



INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
CENTRO OCEANOGRÁFICO DE A CORUÑA

Trabajo de Fin de Máster

FACTORES EMPÍRICOS DE CONVERSIÓN LEUCINA-CARBONO PARA
LA ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN BACTERIANA HETEROTRÓFICA:
RELACIÓN CON LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y LA CALIDAD DE LA
MATERIA ORGÁNICA

Memoria presentada por la Licenciada Cessna Pamela Orta Ponce para optar por el grado de Máster en Biología Marina y dirigida por la Dra. Marta M. Varela Rozados (Instituto Español de Oceanografía), con la codirección de la Dra. Tamara Rodríguez Ramos (Instituto Español de Oceanografía)

Curso académico 2017 / 2018

Defensa: Santiago de Compostela, 2 de Julio de 2018

Fdo. Marta M. Varela Rozados

Fdo. Tamara Rodríguez Ramos

Agradecimientos:

En primer lugar, me gustaría agradecer en general a todos los miembros del despacho donde trabajé todo este tiempo que siempre tuvieron la mejor disposición al introducirme en el IEO y por resolver amablemente mis dudas. A Noelia por su gran ayuda con el ODV y los correos de becas, y también a todos por ser una estupenda compañía en el despacho y por supuesto a la hora del café!

A mi codirectora y guía desde el primer día que me recibió de la mejor manera y me ayudó sin parar durante las prácticas, sobretodo durante el TFM. Por todos los consejos y ánimos para seguir adelante, y por todo el tiempo que invertiste en mí, gracias Tamara!

A mi directora Marta, por el invaluable compromiso que siempre tuvo conmigo. Por haber confiado en mí y por haberme brindado oportunidades únicas para seguir creciendo en el ámbito de la investigación. Por todo el conocimiento que compartió conmigo, las ideas y por el apoyo en todo momento. Estoy muy contenta y agradecida de haber trabajado bajo tu tutela, no pude haber caído en mejores manos! Gracias Marta!

A María y a Rubén por haber sido como una segunda familia para mí y por haberme brindado ayuda en todos los aspectos durante mi estancia en España.

A Gabriel por ser mi incesante apoyo las 24 h., por haber aguantado mis momentos de estrés, por escucharme y creer en mí. Gracias por tus cálidos ánimos y las risas, todo fue más fácil gracias a ti!

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia. A mis hermanos Karina y Lalo, por estar ahí aunque estemos físicamente lejos. Gracias por su cariño! A mis padres Eduardo y Nunila. Gracias por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera estar aquí, por ser unos excelentes padres y por ponernos siempre por delante de todo. Les agradezco el que me hayan apoyado siempre que se los pedí incluso cuando no, pero sobretodo, les agradezco la confianza que depositaron en mí. Gracias por brindarnos tanto amor y por alentarnos a ser mejores siempre!

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio y muestreo

2.2. Aproximaciones experimentales para determinar los factores empíricos de conversión Leucina-Carbono (eCFs)

2.2.1. Abundancia y biomasa procariota

2.2.2. Tasas de Incorporación de Leucina (LIR)

2.3. Incorporación de Leucina y estimación de la producción bacteriana heterotrófica (HBP) en los perfiles verticales: CFs empíricos versus CFs teóricos

2.4. Extracción, amplificación y secuenciación del DNA

2.5. Análisis de la diversidad microbiana

2.6. Concentración de DOC y propiedades ópticas de la DOM

2.7. Análisis estadístico

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del área de estudio

3.2. Factores empíricos de conversión Leucina-Carbono (eCFs)

3.3. Estimación de la producción bacteriana heterotrófica (HBP)

3.4. Diversidad y composición de la comunidad bacteriana

3.5. Caracterización de la DOM

3.6. Relación de los eCFs con la diversidad microbiana y la cantidad y calidad de la DOM

4. DISCUSIÓN

4.1. Estimación de eCFs y variabilidad en la producción bacteriana heterotrófica

4.2. Índices de diversidad y distribución vertical de los principales filotipos bacterianos

4.3. Relación entre los eCFs, la composición de la comunidad bacteriana y la DOM

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La estimación de la producción bacteriana heterotrófica (HBP) es una variable clave para determinar el papel de las bacterias en los flujos de carbono en el océano. Para su determinación, se mide la tasa de incorporación de isótopos radioactivos como [^3H ó ^{14}C]-Leucina o ^3H -timidina, a la que aplicamos un factor de conversión (CF), el cual permite convertir la incorporación de sustratos a biomasa bacteriana heterotrófica. Los factores de conversión de Leucina a Carbono (CFs) en los ecosistemas marinos han mostrado una gran variabilidad en comparación con los teóricos (Calvo-Díaz, 2009). Las fuentes de dicha variabilidad pueden incluir el diseño experimental de la incubación, el método de cálculo o el estado fisiológico de las células. Sin embargo, apenas se ha explorado si las diferencias en estos CFs están relacionadas con cambios en la composición de la comunidad bacteriana y/o la composición de la materia orgánica disuelta (DOM). En este trabajo se realizaron incubaciones de agua de mar muestreada durante la campaña MODUPLAN en el Atlántico Norte, para: (i) determinar CFs empíricamente (eCFs) con el fin de obtener medidas para las aguas subsuperficiales, intermedias y profundas que nos permiten la conversión de las tasas de incorporación de Leucina en la producción de biomasa, y (ii) explorar la relación entre los eCFs, la composición de la comunidad microbiana y las propiedades ópticas de la DOM. La composición de la comunidad microbiana se determinó tras la secuenciación del gen 16S rDNA mediante tecnología Illumina. Los índices ópticos de la DOM se calcularon a partir de los espectros de fluorescencia y absorbancia. Los valores empíricos de CFs (0.39 a 4.00 KgC mol Leu⁻¹) mostraron máximos en las aguas subsuperficiales (<200 m) y mínimos en aguas profundas (>1000 m). Nuestros resultados demuestran que el uso de CFs teóricos (1.55 Kg de C por mol de Leucina, Simon y Azam, 1989) producen una subestimación de la producción de biomasa microbiana en las aguas subsuperficiales e intermedias, mientras que causan una sobreestimación de las mismas en aguas profundas. Nuestros resultados indicaron que la comunidad bacteriana está estratificada verticalmente, y dicha variación está vinculada con la calidad de la materia orgánica. En conjunto, nuestros resultados indican que las diferencias en los eCFs a través de la columna de agua pueden asociarse a la composición filogenética de las comunidades microbianas que interactúan con las características de la DOM.

1. INTRODUCCIÓN

El bacterioplancton habita todos los ecosistemas marinos, desde la superficie hasta las zonas abisales, y constituye un gran porcentaje de la biomasa total de los océanos, aproximadamente un 50% de la biomasa total (Aristegui *et al.* 2009). Además, las bacterias juegan un papel fundamental en los principales ciclos biogeoquímicos (Fuhrman *et al.*, 2015), ya que poseen un amplio espectro de capacidades metabólicas, siendo mediadoras del consumo y producción de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, respectivamente.

Las bacterias heterótrofas juegan un papel muy importante en el ciclo de la materia orgánica disuelta (DOM, del inglés *dissolved organic matter*), ya que son las mayores consumidoras y transformadoras de la producción primaria en el océano (Yamada *et al.*, 2012; Karl *et al.*, 1988; Fuhrman, 1992; Steinberg *et al.*, 2008). La producción bacteriana heterotrófica (HBP, del inglés *heterotrophic bacterial production*), una estimación de la biomasa producida por las bacterias heterótrofas, abarca el 30% de la producción primaria integrada en toda la columna de agua (Cole *et al.*, 1988), y es una medida clave para determinar el papel de las bacterias en los flujos de carbono en el océano (Teira *et al.*, 2015; Yamada, *et al.*; 2012; Dobal-Amador *et al.*; 2016). El método más utilizado y más eficiente para determinar la HBP, debido a su alta sensibilidad y reducido tiempo de incubación (Fuhrman, 1980 y Kirchman, 1982), es su estimación a partir de la tasa de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos radioactivos, como la [³H ó ¹⁴C]-Leucina y ³H-timidina. La Leucina es un aminoácido esencial que las bacterias incorporan a sus proteínas antes de metabolizarlo (Calvo-Díaz y Morán, 2009). Así, a partir de la tasa de incorporación de Leucina (LIR, del inglés *leucine incorporation rate*) se estima la HBP en unidades de carbono (Kirchman, 1993) mediante la aplicación de un factor de conversión (CF) (Calvo-Díaz y Morán, 2009). Para calcular la producción bacteriana heterotrófica se ha usado ampliamente en la literatura un factor de conversión teórico de 1.55 KgC mol Leu⁻¹ calculado en base al contenido proteico promedio de una célula bacteriana y su contenido promedio de carbono (Alonso-Sáez *et al.*, 2010). Sin embargo, este CF es constante y no tiene en cuenta la variabilidad del contenido proteico de las células en los diferentes ambientes (ej. ambientes costeros vs. oceánicos y/o aguas superficiales vs. profundas). En los últimos años, se han realizado varios estudios que incluyen aproximaciones experimentales con comunidades bacterianas naturales en agua de mar, (Alonso-Sáez *et al.*, 2010; Teira *et al.*, 2015; Calvo-Díaz y Morán, 2009) para la determinación de CFs empíricos (eCFs) que permitan obtener estimas más precisas de la HBP, encontrándose que éstos presentan una alta variabilidad entre diferentes océanos (Teira *et al.* 2015), que se traduce en una elevada variabilidad en el stock y en la dinámica del carbono bacteriano (Kirchman y Ducklow, 1993). Hasta el momento una limitación muy

importante es que no hay estudios que incluyan el cálculo de CFs en los ecosistemas marinos profundos. Además, en la actualidad se desconocen las causas que provocan la variabilidad en los factores de conversión.

La composición de la DOM podría tener un papel modelador de la estructura de la comunidad bacteriana, y a su vez el procesado de la DOM por parte de las bacterias está condicionado por la estructura de las comunidades bacterianas (Guerrero-Feijóo *et al.*, 2017; Sarmiento *et al.*, 2016; Logue *et al.*, 2016). Las propiedades ópticas de la DOM son importantes para determinar la cantidad y calidad de la DOM, como fuente de sustrato para el metabolismo bacteriano. La DOM fluorescente es una fracción de la DOM cromófora que emite fluorescencia azul al ser irradiada con luz UV (Coble, 1996, 2007). El pico de fluorescencia FDOM-M es característico de las sustancias marinas húmicas ‘refractarias’, mientras que el pico FDOM-T es característico de los materiales proteicos ‘lábilés’ (Catalá *et al.*, 2018; Guerrero-Feijóo *et al.*, 2017). Los índices de absorción a 254nm (aCDOM254), a 340nm (aCDOM340) y a 365nm (aCDOM365) son una medida cualitativa que da información sobre la heterogeneidad de las moléculas que componen la DOM. Además, aCDOM254 es un “proxy” de la concentración de DOM. Aunque se desconoce el significado ecológico de estos índices, la intensificación de la conjugación/aromaticidad aumenta con los coeficientes de absorción (Stedmon y Nelson, 2015), de modo que coeficientes de absorción a una longitud de onda mayor a 300 nm reunirían información de moléculas complejas/aromáticas (Guerrero-Feijóo *et al.*, 2017). Por otro lado, la pendiente entre 275 y 295 nm (sCDOM275-295) ha sido frecuentemente usada para relacionar las propiedades ópticas de la DOM con los microorganismos marinos, y es una variable cualitativa que da una idea sobre los cambios en el peso molecular y la aromaticidad de la DOM (Helms *et al.* 2008).

