. T: Temperatura; Cla: Clorofila-a, NO<sub>2</sub>+ NO<sub>3</sub>: nitrato + nitrito; PO<sub>4</sub>: fosfato; SO<sub>4</sub>: silicato.

## 4.2. Abundancia bacteriana

Para las cuatro estaciones se estimaron la abundancia bacteriana (BA,  $\text{cél mL}^{-1}$ ) y el porcentaje de bacterias de alto contenido en ADN (HNA) (Figura 3). La abundancia de bacterias presentó un patrón muy similar en todas las estaciones muestreadas, con valores máximos en superficie ( $2.05\text{-}6.92 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$ ) y disminuyendo con la profundidad hasta valores de  $1.29\text{-}5.82 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$ . El porcentaje de bacterias de alto contenido en ADN presentó una distribución similar, con valores más elevados en la superficie (66 -21 %) que en el máximo de clorofila (57 -27 %). Generalmente, la abundancia bacteriana fue más elevada en la estación 4, más próxima a la costa, particularmente en el muestreo de los días 17/07/2012 y 18/07/2012 y disminuía progresivamente hacia la estación más oceánica (St. 1C). Aunque estas diferencias entre estaciones no son significativas (Tukey-Kramer, ANOVA,  $p > 0.05$ ), si existen diferencias en función de la profundidad tanto en la abundancia bacteriana como el porcentaje de células de alto contenido en ADN (Tukey-Kramer, ANOVA,  $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Abundancia bacteriana ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) y bacterias de alto contenido en ADN (%) en el transecto de la costa de A Coruña muestreado durante la campaña Hércules III. La figura fue generada con el software ODV (Ocean Data View).

### 4.3. Determinación de la abundancia de los grupos mayoritarios de Bacteria mediante (CARD)-FISH

Con el fin de determinar la contribución relativa de los grupos más abundantes de bacterias, se usaron sondas para cuantificar grupos específicos de bacterias mediante la técnica de CARD-FISH. La abundancia relativa de Eubacterias con respecto al total de procariontas presentó valores similares en superficie y en el DCM. El porcentaje de recuperación osciló entre un 72% en superficie y un 70% en DCM. El cluster SAR11 (*Alphaproteobacteria*) y *Bacterioidetes* fueron los grupos que presentaron, en promedio, una mayor abundancia relativa. No se encontraron diferencias significativas entre estaciones ni entre profundidades en la abundancia para ninguno de estos 5 grupos mayoritarios (Tukey-Kramer, ANOVA,  $p > 0.05$ ).

**Tabla 2.** Porcentaje de abundancia relativa (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los principales grupos de bacterias en el transecto de la costa de A Coruña muestreado durante la campaña Hércules III. St: estación; Prof: profundidad; Gamma: *Gamma*proteobacteria.

ST	PROF	(% DAPI)		(% EUBACTERIAS)				
		EUBACTERIA	SAR-11	SAR-86	BACTERIOIDES	ROSEOBACTER	GAMMA	
4	SUP	72,4 $\pm$ 1,6	29,5 $\pm$ 3,1	14,0 $\pm$ 2,0	34,9 $\pm$ 3,5	18,0 $\pm$ 2,4	23,1 $\pm$ 3,4	
	DCM	74,8 $\pm$ 3,2	31,1 $\pm$ 4,5	13,8 $\pm$ 3,0	29,2 $\pm$ 3,9	14,2 $\pm$ 4,4	21,2 $\pm$ 4,6	
3C	SUP	72,9 $\pm$ 1,6	29,7 $\pm$ 3,1	9,4 $\pm$ 2,0	27,9 $\pm$ 3,5	13,4 $\pm$ 2,4	22,4 $\pm$ 3,4	
	DCM	69,0 $\pm$ 3,2	21,9 $\pm$ 4,5	9,1 $\pm$ 3,0	27,4 $\pm$ 3,9	12,3 $\pm$ 4,4	23,8 $\pm$ 4,6	
2	SUP	69,6 $\pm$ 1,6	31,8 $\pm$ 3,1	13,1 $\pm$ 2,0	34,8 $\pm$ 3,5	15,4 $\pm$ 2,4	29,7 $\pm$ 3,4	
	DCM	67,5 $\pm$ 3,2	31,3 $\pm$ 4,5	14,9 $\pm$ 3,0	35,9 $\pm$ 3,9	22,4 $\pm$ 4,4	29,9 $\pm$ 4,6	
1C	SUP	73,0 $\pm$ 1,6	24,6 $\pm$ 3,1	11,3 $\pm$ 2,0	30,2 $\pm$ 3,5	18,6 $\pm$ 2,4	26,1 $\pm$ 3,4	
	DCM	69,4 $\pm$ 3,2	26,3 $\pm$ 4,5	9,5 $\pm$ 3,0	28,5 $\pm$ 3,9	16,0 $\pm$ 4,4	19,2 $\pm$ 4,6	