Así mismo, se ha demostrado que las características físico-químicas de las masas de agua se encuentran asociadas a la variabilidad vertical en la composición de la comunidad bacteriana (Varela *et al.*, 2008, 2011; Milici *et al.*, 2017; Dobal-Amador *et al.*, 2016; Mapelli *et al.*, 2013). Se han encontrado unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con genes específicos que les permiten sobrevivir en masas de agua profundas, sugiriendo que la comunidad bacteriana se encuentra estratificada en función de la profundidad (Milici *et al.*, 2017, Guerrero-Feijóo *et al.* 2017). La zona del Atlántico Norte frente a los litorales gallego y cantábrico, es un área muy dinámica caracterizada por un sistema de afloramientos en pulsos estacionales de intensidad interanual variable (Guerrero-Feijóo *et al.*, 2017), lo cual contribuye a la exportación de materia orgánica hacia mar adentro y a su hundimiento hacia las capas profundas del océano. Estas características hacen al área de estudio (costa Noroeste de la Península Ibérica) una zona ideal

para investigar la relación entre los flujos de carbono, la cantidad y calidad de la DOM y la composición de las comunidades bacterianas.

La hipótesis de partida de este trabajo es que los factores de conversión Leucina-Carbono empíricos producen diferencias significativas en la estimación de la producción bacteriana heterotrófica en las aguas subsuperficiales, intermedias y profundas del Atlántico Norte, y dicha variabilidad está relacionada con la calidad de la DOM y la composición de la comunidad microbiana.

Los objetivos de este trabajo son: (i) determinar CFs empíricos específicos para aguas subsuperficiales, intermedias y profundas en el Atlántico Norte, y (ii) explorar la relación entre los eCFs, las propiedades ópticas de la DOM y la composición de la comunidad microbiana asociada.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio y muestreo

Los datos presentados en este trabajo proceden de los muestreos realizados durante la campaña MODUPLAN 0814 a bordo del B/O Sarmiento de Gamboa, del 4 al 24 de Agosto del 2014. Las estaciones muestreadas se localizaron en dos secciones perpendiculares a la costa de Galicia (*Finisterre*, 43°N, 9°W hasta 43°N, 14°W) y Cantabria (*Santander*, 43°N, 3°47'W hasta 45°N 3° 47'W) (Fig. 1). En todas las estaciones de cada sección, se realizaron perfiles verticales desde superficie hasta una profundidad máxima de 5300 m de profundidad (según la batimetría de cada sección) usando un sistema CTD-ADCP-roseta provisto de un sensor de oxígeno y fluorescencia y 24 botellas tipo Niskin de 12 L para: (i) caracterizar las propiedades termohalinas (temperatura, salinidad y oxígeno) de la columna de agua (ver Fig. 1), (ii) tomar muestras de agua para las aproximaciones experimentales de los factores de conversión en tres estaciones 11, 111 y 115 (ver Fig. 1), (iii) tomar muestras para los análisis microbiológicos: medida de la incorporación de Leucina y estimación de la producción bacteriana en las estaciones biológicas (ver Fig. 1) y diversidad microbiana en estación 11 y 115 y (iv) tomar muestras para los análisis biogeoquímicos: carbono orgánico disuelto (DOC); fluorescencia de la DOM (sustancias húmicas ‘refractarias’, FDOM-M y materiales proteicos ‘lábilés’, FDOM-T); absorbancia de la DOM (complejidad/aromaticidad de las moléculas de la DOM), absorbancia a 254 nm (aCDOM254), absorbancia a 340 nm (aCDOM340), absorbancia a 365 nm (aCDOM365); y la pendiente entre 275 y 295 nm (sCDOM275-295) (cambios en el peso molecular y la aromaticidad de la DOM), en las estaciones 11 y 115.

Para facilitar la estructuración y comprensión de los resultados, se han agrupado las profundidades de muestreo en: **capa subsuperficial** (0 - 499 m) afectada por el afloramiento del NO de la Península Ibérica; **aguas intermedias** (500 - 1000 m), por debajo de la capa de mezcla y zona de mínimo oxígeno, hasta la masa de agua mesopelágica de origen mediterráneo; y **aguas profundas** (>1000 m), que incluyen el agua de Labrador y el agua Noratlántica profunda.

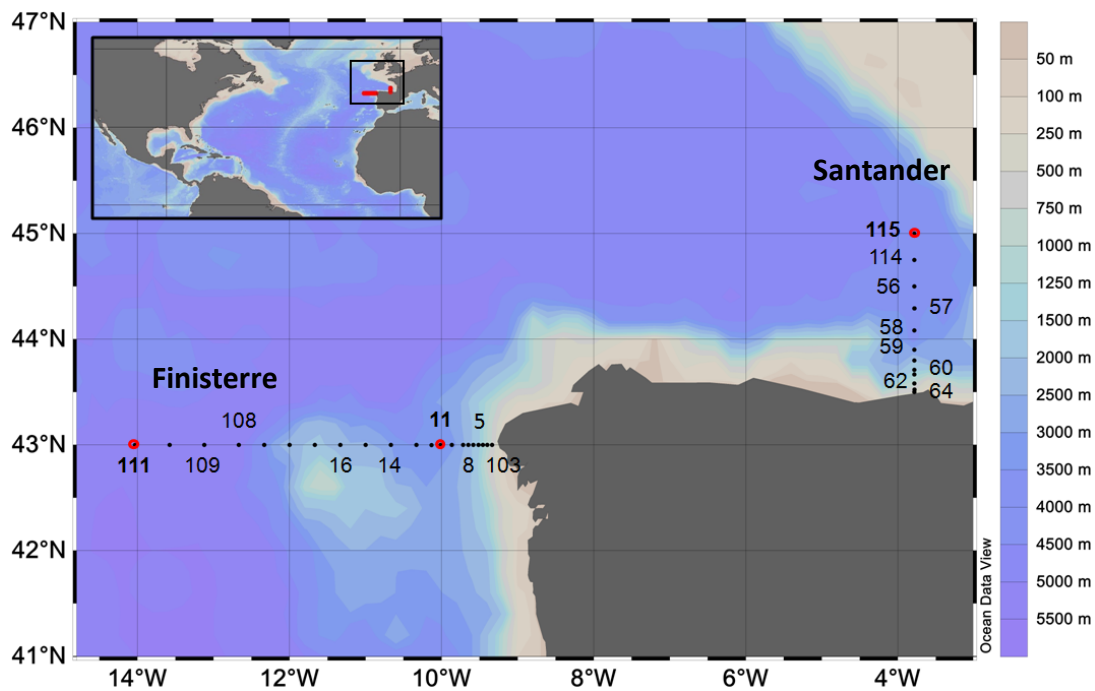


Fig. 1. Localización de las estaciones de muestreo en las secciones de Finisterre y Santander durante la campaña MODUPLAN 0814. Los puntos negros indican las estaciones donde se realizó la caracterización físico-química de la columna de agua (temperatura (°C), salinidad y concentración de oxígeno disuelto ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)). En las tres estaciones destacadas con un círculo rojo (11, 111 y 115) se realizaron los experimentos para la determinación de los eCFs. Los números indican las estaciones donde se calcularon la leucine incorporation rate (LIR), para la estimación de la heterotrophic bacterial production (HBP). La diversidad bacteriana y las variables relacionadas con la DOM se determinaron en las estaciones 11 y 115.

2.2. Aproximaciones experimentales para determinar los factores empíricos de conversión Leucina-Carbono (eCFs)

Los experimentos se realizaron en dos estaciones de la sección de Finisterre (St. 11 y 111) y en una estación de la sección de Santander (St. 115) (Fig. 1). Las muestras de agua se recogieron a 500, 1000 y 2000 m de profundidad en las estaciones 11 y 115, y en la capa subsuperficial (50 y 100 m) en la estación 111. Para ello, en cada estación y para cada profundidad, una muestra de agua de mar fue diluida (1:10) con agua filtrada a $0.2 \mu\text{m}$ (Acropack 1000, Pall), conservada en botellas de policarbonato de 1.5 L, e incubada en oscuridad y a temperatura *in situ* ($\pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$) en incubadores a bordo. Se tomaron alícuotas en intervalos de 24 horas hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, aproximadamente entre 6 - 8 días. Para la estimación de los eCFs se siguió el método acumulativo de Bjørnsen y Kuparinen (1991), que estima la pendiente de la relación entre la biomasa procariota y la incorporación de Leucina (ver debajo apartados 2.2.1 y 2.2.2) acumulada a diferentes intervalos de tiempo (Calvo-Díaz y Morán, 2009).

2.2.1. Abundancia y biomasa procariota

La abundancia procariota total (AP) de la serie temporal de los CFs se determinó mediante citometría de flujo, siguiendo el método previamente descrito por Gasol *et al.* (1999). Brevemente, a cada alícuota de 1.8 mL de muestras de agua se le añadió paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 0.05% (concentración final) para su conservación. A continuación, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 5 min y finalmente se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. En el laboratorio de abordaje, las muestras se descongelaron y se tiñeron con Syto13 durante 10 minutos en la oscuridad. Posteriormente, se añadieron beads de látex fluorescentes (aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) (Molecular Probes, 12 Invitrogen, Carlsbad, CA) como estándar interno. Las células procariotas se contaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) según sus características en dispersión de luz en ángulo recto y fluorescencia verde. Se utilizó una calibración empírica entre la dispersión lateral relativa (SSC) y el diámetro de las células (Calvo-Díaz y Morán, 2006), para estimar el biovolumen (BBv) que finalmente se convirtió en biomasa de carbono (C) utilizando la relación alométrica de Norland (1993): $C \text{ (pg cel}^{-1}\text{)} = 0.12 \times \text{BBv}^{0.72}$.

2.2.2. Tasas de Incorporación de Leucina (LIR)

Las tasas de incorporación de leucina de la comunidad microbiana de los CFs se midieron mediante la adición de 5 nmol L^{-1} de [^3H]-Leucina (concentración final, actividad específica $160 \text{ Ci mmol L}^{-1}$, GE Healthcare, Amersham, Bucks, Reino Unido) a muestras de 1.2 mL de agua de mar por triplicado, más dos controles de 1.2 mL de agua de mar a las que se añadieron $120 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA, concentración final 5%), para asegurar la muerte celular y evitar que exista actividad microbiana. Las muestras y los blancos se incubaron en oscuridad y a temperatura *in situ* simulada en cámaras de T controlada, durante 2 - 6 h dependiendo de la actividad esperada. Las incubaciones se finalizaron mediante la adición de TCA (concentración final 5%) a las muestras. Las proteínas procariotas se precipitaron mediante dos etapas sucesivas de centrifugación (12000 rpm , 10 min), incluyendo un lavado con 1 mL de TCA al 5% siguiendo a Kirchman (1985) con ligeras modificaciones (Smith y Azam, 1992).

2.3. Incorporación de Leucina y estimación de la producción bacteriana heterotrófica (HBP) en los perfiles verticales: CFs empíricos versus CFs teóricos

La LIR de las aguas subsuperficiales (<500 m) se midió por el método de centrifugación descrito en el apartado 2.2.2, mientras que la LIR de aguas intermedias y profundas ($\geq 500 \text{ m}$) se

determinó mediante la adición de 5 nmol L⁻¹ [³H]-Leucina (concentración final, actividad específica 160 Ci mmol L⁻¹, GE Healthcare, Amersham, Bucks, Reino Unido) a muestras de 40 mL por duplicado más dos controles con formaldehído (concentración final del 2%) (Simon y Azam, 1989). La incubación de las muestras y los blancos se llevó a cabo a temperatura *in situ* y en la oscuridad durante 10 - 24 h, dependiendo de la actividad esperada. Las incubaciones se finalizaron agregando formaldehído (concentración final del 2%) a las muestras. Las muestras y controles se filtraron a través de filtros de policarbonato de 0.2 µm (diámetro de filtro de 25 mm, Millipore). Posteriormente, los filtros se enjuagaron con 10 mL de TCA helado al 5% y se secaron al aire antes de añadir el cóctel de centelleo líquido a los viales. Se midió la radioactividad después de 18 h desde la adición del cóctel de centelleo, en un contador de centelleo (LKB Wallac). Las desintegraciones medias por minuto (DPM) de los blancos se sustrajeron de la DPM media de las respectivas muestras y la DPM resultante se convirtió en tasas de incorporación de Leucina (Smith y Azam, 1992).

A continuación, la HBP se calculó como:

$$\text{HBP} = \text{LIR} * \text{CF},$$

donde CF es el factor de conversión Leucina-Carbono expresado en KgC mol Leu⁻¹. La HBP teórica se determinó aplicando el CF teórico para Leucina (1.55 KgC mol Leu⁻¹ sin considerar dilución isotópica) propuesto por Simon y Azam (1989), mientras la HBP empírica se determinó aplicando los eCFs obtenidos de los experimentos anteriormente descritos (ver apartado 2.2.). A continuación, se realizaron comparaciones de ambas estimaciones para toda la columna de agua en ambas secciones.

2.4. Extracción, amplificación y secuenciación del DNA

Para la extracción del DNA, se filtró un volumen de 10 - 15 L de agua de las botellas Niskin de cada profundidad, a través de filtros Sterivex de 0.22 µm (Millipore, EE. UU.). Se añadieron 1.8 mL de *buffer* de lisis (EDTA 40 mM, 50 mMTRIS-HCl, 0.75 M de sacarosa) al cartucho del filtro y se almacenaron a -80 °C. La extracción de DNA se realizó por lisis enzimática de las células con lisoenzima y proteinasa K, seguido de la extracción con fenol-cloroformo. El DNA se precipitó mediante la adición de isopropanol. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en *buffer* TE estéril. Las muestras de DNA se cuantificaron y se verificó su calidad (según el ratio A260/A280) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, EE. UU.).

Una vez extraído y purificado, el DNA fue analizado mediante tecnología Illumina Miseq. Los datos de secuenciación generados se procesaron y clasificaron siguiendo un flujo de trabajo en Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Después de un control de calidad, las secuencias se alinearon usando como referencia la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013). Para la construcción de unidades taxónomicas operacionales (OTUs), las lecturas se agruparon en base a una similitud de identidad del 97% y la afiliación filogenética de los OTUs se asignó mediante comparación con la base de datos SILVA usando el enfoque Wang (Wang *et al.*, 2007). Para los análisis basados en OTUs, se excluyeron las secuencias de cloroplastos, mitocondrias y eucariotas, así como los *singletons* (OTUs encontrados una única vez en la base de datos), que probablemente hayan sido el resultado de errores en la PCR o en el proceso de secuenciación (Huse *et al.*, 2010).

2.5. Análisis de la diversidad microbiana

Para cada estación y profundidad de muestreo se determinó la diversidad y la riqueza de OTUs, en la comunidad microbiana de estudio, calculando respectivamente el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') y el índice de Chao₁, usando la función *estimateR* del paquete *vegan* (Oksanen *et al.* 2018) en R (R core Team 2018).

El índice de Shannon Weaver (o Shannon–Wiener) se define como:

$$H' = - \sum_i p_i \log_b p_i,$$

donde p_i es la abundancia proporcional de la especie i y b es la base del logaritmo (Oksanen *et al.*, 2018).

El índice de Chao₁ se define como:

$$S_P = S_0 + \frac{\alpha_1^2}{2\alpha_2} \frac{N-1}{N},$$

donde S_P es la riqueza extrapolada en una comunidad, S_0 es el número de OTUS observado en la comunidad, α_1 y α_2 son el número de especies que aparecen solo en una o dos muestras de la comunidad y N es el número de muestras en la colección (Oksanen *et al.*, 2018).

Este índice permite obtener una estimación del número de especies raras que se esperaría observar en la comunidad de estudio. Estas especies pueden permanecer imperceptibles dentro de la comunidad, ya que al tener bajas abundancias podrían no aparecer dentro del muestreo.

2.6. Concentración de DOC y propiedades ópticas de la DOM

Todas las muestras de DOM de los primeros 200 m de profundidad fueron filtradas bajo presión positiva utilizando un sistema de vidrio limpio con ácido y filtros de combustión GFF (450 °C, 4 h). Las muestras de agua para el análisis del DOC se recolectaron en ampollas de vidrio de

combustión (450 °C, 12h), y acidificadas con H₃PO₄ a pH <2. Las ampollas fueron selladas con calor y la concentración del DOC se determinó con un analizador Shimadzu TOC-CSV mediante oxidación Pt-catalítica de alta temperatura (Álvarez-Salgado y Miller, 1998).

Las propiedades ópticas de la DOM se midieron a bordo en las mismas muestras de agua que se usaron para los experimentos de eCFs al comienzo de la incubación. Se tomaron alícuotas de 5 - 25 mL que fueron vertidas directamente en la celda óptica correspondiente. La fluorescencia se midió con un espectrofotómetro Perkin Elmer LS55, siguiendo el método de Nieto-Cid *et al.* (2006), en dos pares de longitud de onda de excitación/emisión: i) 320 nm/410 nm (FDOM-M), y ii) 280 nm/350 nm (FDOM-T). Las muestras se calibraron frente a sulfato de quinina y los resultados se dieron en unidades de sulfato de quinina (QSU). Por otro lado, usando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU800 equipado con células de cuarzo de 10 cm, se obtuvieron los espectros de absorción de la DOM cromófora, mediante escaneo de las muestras entre 250 y 700 nm de longitud de onda, que proporcionan los siguientes índices (Green y Blough, 1994): aCDOM₂₅₄, aCDOM₃₄₀, aCDOM₃₆₅ y sCDOM₂₇₅₋₂₉₅.

2.7. Análisis estadístico

La normalidad de las variables que describen la cantidad y calidad de la DOM (DOC, FDOM-T, FDOM-M, aCDOM₂₅₄, aCDOM₃₄₀, aCDOM₃₆₅ y sCDOM₂₇₅₋₂₉₅, y la diversidad bacteriana (el índice de Shannon, H', y el índice de Chao₁) se testó con el índice de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). La correlación de los eCFs con respecto a las propiedades ópticas de la DOM y las variables de diversidad se determinó con un test de correlación de Pearson (Pearson, 1920). Finalmente, se ajustó un modelo de regresión (lineal o polinómica de segundo grado) entre los eCFs y la abundancia relativa de cada uno de los filotipos que componen las comunidades bacterianas correspondientes.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del área de estudio

Las profundidades de muestreo se seleccionaron en función de diferentes masas de agua en ambas secciones que se identificaron según sus características físico-químicas (temperatura potencial, salinidad y oxígeno). El perfil vertical de temperatura mostró patrones similares en ambas secciones, alcanzando máximos en la zona eufótica (≤ 100 m). La temperatura fue notablemente más elevada en Santander (~ 20 °C) que en Finisterre (~ 13 °C) en las aguas subsuperficiales (< 500 m) de las estaciones costeras. La presencia de esta masa de agua cálida se reflejó también en los valores de salinidad y oxígeno (35.2 y 230 $\mu\text{mol O}_2 \text{ Kg}^{-1}$ respectivamente) en Santander (Fig. 2). Entre los 250 y 900 m de profundidad, la concentración mínima de oxígeno osciló alrededor de los 184 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$. El máximo de O_2 (~ 270 $\mu\text{mol O}_2 \text{ Kg}^{-1}$) fue profundo en Finisterre (~ 2000 m), mientras que en Santander se localizó en la capa eufótica (~ 100 m). Por debajo de la capa subsuperficial, se encontraron dos masas de agua intermedias: el agua de origen mediterráneo (MW, ~ 1000 m) caracterizada por su alta salinidad (~ 36) (Prieto *et al.*, 2013), particularmente notoria en la sección de Finisterre, y el agua proveniente del Mar de Labrador (LSW, $\sim 1800 - 2000$ m), caracterizada por salinidades mínimas (~ 35). Finalmente, las aguas profundas están caracterizadas por bajas temperaturas < 2 °C, mínimo de salinidad (~ 34.4) y elevada concentración de O_2 (250 $\mu\text{mol kg}^{-1}$).

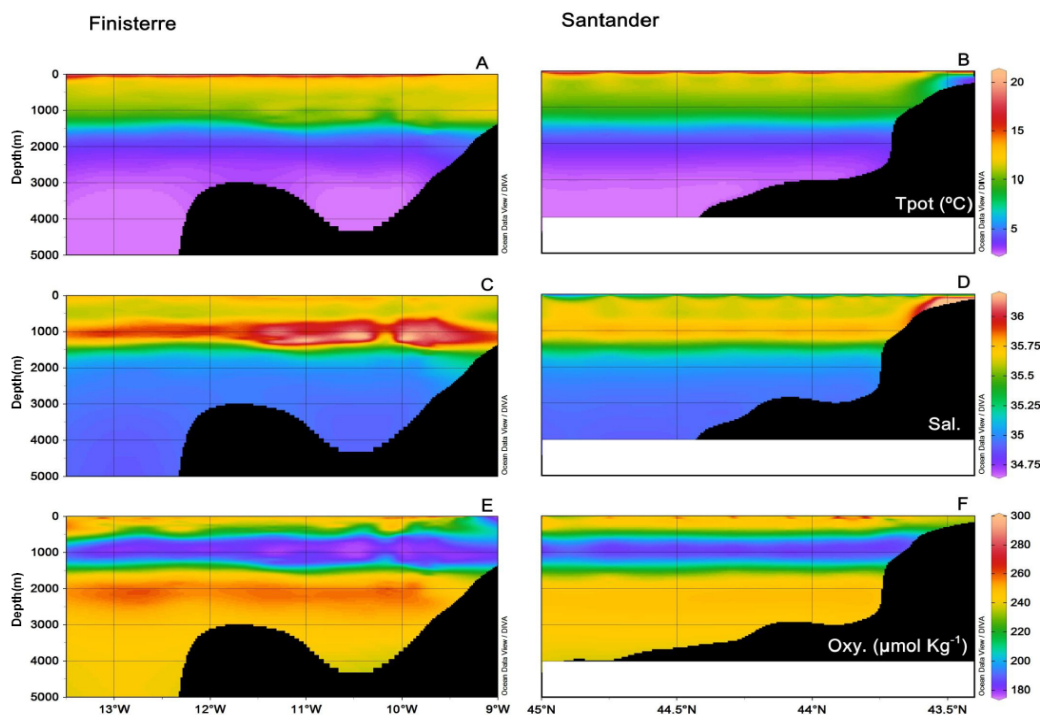


Fig. 2. Caracterización físico-química de la columna de agua en la sección de Finisterre (izquierda, profundidad máx. 5000 m) y la sección de Santander (derecha, prof. máx. 4000 m). Las figuras A-B, representan la temperatura potencial, T_{pot} (°C), C-D, salinidad, Sal. , y E-F, concentración de oxígeno disuelto, Oxy. ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$).