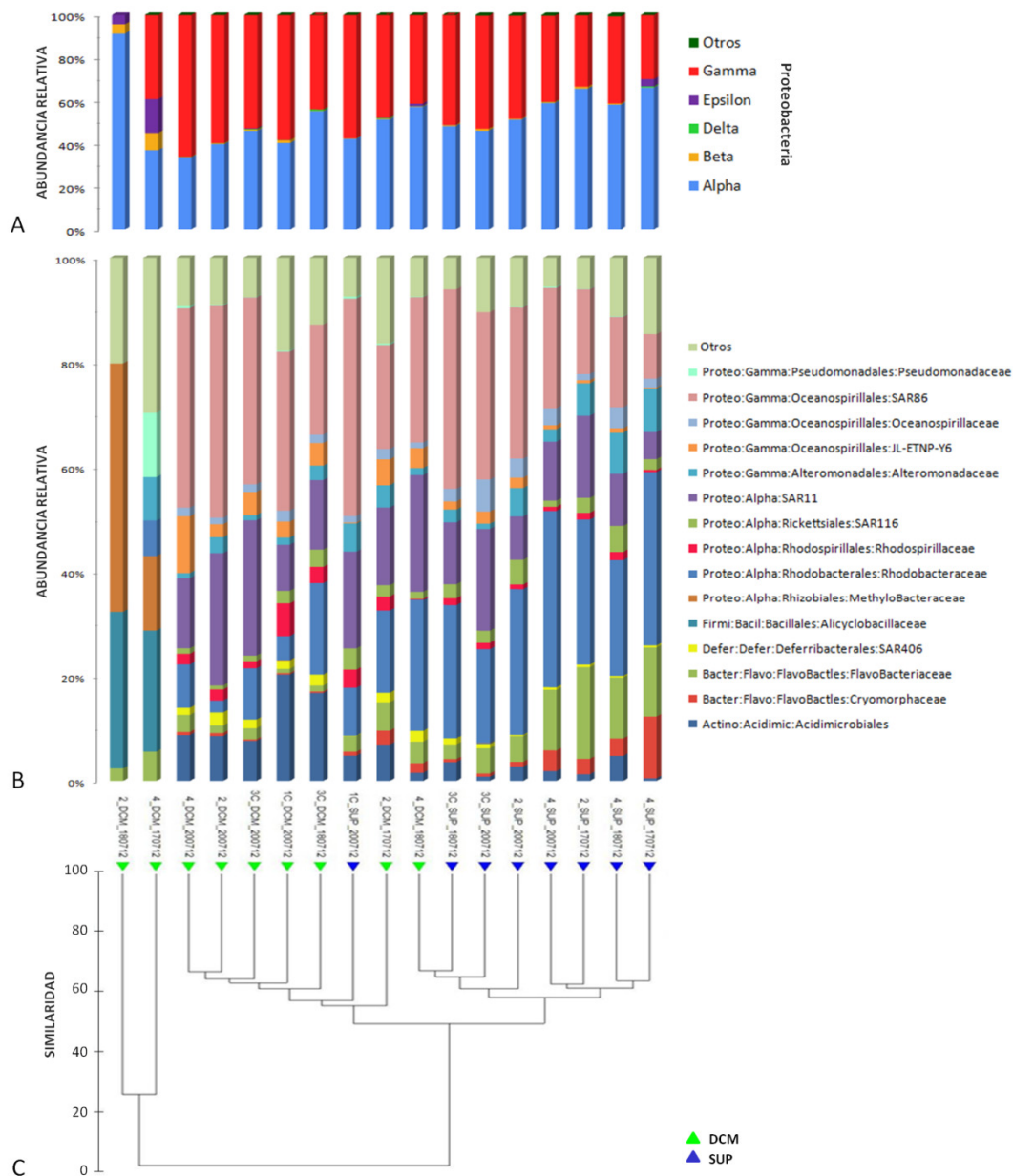
\*El clado denominado *Roseobacter* pertenece a la familia *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*).