3.2. Factores empíricos de conversión Leucina-Carbono (eCFs)

Los factores empíricos de conversión Leucina-Carbono calculados por el método acumulativo oscilaron entre 0.39 - 4.00 KgC mol Leu⁻¹ (media ± D.E.: 1.95 ± 1.70) en Finisterre y 1.40 - 3.23 KgC mol Leu⁻¹ (media ± D.E.: 2.57 ± 0.91) en Santander (Tabla 1). Los eCFs disminuyeron con la profundidad un 2% (media ± D.E.: -0.02 ± 0.09) y un 1% (media ± D.E.: -0.01 ± 0.05), por cada 50 m de aumento de profundidad, en Finisterre y Santander respectivamente.

Tabla 1. Factores de conversión empíricos (eCFs, KgC mol Leu⁻¹) calculados con el método acumulativo (Bjørnsen y Kuparinen, 1991) en las tres estaciones (St: 111 y 11, Finisterre; St: 115, Santander). Depth indica la profundidad a la que se aplica cada factor de conversión empírico obtenido.

Section	Station	Water	Depth (m)	Cumulative eCF
Finisterre	111	Subsurface	0-65	3.90
		Subsurface	100-250	4.00
	11	Intermediate	500	2.27
		Intermediate	1000	0.72
		Deep	≥2000	0.39
		Santander	115	Intermediate
		Intermediate	1000	2.91
		Deep	≥2000	1.40

En ambas estaciones, los eCFs (Tabla 1) fueron mayores que el CF teórico (1.55 KgC mol Leu⁻¹) en aguas subsuperficiales e intermedias (0–1000 m), y menores en aguas profundas (>1000 m), a excepción del valor de eCF para los 1000 m de la estación 11 de Finisterre, menor que el CF teórico.

3.3. Estimación de la Producción bacteriana heterotrófica (HBP)

La HBP alcanzó valores máximos en la capa eufótica, en particular en las estaciones más cercanas a la costa (Fig. 3). En los primeros 250 m de profundidad, los valores de HBP empírica fueron un 282% mayores que los estimados con el CF teórico (1.55 KgC mol Leu⁻¹) en las dos secciones. Para las muestras de 500 m de profundidad fueron un 162% y un 231% más altos en Finisterre y Santander respectivamente. Sin embargo, en la columna de agua profunda (>1000 m), se encontró una sobreestimación de la HBP de un 36% en Finisterre, mientras que los valores obtenidos en la sección de Santander no mostraron diferencias utilizando los factores de conversión teóricos y empíricos.

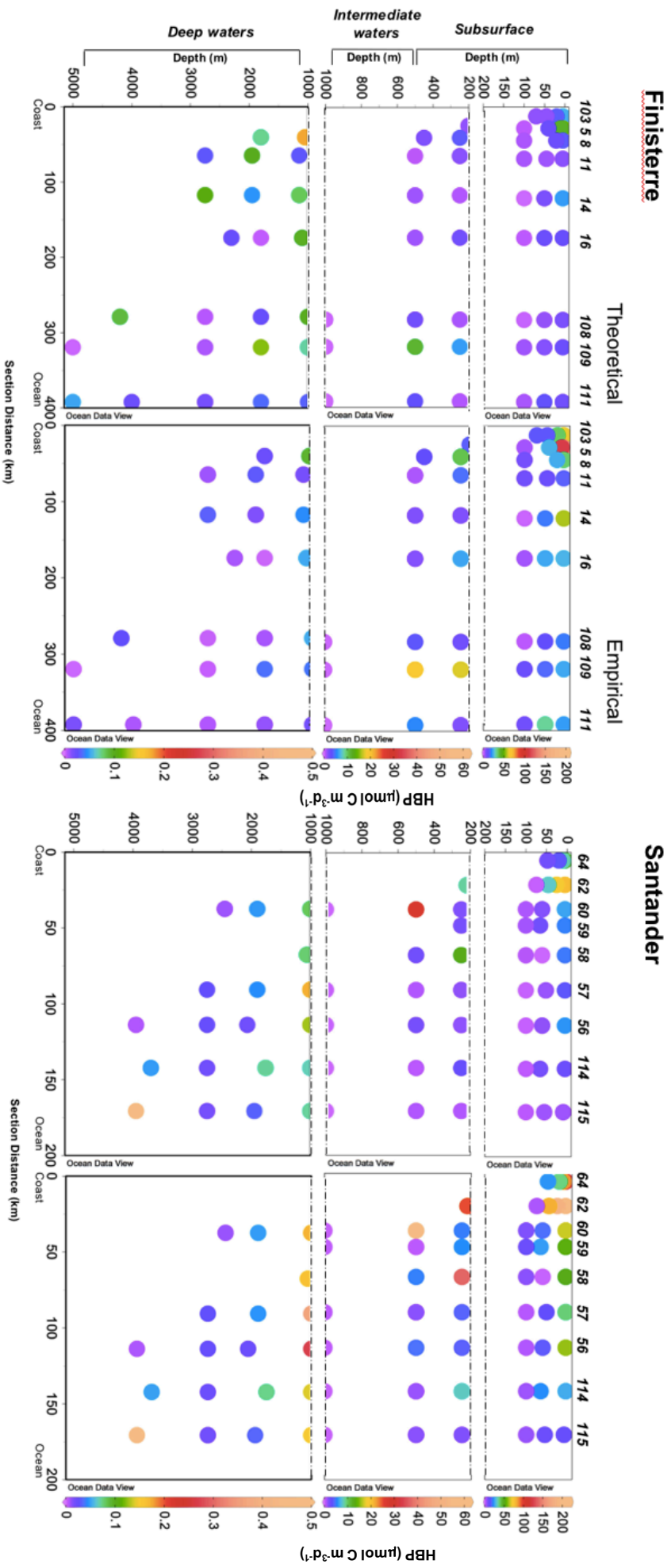


Fig. 3. Variabilidad vertical de la producción bacteriana heterotrófica ($\mu\text{mol C m}^{-3}\text{d}^{-1}$) calculada con el factor de conversión teórico (Theoretical) y el factor de conversión empírico (Empirical) en aguas subsuperficiales, intermedias y profundas. Los números en la parte superior de los gráficos indican las estaciones donde se midió la incorporación de leucina. El eje horizontal inferior indica la distancia (km) desde la costa.

3.4. Diversidad y composición de la comunidad bacteriana

Las comunidades microbianas de la estación 11 de Finisterre y la estación 115 de Santander estuvieron formadas por un total 371 y 441 OTUs observados (*Sobs*), respectivamente. El número total de OTUs estimados (*SChao1*), aumentó con la profundidad en ambas estaciones (Fig. 4). Sin embargo, la diversidad fue diferente entre ellas. La estación 11 de Finisterre mostró mayor variabilidad en los valores de diversidad de Shannon ($H' = 3.77 - 4.44$) que la estación 115 de Santander (4.03 - 4.51), aunque los valores de H' no mostraron un patrón claro en la vertical en ninguna de las secciones (Fig. 4, Tabla 2).

Tabla 2. Valores obtenidos para el índice de diversidad de Shannon (H'), la riqueza de OTUs observada (*S.obs*) y la riqueza de OTUs estimada por el modelo no paramétrico de Chao₁ en las estaciones 11 (Finisterre) y 115 (Santander) en toda la columna de agua. s.e.Chao₁ es el error estándar para el valor estimado de S.Chao₁.

Section	Station	Depth (m)	S. obs	S. Chao1	s.e. Chao1	H' (Shannon)
R. Finisterre	11	45	161	234.48	23.76	4.34
	11	100	174	273.11	31.12	4.44
	11	250	158	252.55	33.25	4.05
	11	500	169	236.03	21.35	3.77
	11	1150	234	345.22	30.44	4.34
	11	1950	232	329.03	42.61	3.98
R. Santander	115	55	164	229	21.19	4.51
	115	100	197	274	23.09	4.45
	115	250	129	178	18.57	4.03
	115	500	221	356.80	37.52	4.36
	115	1000	220	356.49	37.03	4.10
	115	1950	217	322	30.74	4.36
	115	2750	254	412.20	40.77	4.25
	115	3950	254	389.13	34.37	4.32

La composición de la comunidad microbiana en términos de abundancia relativa (Fig. 5) mostró patrones similares para los OTUs más abundantes en ambas secciones. Por ejemplo, SAR202 y Chlamydiales aumentaron con la profundidad, mientras Acidimicrobiia, Bacteroidia y Gammaproteobacteria (γ prot._others) disminuyeron claramente con la profundidad. Entre los 250 y 500 m de la sección de Santander, dos grupos del filo Planctomycetes (Phycisphaerae y Planctomycetacia) fueron notablemente más abundantes que en el resto de la columna de agua (Fig. 5). En contraste, uno de los grupos con abundancias más bajas, Puniceispirillales, fue el único OTU en la sección de Santander con abundancia relativa menor que en la de Finisterre. Puniceispirillales, Rickettsiales, Deltaproteobacteria (δ prot._unclassified) y BD2-11 fueron los OTUs menos abundantes en Finisterre, mientras que en Santander los menos abundantes fueron Puniceispirillales, Verrucomicrobia (others), Rickettsiales y BD2-11.

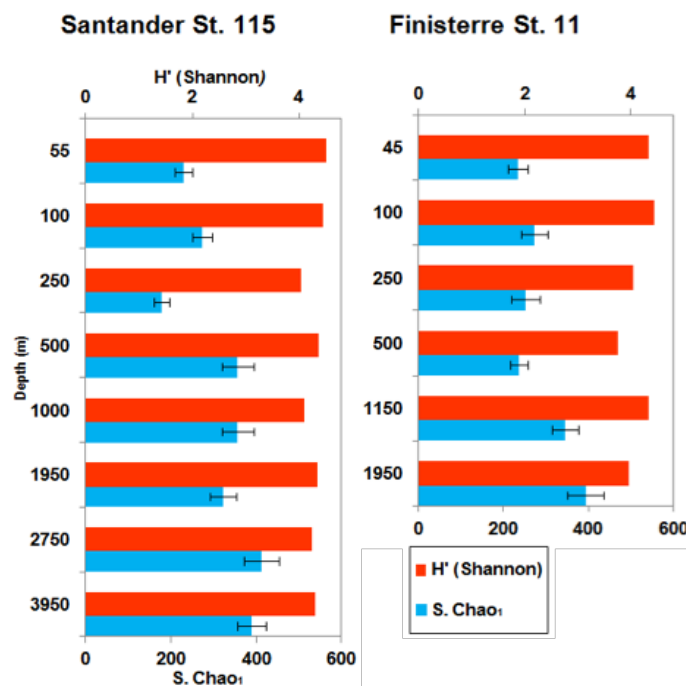


Fig. 4. Variabilidad vertical del índice de diversidad de Shannon (H') y el estimador de riqueza de OTUs (S.Chao₁) en las secciones de Finisterre (estación 11) y Santander (estación 115). Las barras de error representan la desviación estándar del número de OTUs estimado por el modelo no paramétrico Chao₁ (SChao₁).

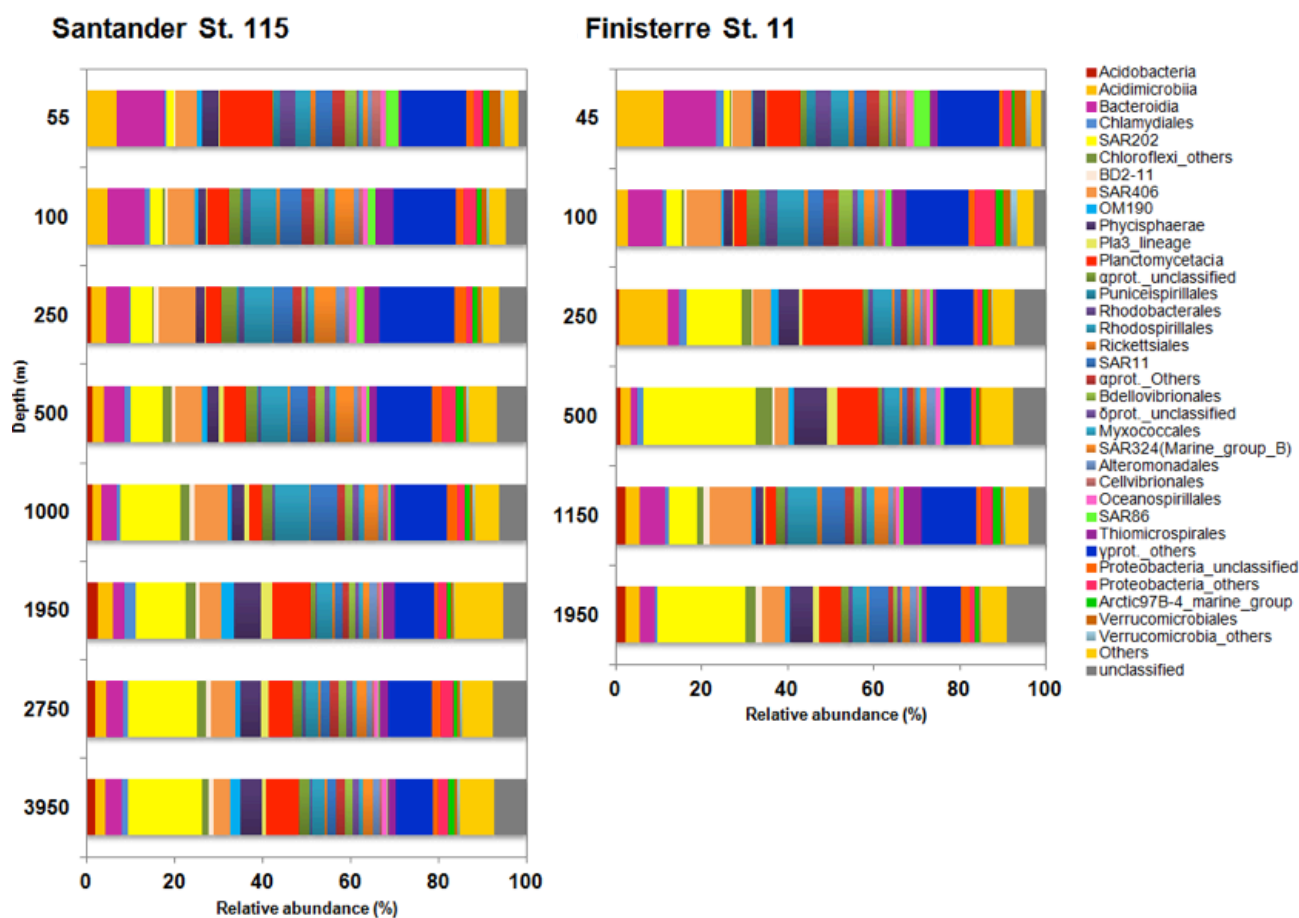


Fig. 5. Variabilidad vertical de la composición taxonómica bacteriana en las estaciones 11 y 115 en las secciones de Finisterre y Santander.

3.5. Caracterización de la DOM

En general, los patrones verticales de variación de las variables de la materia orgánica indican que las mayores variaciones se encontraron en los primeros 250 m de la columna de agua, siendo los perfiles mucho más suaves en aguas intermedias y profundas para ambas estaciones (Fig. 6).

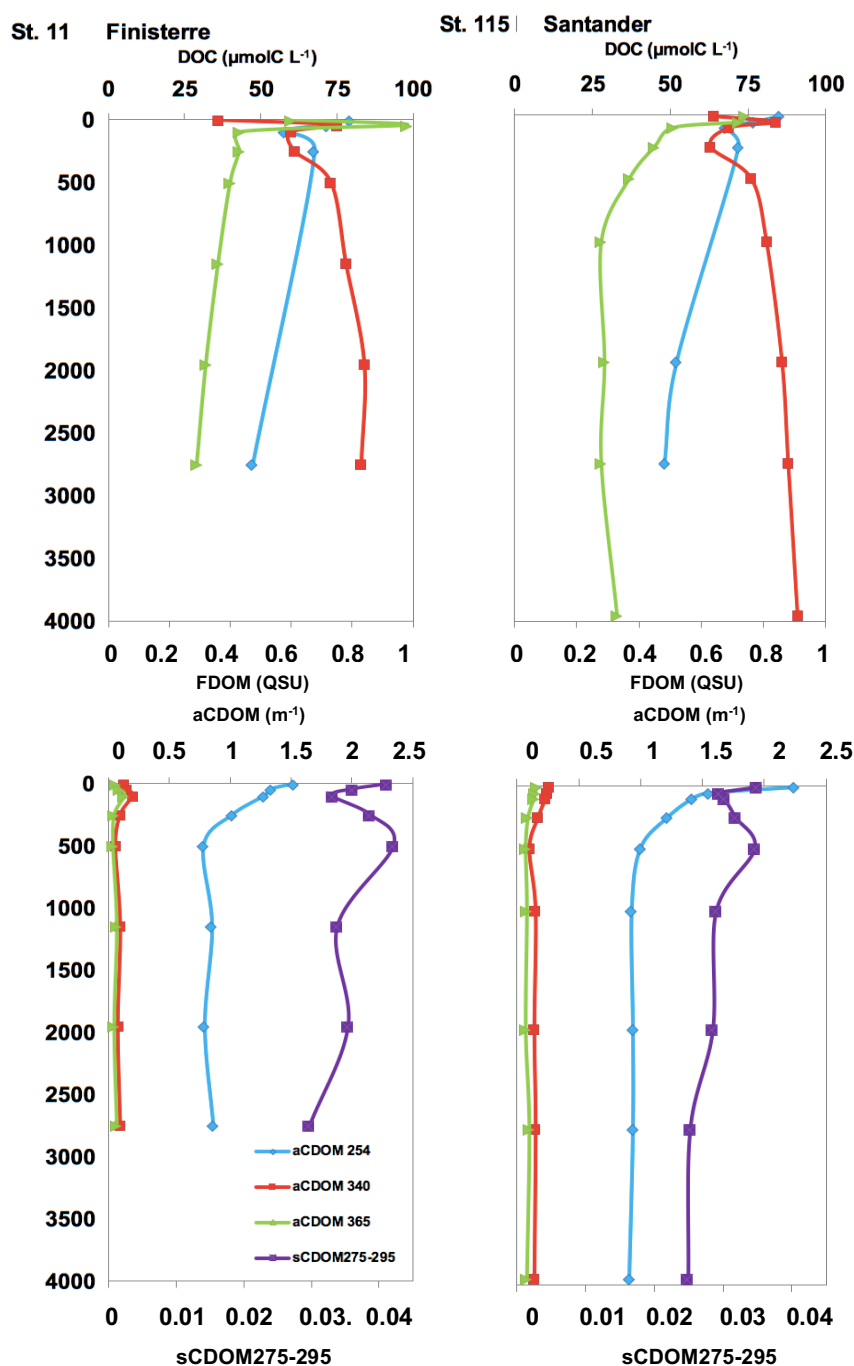


Fig. 6. Variabilidad vertical de: a) concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) (eje superior) y picos de fluorescencia de materiales proteicos (FDOM-M320 nm/410 nm) y compuestos húmicos (FDOM-T280 nm/350 nm) (eje inferior) en las secciones de Finisterre y Santander (paneles superiores); y b) coeficientes de absorción a los 254, 340 y 365 nm (aCDOM254, aCDOM340 y aCDOM365), y la pendiente óptica sCDOM275-295 (paneles inferiores) en las secciones de Finisterre y Santander.

En ambas estaciones, los máximos de DOC (79.3 y 85.1 $\mu\text{mol C L}^{-1}$) y FDOM-T (0.98 y 0.74 QSU) para Finisterre y Santander respectivamente, fueron muy someros (<50 m), mientras los mínimos de DOC (47.3 y 48.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Finisterre y Santander, respectivamente) y FDOM-T (0.29 y 0.28 QSU) se encontraron a los 2750 m de profundidad. Por el contrario, el pico FDOM-M, relacionado con las sustancias húmicas, aumentó con la profundidad (0.36 - 0.91 QSU) en las dos estaciones (Fig. 6a).

El coeficiente de absorción a los 254 nm (aCDOM 254) fluctuó entre máximos de 2.24 m^{-1} en la capa subsuperficial a mínimos de 0.86 m^{-1} en aguas profundas (Fig. 6b). Los coeficientes de absorción a 340 nm (aCDOM340) y 365 nm (aCDOM365) mostraron valores muy similares, con un patrón vertical irregular, mientras la pendiente sCDOM275-295 disminuyó de 0.0421 en la capa subsuperficial a 0.0249 en aguas profundas (Fig. 6b).

En general, se observó una disminución en los valores de DOC y las propiedades ópticas de la DOM (FDOM-T, aCDOM 25, aCDOM340, aCDOM365) y sCDOM275-296), a excepción del FDOM-M, que aumentó con la profundidad.

3.6. Relación de los eCFs con la diversidad microbiana y la cantidad y calidad de la DOM

Los eCFs mostraron una correlación negativa con los valores de riqueza de OTUs estimados, S_{Chao1} , pero no mostraron correlación significativa con el índice de Shannon (H') (Tabla 3). Por otro lado, los eCFs se correlacionaron también significativamente con la concentración de DOC, los picos FDOM-M y FDOM-T, y los coeficientes de absorción aCDOM254 y aCDOM340 (Tabla 3).