### 4.4. Composición de la comunidad bacteriana determinada mediante NGS (454 pyrosequencing)

El número total de secuencias obtenidas mediante el análisis de pirosecuenciación de la región HTS del 16S rRNA fue 71243. Después de eliminar las secuencias quimera y omitir las secuencias de baja calidad, el número de secuencias obtenidas se redujo a 63828. Lo que se tradujo en 554 OTUs diferentes obtenidas. Para cada una de las secuencias filogenéticas se estudió la abundancia relativa a diferentes niveles taxonómicos (filum, clase, orden, familia y especie). El análisis de clasificación de las secuencias de bacterias presentado incluye hasta el nivel de familia en la mayoría de los casos (Figura 4B). *Proteobacteria* fue el filum más abundante en todas las muestras, variando entre un 84% en superficie y 77% en DCM. *Bacterioidetes* constituye el segundo filum mayoritario, cuya contribución a la abundancia bacteriana disminuye con la profundidad (13% en SUP y 4% en DCM). *Actinobacteria*, sin embargo, contribuye más a la abundancia en DCM (10%) que en superficie (3%). La abundancia relativa de *Firmicutes* aumenta considerablemente con la profundidad, presentando valores  $< 1\%$  en superficie y  $\approx 10\%$  en DCM. Lo mismo sucede con el filum *Deferribacteres* ( $< 1\%$  SUP y 2% DCM). Los filum menos abundantes fueron *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Verrumicrobia*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Planctomycetes*, *Tenericutes* y *Gemmatimonadetes* cuya abundancia relativa fue  $\approx 1\%$ . Así mismo, hubo un porcentaje de secuencias que no fueron asociadas a ningún grupo taxonómico específico y representan un 0,03% de la abundancia bacteriana total.

Dentro del filum de *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* son los grupos dominantes contribuyendo un 33% y un 30% respectivamente, a la abundancia total de *Proteobacteria* (Figura 4C). *Alphaproteobacteria* está compuesto mayormente por el cluster SAR11 (13%) y la familia *Rhodobacteraceae* (17%), mientras que la familia mayoritaria dentro de las *Gammaproteobacterias* es *Oceanospirillales*, y dentro de esta destaca el cluster SAR86 con una abundancia relativa de 25% (Figura 4B). Los grupos más abundantes en superficie fueron el cluster SAR11 (15%), *Rhodobacteraceae* (25%), *Flavobacteriaceae* (9%), el cluster SAR86 (23%) y la familia *Alteromanecidae* (5%), mientras que en DCM dominan el cluster SAR86 (27%), el cluster SAR11 (12%), *Methylobacteraceae* (8%), *Alicyclobacillaceae* (6%) y la familia *Acidimicrobiales* (6%). La similitud entre muestras empleando la medida de distancia de Bray-Curtis, mostró un agrupamiento entre muestras por la profundidad, mientras que no se encontró agrupamiento entre las diferentes estaciones y/o días muestreados (Figura 4A). Con más de un 50% de similitud, el primer cluster agrupa las muestras pertenecientes a la superficie, y el segundo cluster incluye las del DCM (Tukey-Kramer, ANOVA,  $p < 0.05$ ).