El ajuste de regresión lineal o polinómica entre la abundancia total de los diferentes filotipos (con abundancia relativa >1%, ver Fig. 7) y los CFs mostró algunas relaciones significativas en ambas estaciones (Fig. 7). Por ejemplo, la variación de la abundancia de Acidobacteria se relacionó significativamente con la variación de eCFs, explicando el modelo ajustado más del 80% de su variación ($R^2 > 0.8$). Otros grupos bacterianos relevantes en las aguas profundas, mostraron relaciones lineales significativas en menor medida. Por ejemplo, SAR 202, uno de los grupos con mayor abundancia total (de hasta 346 reads) se ajustó inversamente al modelo ($R^2 = 0.478$), de modo que sus abundancias disminuyeron con el aumento de los eCFs. Rickettsiales y Phycisphaerae mostraron el mismo patrón ($R^2 > 0.1$), aunque su contribución a la abundancia total fue más baja. Alteromonadales varió significativamente con los eCFs explicando más del 80% de su variación pero con un ajuste de polinomio de segundo grado. Asimismo, el ajuste de polinomio de segundo grado mostró relaciones entre los eCFs y Verrucomicrobiales y/o Puniceispirillales, donde la relación fue positiva, de manera que sus abundancias aumentaron con

el aumento de los eCFs, a partir de cierto valor ($\sim 2.5 \text{ KgC mol Leu}^{-1}$). En contraste, Rhodobacterales se ajustó al modelo de polinomio de segundo grado aunque en menor medida ($R^2=0.476$) y de forma negativa, sus abundancias disminuyeron al aumentar los eCFs para posteriormente aumentar al incrementarse el valor del CFs.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson (r) de los valores de los eCFs con las variables relacionadas con la DOM: concentración de DOC, propiedades ópticas de la DOM (FDOM-M, FDOM-T, aCDOM 254, aCDOM 340, aCDOM 365 y sCDOM275-295) y las medidas de diversidad bacteriana (Chao_1 y H'). El p-value indica el valor de significancia para la correlación.

		eCF's	
		r	p-value
<i>DOM properties</i>	DOC	0.817	0.002
	FDOM-M	-0.650	0.005
	FDOM-T	0.647	0.005
	aCDOM 254	0.682	0.003
	aCDOM 340	0.566	0.018
	aCDOM 365	0.464	0.060
	s(275-295)	0.324	0.204
<i>Bacterial Diversity</i>	Chao_1	-0.683	0.007
	H (Shannon)	0.189	0.518

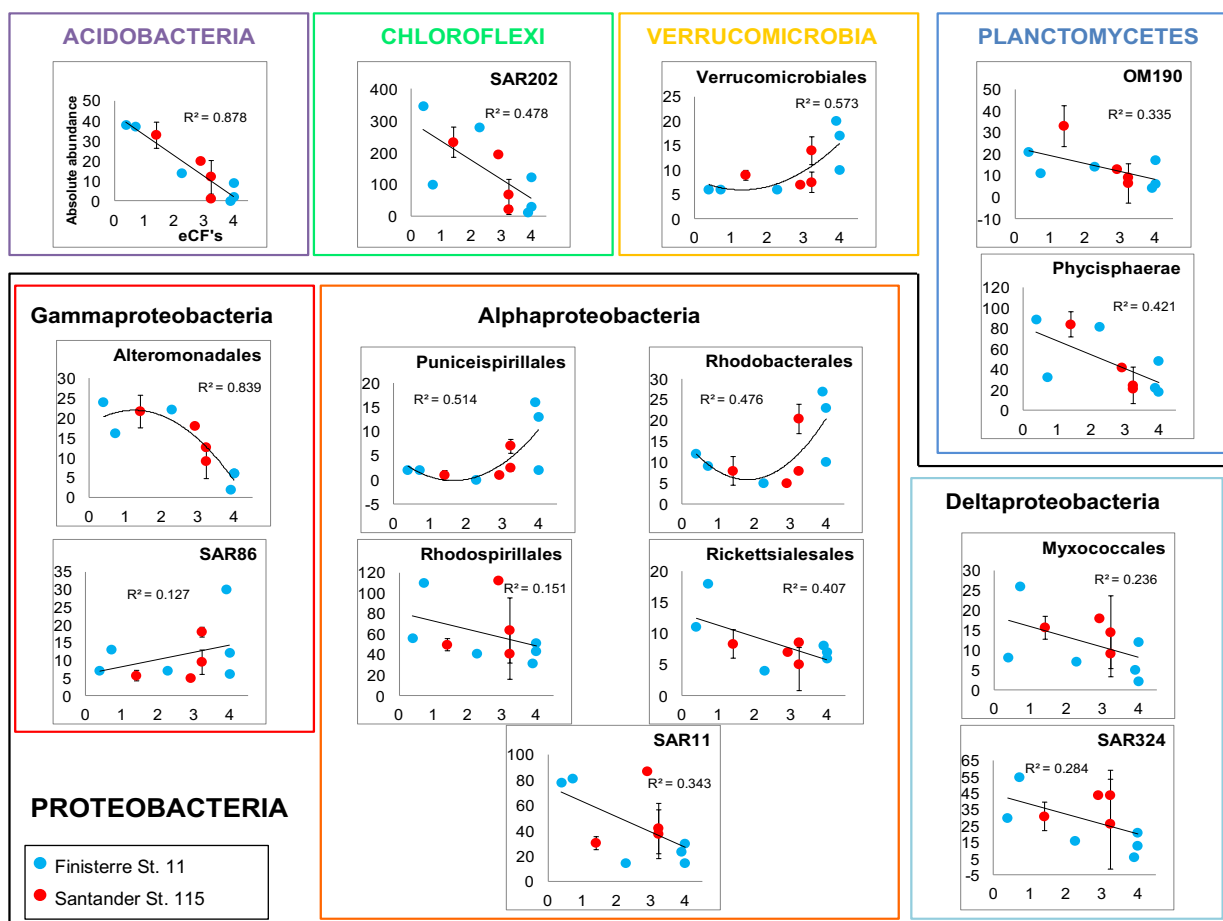


Fig. 7. Relación entre la abundancia de diferentes grupos filogenéticos y los valores de los eCFs. Las barras de error muestran la desviación estándar de la abundancia total promedio de cada filotipo para cada rango de profundidad cubierto por cada eCF ($n=2$ en la estación 115: 250 y 500 m; y $n=3$ en la estación 115: 1950, 2750 y 3950 m).

4. DISCUSIÓN

Las costas de Finisterre y Santander en el Atlántico Norte, forman parte de un sistema oligotrófico dónde los procesos oceanográficos que influyen en los flujos de materia orgánica y en las cadenas tróficas bacterianas son diferentes. La sección de Finisterre abarca desde la estrecha plataforma en Cabo Finisterre hasta el océano profundo al noroeste del Banco de Galicia. El cambio estacional en el régimen de vientos induce estacionalidad en la circulación, con afloramiento en primavera-verano. Dicho afloramiento exporta materia orgánica de la costa hacia mar adentro, que posteriormente se hunde llegando a alcanzar hasta el nivel mesopelágico debido a la intensa mezcla vertical (Ruiz-Villareal *et al.*, 2006). Por el contrario, la sección que ocupa la plataforma estrecha de Santander es una zona del talud compleja con presencia de cañones, donde la influencia del afloramiento estacional es menos importante que en la de Finisterre. Por lo tanto, este ecosistema respresenta un área de estudio ideal para investigar como la composición y la diversidad de la DOM conforma las comunidades bacterianas, y viceversa.

4.1. Estimación de eCFs y variabilidad en la producción bacteriana heterotrófica

El primer objetivo de este estudio era determinar factores de conversión Leucina-Carbono empíricos para estimar la actividad heterotrófica bacteriana en toda la columna de agua. Nuestros resultados muestran por primera vez el amplio rango de variabilidad que tienen los eCFs en aguas subsuperficiales, intermedias y profundas, y en consecuencia, la elevada variabilidad vertical en la HBP, en dos secciones del Atlántico Norte (NO Península Ibérica). Los valores de eCFs reportados en este estudio para la capa subsuperficial (0 - 499 m) de las costas de Finisterre y Santander varían de 2.27 - 4.00 KgC mol Leu⁻¹, en contraste con estudios previos que han determinado eCFs con el mismo método en aguas superficiales (<200 m) de una gran variedad de ambientes marinos, obteniendo valores más bajos en otras zonas de océano abierto (<2 KgC mol Leu⁻¹) (Teira *et al.*, 2015; Calvo-Díaz y Morán, 2009; Li *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2001), y valores similares (0.29 - 3.25 KgC mol Leu⁻¹) a los de nuestro estudio en otras zonas costeras (Pedrós-Alió *et al.*, 1999; Morán *et al.*, 2002). Esta diferencia puede ser debido al aumento en los sustratos orgánicos en esta área (Doval *et al.*, 1998, Valencia *et al.*, 2003; Teira *et al.* 2003, Bode *et al.*, 2006). Asimismo, nuestro trabajo ha demostrado que el uso del factor de conversión teórico (1.55 KgC mol Leu⁻¹), propuesto por Simon y Azam, 1989, causaría una subestimación de la HBP en aguas subsuperficiales e intermedias (0 - 1000 m), y una sobreestimación de la HBP en aguas profundas (>1000 m), con respecto a los valores de producción bacteriana estimados usando los eCFs obtenidos en este trabajo.

En ambientes oligotróficos, los eCFs bajos, se atribuyen al gasto energético que se centra en salvaguardar procesos metabólicos más que en producir biomasa bacteriana (HBP baja), de modo que la respiración de Leucina es destinada primordialmente al mantenimiento de las células (Li *et al.*, 2018). En las aguas subsuperficiales de nuestro estudio ocurre lo contrario, los eCFs son altos en ambas secciones y pueden no tener carencia de estos sustratos orgánicos. Por lo tanto, la incorporación de Leucina a través de la respiración puede destinarse exclusivamente a la producción de biomasa (altos eCFs y alta HBP), en comparación con otras zonas de océano abierto.

En este estudio los rangos de HBP obtenidos (aguas subsuperficiales: 0.368 – 206.154 $\mu\text{molC m}^{-3}\text{d}^{-1}$; intermedias: 0.017 – 62.644 $\mu\text{molC m}^{-3}\text{d}^{-1}$; profundas: 0.0002 – 0.489 $\mu\text{molC m}^{-3}\text{d}^{-1}$) fueron similares a los valores descritos en la literatura (10.833 – 293.333 $\mu\text{molC m}^{-3}\text{d}^{-1}$) para aguas superficiales de ambientes ricos en nutrientes y con afloramientos fitoplanctónicos (Barbosa *et al.*, 2001; Pedrós-Alió *et al.*, 1999). Los valores por debajo de los mínimos reportados corresponden a aguas a profundidades inferiores a la zona eufótica en su mayoría (14 de 18 estaciones), donde la producción bacteriana decrece significativamente.