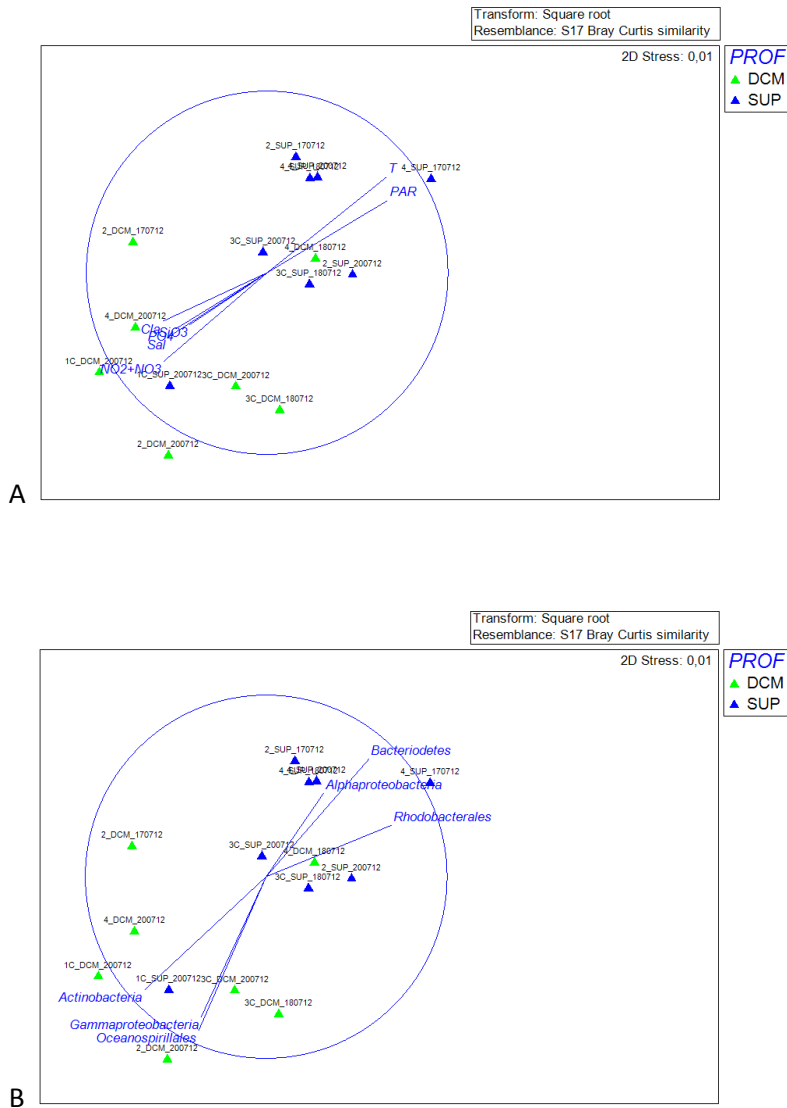


**Figura 4.** Comparación de la diversidad bacteriana entre las diferentes muestras recogidas en la costa de A Coruña durante la campaña HERCULES III. (A) Gráfico acumulado de columnas mostrando la diversidad de *Proteobacteria*. (B) Gráfico acumulado de columnas mostrando la distribución relativa de los filum dominantes en las diferentes muestras. Dentro de Otros se engloban los grupos cuya abundancia fue < 1%. (C) Similitud medida con el índice de Bray-Curtis entre diversidad bacteriana de superficie (SUP) y máximo de clorofila (DCM).

#### 4.5. Relación entre la composición de la comunidad bacteriana y las variables ambientales

Con el fin de determinar el papel de las variables ambientales en la composición de las comunidades bacterianas realizamos un análisis de correlación de Spearman (Figura 5). Dicha correlación se usó tanto para mostrar la relación entre las diferentes variables ambientales (Figura 5A) y diferentes filum (Figura 5B) con la abundancia relativa de las OTUs bacterianas. Según los resultados de este análisis, la composición de las comunidades bacterianas de superficie se relacionó de forma significativa con las condiciones ambientales de la capa

superficial (elevada temperatura y radiación PAR), mientras que las muestras de profundidad se correlacionaron con condiciones de elevada salinidad, concentración de nutrientes inorgánicos y biomasa de fitoplancton. En cuanto a la presencia de grupos filogenéticos, la estructura de las comunidades bacterianas de superficie se correlacionó significativamente con la presencia de *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria* y *Rhodobacterales*, mientras que en el máximo profundo de clorofila se observaron correlaciones significativas con *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Oceanospirillales*.



**Figura 5.** Análisis nMDS mostrando la correlación entre las diferentes variables ambientales (A) y filios taxonómicos (B) con la abundancia relativa de OTUs bacterianos en las distintas muestras. El incremento de la distancia entre puntos equivale a un descenso en la similitud de las muestras.

# 5. DISCUSIÓN

---

## 5.1. Distribución vertical de la abundancia y diversidad del plancton bacteriano

La abundancia de bacterias descrita en este estudio es consistente con el rango descrito previamente por Valencia *et al.* (2003) y Bode *et al.* (2006) en la costa de A Coruña, así como con el rango de valores publicados para sistemas costeros de Galicia y el norte de España (Barquero *et al.* 1998, Figueiras *et al.* 2006; Teira *et al.* 2009). En esta investigación, los valores más elevados de abundancia bacteriana se encontraron en las muestras de superficie y más próximas a la costa, al igual que el porcentaje de bacterias de alto contenido en ADN (HNA) que muestra la misma tendencia. Se han descrito varios factores que covarían entre sí condicionando la abundancia bacteriana, entre los más importantes destacan la disponibilidad de materia orgánica (Doval *et al.* 2001), así como la temperatura y los nutrientes inorgánicos (Yokokawa *et al.* 2010, Sjosted *et al.* 2014, Furhman *et al.* 2015). Las variaciones en la abundancia bacteriana descritas en este estudio podrían sugerir que la temperatura y la disponibilidad de sustratos (indirectamente representada por la clorofila) influyen en el gradiente observado desde las estaciones más costeras hacia el océano abierto.