Además, la HBP estimada en la sección de Santander fue casi el doble que la medida en la sección de Finisterre, particularmente en las capas subsuperficial e intermedia, probablemente por la presencia de un afloramiento en el momento del muestreo, caracterizado por un desplazamiento de aguas más profundas hacia superficie con temperaturas bajas, alta salinidad, y baja concentración de oxígeno disuelto (Fig. 2).

4.2. Índices de diversidad y distribución vertical de los principales filotipos bacterianos

Los estimadores de diversidad y riqueza de especies (H' y S_{Chao1}) indican una mayor riqueza y diversidad de especies en la costa de Santander frente a la de Finisterre. La riqueza de especies basada en filotipos ‘raros’ aumentó con la profundidad, sugiriendo que las aguas intermedias y profundas son habitadas en su mayoría por OTUs con bajas abundancias y gran especificidad, mientras que las aguas subsuperficiales se encuentran dominadas por los OTUs más ubicuos.

En este trabajo se encontraron comunidades bacterianas con estructuras diferentes en las estaciones 11 y 115. La costa de Finisterre fue caracterizada por una heterogeneidad en la estructura vertical de la comunidad microbiana, mientras que en la costa de Santander los filotipos presentaron un patrón vertical más homogéneo (Fig. 5). En la estación 115 de Santander, SAR11 (Alphaproteobacteria) fue el filotipo más abundante y disminuyó con la profundidad, lo cual es consistente con lo encontrado por Dobal-Amador *et al.*, 2016, Mary *et al.*, (2006) y Schattenhofer

et al., 2009 para el Atlántico. Sin embargo, en Finisterre este fue más abundante en las dos muestras más profundas (1150 y 1950 m), y no mostró ningún patrón de distribución claro con la profundidad. En conjunto, nuestros resultados confirman la dominancia de este grupo en las aguas superficiales, pero también en aguas intermedias (~1000 m). Otros grupos en abundancias más bajas como Rhodobacterales, Chlamydiales, Acidimicrobia, Verrucomicrobiales y Bacteroidia disminuyeron con la profundidad, probablemente relacionado con una mayor disponibilidad y consumo de sustratos orgánicos lábiles, procedentes de la actividad fitoplanctónica en aguas superficiales, por parte de estos grupos (Schattenhofer *et al.*, 2009). En contraste, Phycisphaerae, Acidobacteria, SAR202 y Alteromonadales fueron más abundantes en aguas profundas. SAR202 es un grupo bien adaptado para explotar fuentes de DOM disponibles en las zonas batipelágicas (Dobal-Amador *et al.*, 2016), se ha encontrado evidencia de que las células de SAR202 son más grandes que el promedio de las células del bacterioplancton de aguas profundas lo que sugiere que este grupo podría ser particularmente activo dentro de la comunidad bacteriana de aguas profundas y podría tener la capacidad de explotar rápidamente las bajas concentraciones de nutrientes en el océano profundo (Varela *et al.*, 2008). Esto podría suponer una serie de ventajas adaptativas de las bacterias que habitan en ambientes con poca DOM, comparado con filotipos que dominan aguas superficiales. Asimismo, SAR324 (Gammaproteobacteria) presenta genes relacionados con la quimiolitotrofia (Swan *et al.*, 2011), lo cual podría ser indicador de otro filotipo oportunista del océano profundo. Finalmente, uno de los grupos que no mostró ningún patrón claro en la vertical, pero fue muy abundante a través de la columna de agua en ambas secciones, fue SAR406 (Marinimicrobia) de acuerdo con lo observado anteriormente por Dobal-Amador *et al.* (2016) para las aguas profundas del Atlántico Norte. Puniceispirillales fue particularmente bajo en sus valores de abundancia relativa en Santander con respecto a los demás filotipos y en comparación con Finisterre. Sin embargo, dada su mínima contribución en aguas intermedias y profundas en las dos secciones, su presencia no puede ser atribuida a cambios físico-químicos en la columna de agua.

4.3. Relación entre los eCFs, la composición de la comunidad bacteriana y la DOM

No se observaron correlaciones significativas entre el índice de diversidad de Shannon (H') y los eCFs, pero sí una fuerte correlación inversa entre los CFs y la riqueza de especies estimada por $Chao_1$, sugiriendo que los cambios en los valores de eCFs podrían estar determinados al menos parcialmente por cambios en la presencia de filotipos 'raros'. La riqueza de estas especies raras con bajas abundancias, aumenta con la profundidad donde encontramos los valores mínimos de eCFs. De modo que, la alta HBP no se atribuye a la presencia de filotipos 'raros',

sino a la presencia de los filotipos más abundantes habitando en la capa subsuperficial y produciendo mayores cantidades de biomasa, gracias a la alta disponibilidad de sustratos y condiciones favorables (ej. mayor temperatura). SAR202 (*Chloroflexi*) y SAR11 (*Alphaproteobacteria*), fueron los dos filotipos más abundantes en las dos secciones. Las abundancias totales de ambos se relacionaron con los eCFs de forma inversa. Carlson *et al.*, (2009) mencionan que SAR11, un grupo de bacterias muy abundante y cosmopolita, parece jugar un papel importante en la oxidación de carbono orgánico en las aguas superficiales de los océanos, de modo que la distribución vertical de SAR11 fluctuó positivamente con la distribución vertical de los eCFs. Por otro lado, SAR202 ha sido descrito como un filotipo bacteriano típico de las aguas profundas del Atlántico Norte (Varela *et al.*, 2008), cuya alta abundancia podría ser relevante para la determinación de los eCFs. *Acidobacteria* y *Alteromonadales* fueron los filotipos que mostraron mayor relación entre sus abundancias totales y los eCFs de forma inversa, explicando su variabilidad en un 87% y 83% respectivamente. Finalmente, *Verrucomicrobiales* y *Puniceispirillales* mostraron una relación positiva con los eCFs explicando un 57% y un 51% de su variabilidad, sugiriendo que estos grupos podrían jugar un papel importante para la determinación de la producción heterotrófica bacteriana.

La concentración de DOC mostró una correlación positiva con los eCFs ($r= 0.817$, $p=0.002$ coeficiente de Pearson), sugiriendo que a mayor concentración de sustratos orgánicos mayor actividad microbiana. La variable FDOM-M mostró una distribución decreciente inversamente correlacionada con los eCFs, sugiriendo que la DOM refractaria (compuestos húmicos) asociada al océano profundo (Dobal-Amador, *et al.*, 2016) está relacionada con valores bajos de eCFs y vinculada a filotipos microbianos específicos como por ej. SAR202. Por el contrario, los filotipos dominantes en aguas subsuperficiales (ej. SAR11) podrían preferir ambientes con DOM lábil (materiales proteicos) para realizar procesos metabólicos como la incorporación de Leucina, y en consecuencia, una mayor HBP, comparado con ambientes donde el DOM refractario generado por comunidades microbianas a través del metabolismo respiratorio es la fracción mayoritaria, como por ej. los ecosistemas profundos (Guerrero-Feijóo *et al.*, 2017). La fuerte correlación positiva entre FDOM-T (materiales proteicos ‘lábil’) y los eCFs respaldan esta hipótesis ($r=0.647$, $p=0.005$ coeficiente Pearson). Tanto aCDOM₂₅₄ como aCDOM₃₄₀ se usan como “proxy” de la concentración de la DOM cromófora en sistemas acuáticos, aunque indican diferentes fracciones de DOM cromófora. aCDOM₂₅₄ es representativo de la concentración de dobles enlaces de carbono conjugados (Lønborg y Álvarez-Salgado, 2014), y aCDOM₃₄₀ y aCDOM₃₆₅ son representativos del grado de aromaticidad (Jørgensen *et al.*, 2014; Catalá *et al.*, 2016; 2018). Nuestros resultados sugieren que los eCFs están asociados con los

compuestos aromáticos de la DOM, y además aumentan a medida que la DOM tiene un grado de aromaticidad mayor (aCDOM₃₄₀, $r=0.655$, $p=0.018$ coef. Pearson vs. aCDOM₃₆₅, $r=0.464$, $p=0.060$ coef. Pearson). La aromaticidad indica que dichos compuestos son capaces de absorber la radiación UVB, lo que resulta en una mayor susceptibilidad a la fotodegradación (Nelson *et al.*, 2004; Catalá *et al.*, 2015). En superficie, por tanto, la alta HBP debería estar asociada en mayor medida a DOM con un grado de aromaticidad menor (aCDOM₃₄₀) para evitar la fotodegradación. Finalmente, la relación entre la aromaticidad y peso molecular de la DOM dado por sCDOM₂₇₅₋₂₉₅ no fue determinante para explicar la variabilidad de los eCFs.

5. CONCLUSIONES

- Los eCFs indicaron un amplio rango de variabilidad en toda la columna de agua, y son especialmente necesarios para la determinación precisa de la HBP. Los eCFs disminuyeron con la profundidad. Tanto la HBP empírica como la teórica disminuyeron con la profundidad, y de costa a océano. Sin embargo, en las capas subsuperficial e intermedia, la HBP teórica fue subestimada. En contraste, la HBP teórica fue sobreestimada en aguas profundas con respecto a la HBP empírica.
- La fuente de variabilidad en los eCFs, fue explicada por una parte por la concentración del DOC y las variables ópticas de la DOM asociadas a la abundancia de dobles enlaces de carbono conjugados (aCDOM₂₅₄), y a compuestos con bajo grado de aromaticidad (aCDOM₃₄₀). Adicionalmente, parte de la variabilidad en los eCFs también fue explicada por la riqueza de OTUs menos abundantes o ‘raros’.
- SAR202 fue el filotipo más abundante y dominó las aguas profundas, explicando el 48% de la variación en los eCFs. Acidobacteria y Alteromonadales fueron los filotipos que mostraron una correlación más elevada con los eCFs.
- En conjunto, nuestros resultados indican que el DOC y las variables ópticas de la DOM junto con la composición de la comunidad bacteriana contribuyen en diferente medida a explicar la variabilidad de los eCFs.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Sáez, L., Pinhassi, J., Pernthaler, J., y Gasol, J. M. (2010). Leucine-to-carbon empirical conversion factor experiments: does bacterial community structure have an influence? *Environ. Microbiol.* 12: 2988–2997.
- Álvarez-Salgado, X. A., y Miller, A. E. J. (1998) Simultaneous determination of dissolved organic carbon and total dissolved nitrogen in seawater by high temperature catalytic oxidation: conditions for precise shipboard measurements. *Marine Chemistry* 62 (3–4): 325-333.
- Aristegui, J., Gasol, J. M., Duarte, C. M., y Herndl, G. J. (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnol. Oceanogr.* 54: 1501-1529.
- Barbosa, A. B., Galvão, H. M., Mendes, P. A., Álvarez-Salgado, X. A., Figueiras, F. G., y Joint, I. (2001). Short-term variability of heterotrophic bacterioplankton during upwelling off the NW Iberian margin. *Prog. Oceanogr.* 51: 339–359
- Bjørnsen, P. K., y Kuparinen, J. (1991). Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the Southern Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71: 185–194.
- Bode, A., Álvarez-Osorio, M. T., y Varela, M. (2006). Phytoplankton and macrophyte contributions to littoral food webs in the Galician upwelling estimated from stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 318:89.
- Calvo-Díaz, A., y Morán, X. A. G. (2006). Seasonal dynamics of picoplankton in shelf waters of the southern Bay of Biscay. *Aquat. Microb. Ecol.* 42: 159-174.
- Calvo-Díaz, A., y Morán, X. A. G. (2009). Empirical leucine-to-carbon conversion factors for estimating heterotrophic bacterial production: seasonality and predictability in a temperate coastal ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3216–3221.
- Carlson, C. A., Morris, R., Parsons, R., Treusch, A. H., Giovannoni, S. J., y Vergin, K. (2009). Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *ISME Journal* 3: 283-295.
- Catalá, T. S., Álvarez-Salgado, X. A., Otero, J., Iuculano, F., Companys, B., Horstkotte, B., Romera-Castillo, C., Nieto-Cid, M., Latasa, M., Morán, X. A., Gasol, et al. (2016). Drivers of fluorescent dissolved organic matter in the global epipelagic ocean. *Limnol. Oceanogr.* 61: 1101–1119.
- Catalá, T. S., Reche, I., Álvarez, M., Khatiwala, S., Guallart, E. F., Benítez-Barrios, V. M., Fuentes-Lema, A., Romera-Castillo, C., Nieto-Cid, M., et al. (2015). Water mass age and aging driving chromophoric dissolved organic matter in the dark global ocean. *Global Biogeochem. Cy.* 29.
- Catalá, T., Martínez Pérez, A., Nieto-Cid, M., Álvarez, M., Otero, J., Emelianov, M., Reche, I., Aristegui, J., y Álvarez-Salgado, X. A. (2018). Dissolved Organic Matter (DOM) in the open Mediterranean Sea. I. Basin-wide distribution and drivers of chromophoric DOM. *Progress in Oceanography* 165: 35-51.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation/emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51: 325-346.
- Coble, P. G. (2007). Marine optical biogeochemistry: The chemistry of ocean color. *Chem. Rev.* 107: 402-418.
- Cole, J. J., Findlay, S., y Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and salt water ecosystems: across – system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43: 1–10.
- Dobal-Amador, V., Nieto-Cid, M., Guerrero-Feijóo, E., Hernando-Morales, V., Teira, E., y Varela, M. M. (2016). Vertical stratification of bacterial communities driven by multiple environmental factors in the waters (0-5000 m) off the Galician coast (NW Iberian margin). *Deep-Sea Res. I* 114: 1–11.

- Doval, M. D., Nogueira, E., y Pérez, F. F. (1998). Spatio-temporal variability of the thermohaline and biogeochemical properties and dissolved organic carbon in a coastal embayment affected by upwelling: The ria de vigo (nw Spain). *Journal of Marine Systems*. **14**: 135-150.
- Fuhrman, J. (1992). "Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web," in *Primary Productivity and Bio-geochemical Cycles in the Sea*, eds P.G. Falkowski and A.D. Woodhead (New York, NY: Plenum Press), 361–383.
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., y Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 133-146.
- Fuhrman, J. A., y Azam, F. (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl Environ Microbiol* **39**: 1085–1095.
- Gasol, M., Zweifel, U., Peters, F., Fuhrman, J. D., y Hagström, H., (1999). Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in Natural Planktonic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 104475–104483.
- Green, S. A., y Blough, N. V. (1994). Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **29** (8): 1903–1916.
- Guerrero-Feijóo, E., Nieto-Cid, Mar., Sintes, E., Dobal-Amador, V., Hernando-Morales, V., Álvarez, M., Balagué, V., y Varela, M. M. (2017). Optical properties of dissolved organic matter relate to different depth-specific patterns of archaeal and bacterial community structure in the North Atlantic Ocean, *FEMS Microbiology Ecology* **93** (1).
- Helms, J. R., Stubbins, A., Ritchie, J. D., et al. (2008). Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 2170-2180.
- Huse, S. M., Welch, D. M., Morrison, H. G., y Sogin, M. L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* **12**: 1889-1898.
- Jørgensen, L., Stedmon, C. A., Granskog, M. A., y Middelboe, M. (2014). Tracing the long-term microbial production of recalcitrant fluorescent dissolved organic matter in seawater. *Geophys. Res. Lett.* **41**: 2481–2488.
- Karl, D. M., Knauer, G. A., y Martin, J. H. (1988). Downward flux of particulate organic matter in the ocean: a particle decomposition paradox. *Nature* **332**: 438–441.
- Kirchman, D. L., y Ducklow, H. W. (1993). Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production. En: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, editors Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B., y Cole, J. J., Lewis Publishers, p. 513-517.
- Kirchman, D., Ducklow, H. W., y Mitchell, R. (1982). Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1296–1307.
- Kirchman, D., Knees, E., y Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 599–607.
- Li, X., Xu, J., Shi, Z., Li, Q., y Li, R. (2018). Variability in the empirical leucine-to-carbon conversion factors along an environmental gradient. *Acta Oceanologica Sinica*, **37**(4): 77-82.
- Logue, J. B., Stedmon, C., Kellerman, A. M., Nielsen, N. J., Andersson, A. F., Laudon, H., et al. (2016). Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter. *The I S M E Journal*, **10**(3): 533-545.
- Lønborg, C., y Álvarez-Salgado, X. A. (2014). Tracing dissolved organic matter cycling in the eastern boundary of

- the temperate North Atlantic using absorption and fluorescence spectroscopy. *Deep. Res. Part I* 85: 35–46.
- Mapelli, F., Varela, M. M., Barbato, M., Alvarino, R., Hernando-Morales, V., Fusi, M., Álvarez, M., Merlino, G., Daffonchio, D., Teira, E., y Borin, S.: Corrección de "Biogeography of planktonic bacterial communities across the whole Mediterranean Sea" publicado en *Ocean Sci.* 9: 585–595, 2013, *Ocean Sci.*, 9, 681-681.
- Mary, I., Heywood, J. L., Fuchs, B. M., Amann, R., Tarran, G. A., y Burkill, P. H. (2006). SAR11 dominance among metabolically active low nucleic acid bacterioplankton in surface waters along an Atlantic meridional transect. *Aquat. Microb. Ecol.* 45: 107–113.
- Milici, M., Vital, M., Tomasch, J., Badewien, T. H., Giebel, H. A., Plumeier, I., Wang, H., Pieper, D. H., Wagner-Döbler, I., y Simon, M. (2017). Diversity and community composition of particle-associated and free-living bacteria in mesopelagic and bathypelagic Southern Ocean water masses: evidence of dispersal limitation in the Bransfield Strait. *Limnol Oceanogr* 62(3): 1080–1095.
- Morán, X. A., Gasol, J., Pedrós-Alió, C., y Estrada, M. (2002). Partitioning of phytoplankton organic carbon production and bacterial production along a coastal-offshore gradient in the NE Atlantic during different hydrographic regimes. *Aquat. Microb. Ecol.* 29: 239-252.
- Nelson, N. B., Carlson, C. A., y Steinberg, D. K. (2004). Production of chromophoric dissolved organic matter by Sargasso Sea microbes. *Mar. Chem.* 89: 273–287.
- Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A., y Pérez, F. F. (2006). Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1391-1400.
- Norland, S. (1993). The relationship between biomass and volume of bacteria. En: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, editors Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B., y Cole, J. J., Lewis Publishers, p. 303- 307.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., y Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pearson, K. (1920). Notes on the history of correlation. *Biometrika* 13: 25–45.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J. I., Guixa-Boixereu, N., Estrada, M., y Gasol, J. M. (1999). Bacterioplankton and phytoplankton biomass and production during summer stratification in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research I* 46: 985–1019.
- Prieto, E., González-Pola, C., Lavín, A., Sánchez, R. F., y Ruiz-Villarreal, M. (2013). Seasonality of intermediate waters hydrography west of the Iberian Peninsula from an 8 yr semiannual time series of an oceanographic section, *Ocean Sci.* 9: 411-429.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, K., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41.
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL
- Ruiz-Villarreal M., Gonzalez-Pola C., Diaz del Rio G., Lavin A., Otero P., Piedracoba S., y Cabanas J. M. (2006). Oceanographic conditions in North and Northwest Iberia and their influence on the Prestige oil spill, *Marine Pollution Bulletin* 53: 220-238.
- Sarmiento, H., Morana, C., y Gasol, J. M. (2016). Bacterioplankton niche partitioning in the use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon: quantity is more important than quality. *ISME Journal.* 10: 2582–2592.
- Schattenhofer, M., Fuchs, M. B., Amann, R., Zubkov, M., Tarran, G., y Pernthaler, J. (2009). Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 11: 2078-93.

- Schloss, P. D., Wescott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537-41.
- Shapiro, S. S., y Wilk, M. B. (1965) An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Simon, M., y Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 201–213.
- Smith, D. C., y Azam, F. (1992). A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar. Microb. Food Webs* 6: 107–114.
- Stedmon, C. A., y Nelson, N. B. (2015). The optical properties of DOM in the ocean. In: Hansell DA, Carlson CA (eds.) *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, 2° edn. Academic Press/Elsevier. 481-508.
- Steinberg, D. K., Van Mooy, B. A. S., Buesseler, K. O., Boyd, P. W., Kobari, T., y Karl, D. M. (2008). Bacterial vs. zooplankton control of sinking particle flux in the ocean's twilight zone. *Limnol. Oceanogr.* 53: 1327–1338.
- Swan, B. K., Martinez-Garcia, M., y Preston, C. M. (2011). Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science* 333: 1296–1300.
- Teira, E., Abalde, J., Alvarez-Ossorio, M. T., Bode, A., Cariño, C., Cid, A., Fernández, E., González, N., Lorenzo, J., Valencia, J. y Varela, M. (2003). Plankton carbon budget in a coastal wind-driven upwelling station off A Coruña (NW Iberian Peninsula). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 265: 31-43.
- Teira, E., Hernando-Morales, V., Cornejo-Castillo, F. M., Alonso-Sáez, L., Sarmento, H., Valencia-Vila, J., Serrano Catalá, T., Hernández-Ruiz, M., Varela, M. M., Ferrera, I., Gutiérrez Morán, X. A., y Gasol, J. M. (2015). Sample dilution and bacterial community composition influence empirical leucine-to-carbon conversion factors in surface waters of the world's oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 8224-8232.
- Valencia, J., Abalde, J., Cid, A., Fernández, E., González, N., Lorenzo, J., et al. (2003). Variations in planktonic bacterial biomass and production, and phytoplankton blooms off A Coruña (NW Spain). *Sci. Mar.* 67:143.
- Varela, M. M., van Aken, H. M., Sintés, E., Reinthaler, T., y Herndl, G. J. (2011). Contribution of Crenarchaeota and Bacteria to autotrophy in the North Atlantic interior. *Environ. Microbiol.* 13: 1524–1533.
- Varela, M., van Aken, H.M., Sintés, E., y Herndl, G. J. (2008). Latitudinal trends of Crenarchaeota and Bacteria in the meso- and bathypelagic waters of the eastern north Atlantic. *Environ Microbiol* 10: 110–124.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., y Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261-7.
- Yamada, N., Fukuda, H., Ogawa, H., Saito, H., y Suzumura, M. (2012). Heterotrophic bacterial production and extracellular enzymatic activity in sinking particulate matter in the western North Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology* 3: 379.