Por primera vez, en el ecosistema costero de A Coruña se estudió la composición de las comunidades bacteriana incluyendo la “biosfera rara” (es decir aquellos filotipos bacterianos menos abundantes). Mientras que mediante el análisis de los grupos más abundantes por CARD-FISH no se encontró ningún patrón de distribución vertical, teniendo en cuenta las secuencias de bacterias (pirosecuenciación 454), se encontró una estratificación vertical en la composición de las comunidades bacterianas influenciada por varias variables ambientales. Aunque una correlación directa entre los resultados obtenidos por CARD-FISH y el amplicon del gen 16rRNA mediante pirosecuenciación 454 no puede llevarse a cabo, debido a que se usaron técnicas diferentes que hacen diana en diferentes regiones del gen 16S, en general, encontramos una buena correspondencia en la estructura de la comunidad bacteriana estudiada por ambas metodologías. Así, tanto mediante CARD-FISH como presentaron una mayor contribución en abundancia (Figura 4B). Estos resultados concuerdan con los por pirosecuenciación, los resultados de esta investigación encontraron que los grupos más abundantes son el cluster SAR11 (*Proteobacteria*), *Rodobacteraceae* (*Proteobacteria*) y Gammaproteobacteria. Las contribución de *Roseobacter* y *Gammaproteobacteria* determinada por CARD-FISH y pirosecuenciación fue cercana a la relación 1:1 (datos no mostrados), indicando que ambas metodologías recuperan este cluster de manera similar. Por el contrario, la abundancia relativa de SAR11 y *Bacteroidetes* fue más elevada por CARD-FISH que pirosecuenciación. SAR 86 contribuyó generalmente más a la abundancia total bacteriana por pirosecuenciación que por CARD-FISH.

En la superficie de la columna de agua, la comunidad bacteriana de la costa de A Coruña estuvo compuesta principalmente por bacterias de los filum *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. La familia *Rhodobacteraceae* y el cluster SAR11, ambos *Alphaproteobacteria*, así como *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*) y *Oceanospirillales* (*Gammaproteobacteria*) observados por Friedline *et al.* (2012) para el Atlántico. La abundancia relativa de SAR11 fue ligeramente superior en la estación más próxima a la costa (St. 4), y en la superficie que en el DCM. Estos resultados son consistentes con los patrones descritos por Mary *et al.* (2007) en aguas costeras del océano Atlántico, así como en otros ecosistemas marinos (Alonso-Sáez *et al.* 2007, Carlson *et al.* 2009), ya que este grupo de bacterias es muy abundante y cosmopolita.

La comunidad bacteriana que habita el máximo de clorofila en las aguas costeras de A Coruña estuvo dominada por el grupo *Gammaproteobacteria* (*Proteobacteria*), como se ha comprobado con la correlación de Spearman, representada en el nMDS (Figura 5B). Así mismo, *Alphaproteobacteria* también contribuyó a la composición de la comunidad en menor proporción. *Oceanospirillales* (*Gammaproteobacteria*) fue el grupo que presentó una mayor abundancia relativa en el máximo de clorofila y estuvo principalmente representado por el cluster SAR86. Al contrario de lo observado para SAR11, la abundancia relativa de SAR86 aumentó con la profundidad y en las estaciones más próximas a la costa. Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios en el Atlántico Norte (Agogé *et al.* 2011; Dobal *et al.* 2014). La especificidad de algunas OTUs por el máximo de clorofila contribuye a diferenciar la estructura de las comunidades bacterianas de superficie y el fondo, donde *Methylobacteraceae*, *Alicyclobacillaceae* y *Acidomicrobiales* presentaron valores de abundancia más elevados comparados con la abundancia relativa de estos grupos en la muestras de superficie. Los filos cuya abundancia fue < 1% (e.g. *Nakamurellaceae*, *Caldilineaceae*, *Streptococcaceae*, *Litoricolaceae*) mostraron valores más elevados en las estaciones más alejadas de la costa y en la profundidad del DCM.

## 5.2 Estructura de la comunidad bacteriana en función de las variables ambientales

Investigaciones recientes sobre la distribución y abundancia relativa de los taxones bacterianos indican que están correlacionadas con diversos factores abióticos y bióticos, como la temperatura (Galand *et al.* 2009, Yokokawa *et al.* 2010, Agogue *et al.* 2011, Sjösted *et al.* 2014), la disponibilidad de nutrientes inorgánicos (Sjosted *et al.* 2014), y concentraciones elevadas de clorofila (Walsh *et al.* 2015) debida a fenómenos de afloramiento. Este fenómeno introduce agua desde las zonas más profundas hacia las capas superficiales, lo que altera la estratificación e incrementa la concentración de nutrientes, particularmente la de nitrato (Bode *et al.* 2004). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran una clara especificidad entre la profundidad y la composición de la comunidad bacteriana, probablemente relacionada con OTUs raros y específicos de la superficie y/o el máximo de clorofila, así como con una abundancia relativa de las OTUs más frecuentes diferente a lo largo del perfil de profundidad.

La relación entre las condiciones ambientales y el bacterioplancton es difícil de generalizar, debido a que los factores ambientales interactúan con la comunidad biológica en diferentes escalas espacio-temporales. El grupo *Bacteriodetes* presenta asociaciones con eventos de afloramiento (Suzuki *et al.* 2001) que provocan incrementos de biomasa y producción fitoplanctónica. Miembros de este grupo tienen una alta capacidad de degradar componentes de alto peso molecular producidos por el fitoplancton (Kirchman *et al.* 2002). En los resultados obtenidos en esta investigación mediante el análisis nMDS, *Bacteriodetes*, representado principalmente por *Flavobacteriaceae*, fue uno de los grupos dominantes en la composición de la comunidad bacteriana de las muestras de superficie, que a su vez estuvieron correlacionadas con las variables PAR y temperatura.

*Proteobacteria*, mayoritariamente compuesto por *Alpha*- y *Gammaproteobacteria*, fueron los grupos dominantes en la composición de las comunidades bacterianas tanto en la superficie como en el máximo de clorofila. SAR11, perteneciente al clado *Alphaproteobacteria*, no está favorecido por los fenómenos de afloramiento (Alonso-Sáez *et al.* 2007), pese a ser uno de los grupos de bacterias más abundantes en el océano. Aún así, es un grupo abundante y cosmopolita que juega un papel importante en la oxidación de carbono orgánico en aguas superficiales de los océanos (Carlson *et al.* 2009). Dado que domina en la superficie de la

columna de agua, su contribución a la abundancia de la comunidad bacteriana estuvo significativamente correlacionada con la temperatura y la radiación PAR.

Las comunidades bacterianas del DCM, estuvieron compuestas principalmente por *Gammaproteobacteria* cuya abundancia estuvo significativamente correlacionada con la concentración de clorofila, la salinidad y los nutrientes inorgánicos, lo cual refleja la afinidad de este grupos por las condiciones ricas en nutrientes (Alonso-Sáez *et al.* 2007).

La hipótesis de este trabajo de investigación pretende la caracterización espacial y temporal de las variables medioambientales (T, Sal, Cla, nutrientes inorgánicos) y el bacterioplancton en una plataforma de afloramiento, donde no existen estudios basales que indiquen como es la diversidad en la costa de A Coruña con un nivel filogenético tan detallado. Entender la relación existente entre los aportes de nutrientes y la composición de las comunidades procariotas es crucial para predecir los cambios que las comunidades bacterianas experimentarán en el futuro. Así mismo, dado que la plataforma del Golfo Ártabro constituye una zona de acumulación de larvas de huevos de distintas especies pesqueras de interés para Galicia (sardina, cigala, pulpo...), la descripción detallada de la oceanografía de la zona en el período de afloramiento (posterior a la puesta) y de sus efectos en los flujos de nutrientes y en el plancton permitirán estimar posibles efectos del ambiente sobre el reclutamiento.

## 6. CONCLUSIONES

---

- La estructura de la composición de la comunidad bacteriana en la costa de A Coruña se debe tanto a las OTUs más abundantes (*Alphaproteotera* SAR11, SAR86 y *Bacteriodetes*) como a las OTUs menos abundantes, “biosfera rara” (*Alteromonadaceae*, *Methylobacteraceae* y *Alicyclobacillaceae*).
- Se encontró una clara estratificación vertical en la composición de las comunidades bacterianas, que se correlacionó significativamente con las variables ambientales medidas en la costa de A Coruña.
- Mientras que la comunidad bacteriana de superficie estuvo dominada por *Alphaproteobacteria*, pertenecientes al cluster de SAR11 y la familia *Rhodobacteraceae*, y *Flavobacteriaceae* (*Bacteriodetes*) asociadas con una mayor temperatura y PAR, la comunidad bacteriana del DCM estuvo dominada por *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria* pertenecientes al cluster de SAR86, asociadas con una mayor salinidad, concentración de nutrientes inorgánicos y clorofila-a.

### CONCLUSIONS

- The structure of the composition of the bacterial community on the coast of A Coruña is due to both more abundant OTUs (*Alphaproteotera* SAR11, SAR86 y *Bacteriodetes*) as less abundant OTUs, “rare biosphere” (*Alteromonadaceae*, *Methylobacteraceae* y *Alicyclobacillaceae*).
- A clear vertical stratification was found in the composition of bacterial communities, which correlated significantly with environmental variables measured on the coast of A Coruña.
- Whereas bacterial community surface was dominated by *Alphaproteobacteria*, belonging to SAR11 cluster and *Rhodobacteraceae* family, and *Flavobacteriaceae* (*Bacteriodetes*) associated with higher temperature and PAR, bacterial community DCM was dominated by *Actinobacteria* and *Gammaproteobacteria* belonging to SAR86 cluster, associated with higher salinity, nutrient concentration and chlorophyll a.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Agogué H, Lamy D, Neal PH, Sogin M, Herndl GJ (2011) Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. *Mol Ecol* 20: 258-278.
- Alonso-Sáez L, Balagué V, Sà EL, Sánchez O, González JM, Pinhassi J, Massana R, Pernthaler J, Pedrós-Alió C, Gasol JM (2007) Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbial Ecol* 60:98-112.
- Alonso-Sáez L, Díaz-Pérez L, Morán XA (2015) The hidden seasonality of rare biosphere in coastal marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology* 17:3766-3780.
- Álvarez-Salgado XA, Borges A, Figueiras FG, Chou L (2009). Iberian margin: the Rías. *Carbon and Nutrient Fluxes in Continental Margins*.
- Anderson, M., Gorley, R. & Clarke, K. (2008) PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods, PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Barquero S, Botas JA, Bode A (1998) Abundance and production of pelagic bacteria in the southern Bay of Biscay during summer. *Scientia Marina* 62:83-90.
- Bode A, Barquero N, González N, Álvarez-Osorio MT, Varela M (2004) Contribution of heterotrophic plankton to nitrogen regeneration in the upwelling ecosystem of A Coruña (NW Spain). *Journal of Plankton Research* 26:11-28.
- Bode A, Varela M, Prego R (2011) Continental and marine sources of organic matter and nitrogen for rías of northern Galicia (Spain). *Marine Ecology Progress* 437:13-26.
- Bode A, Varela MM, Teira E, Fernández E, González N, Varela M (2006) Planktonic carbon and nitrogen cycling off northwest Spain: variations in production of particulate and dissolved organic pools. *Aquatic Microbial Ecology* 37:95-107.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 7: 335-336.
- Carlson C, Morris R, Parson R, Treusch A, Giovannoni H, Vergin K (2009) Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwest Sargasso Sea. *The ISME Journal* 3:283-295.
- Cermeño P, Marañón E, Pérez V, Serret P, Fernández E, Castro C (2006) Phytoplankton size structure and primary production in a highly dynamic coastal ecosystem (Ría de Vigo, NW Spain): seasonal and short-time scale variability. *Est. Coast Shelf Sci* 67:251-266.
- Clarke K, Gorley R (2006) "PRIMER v6." User manual/tutorial. Plymouth routine in multivariate ecological research, Plymouth Marine Laboratory.
- Daims H, Brühl 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. *Syst Appl Microbiol* 22:434-444.

- Dobal V, Varela MM (2014) Diversidad y actividad del bacterioplancton en las profundidades marinas gallegas. Tesis de Fin de Máster, Instituto Español de Oceanografía, A Coruña.
- Doval MD, Álvarez-Salgado XA, Gasol JM, Lorenzo LM, Miron I, Figueiras FG, Pedrós-Alió C (2001) Dissolved and suspended organic carbon in the Atlantic sector of the Southern Ocean. Stock dynamics in upper ocean waters. *Mar Ecol Prog Ser* 223:27-38.
- Eilers H, Pernthaler J, Glöckner F, Amann R (2000) Culturability and In Situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66:3044-3051.
- Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, Glöckner FO, Gerdt G, Amann R (2001). Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5134-5142.
- Figueiras FG, Zdanowski MK, Crespo BG (2006) Spatial variability in bacterias abundance and other microbial components in the NW Iberian margin during relaxation of spring upwelling event. *Aquatic Microbial Ecology* 45:255-266.
- Friedline C, Franklin R, McCallister S, Rivera, M (2012) Microbial community diversity of the eastern Atlantic Ocean reveals geographic differences. *Biogeosciences Discuss* 9 109-150.
- Fuhrman JA, Cram JA, Needham DM (2015) Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology* 13:133-146.
- Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C (2009) Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:22427-22432.
- Gasol J (1999) How to count picoalgae and bacteria with the FACSCalibur Flow cytometer. Dep. Biología Marina y Oceanografía. Inst. Ciències del Mar, CSIC Barcelona. 51pp.
- Gilbert JA, Field D, Swift P, Newbold L, Oliver A, Smyth T, Somerfield P, Huse S, Joint I (2009) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environment Microbiology* 11:3132-3139.
- Hansen HP, Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling F (1983) *Automated chemical analysis*. In: *Methods of sea water analysis* (2<sup>nd</sup> ed) Verlag Chemie, Weinheim, 347-361.
- Joint I, Henriksen P, Fonnes GA, Bourne D, Thingstad TF, Riemann B (2002) Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquat Microbiol Ecol* 29: 145-159.
- Kirchman DL (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *Microbial Ecology* 39:91-100.
- Lekunberri I, Sintés E, De Corte D, Yokokawa T, Herndl GJ (2013) Spatial patterns of bacterial and archeal communities along the Romanche Fracture Zone (tropical Atlantic). *FEMS Microbiol Ecol* 85: 537-552.
- Lovdal E, Eichner C, Grossart HP, Carbonnel V, Chou L, Martin-Jezéquel V, Thingstad TF (2008) Competition for inorganic and organic forms of nitrogen and phosphorous between phytoplankton and bacteria during an *Emiliania huxleyi* spring bloom. *Biogeosciences* 5: 371-383.



- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142(5): 1097-1106.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K-H (1992) Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problem and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15:593-600.
- Martínez-García S, Fernández E, Álvarez-Salgado XA, González J (2010) Differential response of phytoplankton and heterotrophic bacteria to organic and inorganic nutrient additions in coastal waters off the NW Iberian Peninsula. *Mar Ecol Prog Ser* 416:17-33.
- Mary I, Heywood JL, Fuchs BM, Amann R, Tarran GA, Burkill PH (2006) SAR11 dominance among metabolically active low nucleic acid bacterioplankton in surface waters along an Atlantic meridional transect. *Aquat Microbial Ecol* 45:107-113.
- Morris RM, Rappé MS, Urbach E, Connon SA, Giovannoni SJ (2004) Prevalence of the Chloroflexi- Related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2836-2842
- Sapp M, Wichels A, Wiltshire KH, Gerds G (2007) Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea. *FEMS Microbial Ecol* 59:622-637.
- Sjöstedt J, Martiny JB, Munk P, Riemann L (2014) Abundance of broad bacterial taxa in the Sargasso Sea Explained by environmental conditions but not water mass. *Applied and Environmental Microbiology* 80:2786-2794
- Suzuki MT, Preston CM, Chavez FP, DeLong EF (2001) Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. *Aquatic Microbial Ecology* 24:117-127.
- Teira E, Abalde J, Álvarez-Osorio MT, Bode A, Cariño C, Cid A, Fernández E, González JM, Lorenzo J, Valencia J, Varela M (2003) Plankton carbon budget in a coastal wind-driven upwelling station off A Coruña (NW Iberian Peninsula). *Marine Ecology Progress Series* 26:31-43.
- Teira E, Martínez-García S, Lønborg, C, Álvarez-Salgado XA (2009) Growth rates of different phylogenetic bacterioplankton groups in a coastal upwelling system. *Environmental microbiology reports* 1:545-554.
- Teira E, Reinthaler T, Pernthaler A, Pernthaler J, Herndl GJ (2004) Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4411-4414.
- Valencia J, Abalde J, Cid A, Fernández E, González N, Lorenzo J, Teira E, Varela M (2003) Variations in planktonic bacterial biomass and production, and phytoplankton blooms off A Coruña (NW Spain). *Scientia Marina* 67:143-157.
- Varela MM, van Aken HM, Sintes E, Herndl GJ (2008) Latitudinal trends of Crenarcheota and Bacteria in the meso- and bathypelagic water masses of the Eastern North Atlantic. *Environ Microbial* 10:110-124.

- 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.
- Walsh EA, Smith DC, Sogin ML, D'Hondt S (2015) Bacterial and archeal biogeography of the deep chlorophyll maximum in the South Pacific Gyre. *AME* 75:1-13.
- Yokokawa T, De Corte D, Sintès E, Herndl GJ (2010) Spatial patterns of bacterial abundance, activity and community composition in relation to water masses in the eastern Mediterranean Sea. *Aquat Microbiol Ecol* 59:85-195.

# AGRADECIMIENTOS

---

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a mi tutora, Marta M. Varela, sin la cual no sería posible la realización de este trabajo. Muchas gracias por tu dedicación, comprensión y sobre todo por haberme ayudado a aprender y compartir tus conocimientos conmigo.

A Elisa Guerrero-Feijóo, por brindarme su ayuda siempre que la necesitaba y transmitirme sus conocimientos dentro y fuera del laboratorio. Gracias a ti y todos los compañeros del oceanográfico por hacer más agradable mi estancia.

De la misma forma agradecer a mis amigos y familia por su apoyo, en especial a Jose y Noelia por confiar en mí y darme fuerzas siempre que fue necesario.