



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Diversidad y dinámica estacional del bacterioplancton en el afloramiento costero de Galicia (NO España) en el contexto del cambio global

Diversidade e dinámica estacional do bacterioplancton no afloramento costeiro de Galicia (NO España) no contexto do cambio global

Diversity and seasonal dynamics of bacterioplankton in the coastal upwelling of Galicia (NW Spain) in the context of global change

Iago Cruz Quintás

Curso: 2019/2020. Convocatoria: Septiembre

Directores: Marta M. Varela Rozados y M^a Esther Rodríguez Belmonte

Dna. María Esther Rodríguez Belmonte, profesora titular do Departamento de Bioloxía da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña, e Dna. Marta M. Varela Rozados, do Instituto Español de Oceanografía, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao "***Diversidade e dinámica estacional do bacterioplancton no afloramento costeiro de Galicia (NO España) no contexto do cambio global.***" presentado polo alumno **Iago Cruz Quintás**, para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 13 de Setembro do 2020

RODRIGUEZ
BELMONTE
MARIA
ESTHER - DNI
32776974L

Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ BELMONTE MARIA
ESTHER - DNI 32776974L
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A
CORUÑA, ou=CERTIFICADO
ELECTRONICO DE EMPLEADO
PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=6682,
serialNumber=IDCES-32776974L,
sn=RODRIGUEZ BELMONTE,
givenName=MARIA ESTHER,
cn=RODRIGUEZ BELMONTE MARIA
ESTHER - DNI 32776974L
Fecha: 2020.09.13 19:10:47 +02'00'

Asinado: M. Esther Rodríguez Belmonte

VARELA
ROZADOS
MARTA
MARIA -
34897194F

Asinado: Marta M. Varela Rozados

ÍNDICE.

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Sitio de estudio y muestreo.	7
3.2. Variables hidrográficas.....	8
3.3. Biomasa bacteriana.	9
3.4. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación del 16S.	10
3.5. Representación de datos y tratamiento estadístico.	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Variables ambientales.	12
4.2. Biomasa microbiana total y de alto contenido en ADN.....	15
4.3. Diversidad y composición de la comunidad bacteriana.....	16
4.5. Relación entre la composición de la comunidad bacteriana y las variables ambientales.....	23
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

El bacterioplancton está constituido por bacterias, mayoritariamente heterótrofas, que forman parte de los organismos planctónicos. Estas bacterias son componentes relevantes en los ciclos biogeoquímicos al degradar la materia orgánica disuelta (MOD) exudada por los organismos fitoplanctónicos y liberar nutrientes inorgánicos volviendo a estar disponibles por la cadena trófica marina y, por lo tanto, poder ser empleada de nuevo por el fitoplancton. Aunque la abundancia del bacterioplancton es universal se han observado cambios en la estructura y composición de su comunidad asociados a variaciones hidrográficas.

La costa gallega, situada al noroeste de la Península Ibérica, se caracteriza por presentar momentos de afloramiento, debido a vientos del norte entre los meses de marzo-abril hasta septiembre-octubre, seguida por momentos de hundimiento favorecido por vientos del sur que predominan el resto del año (de octubre a marzo). Estos afloramientos permiten la llegada de nutrientes a zonas superficiales incrementando la productividad en estas zonas.

En este estudio se recogen las variaciones estacionales del bacterioplancton desde la superficie hasta los 70 metros de profundidad y su relación con las variables ambientales. Nuestro trabajo concluye que en la costa de A Coruña existe una gran variedad de grupos taxonómicos siendo las Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias, los filos más abundantes. Además, se obtuvo una clara diferenciación en la composición bacteriana entre las muestras agrupadas por afloramiento y hundimiento y una correlación entre la distribución en la composición de la comunidad bacteriana con las variables ambientales.

RESUMO

O bacterioplancton está constituído por bacterias, maioritariamente heterótrofas, que forman parte dos organismos planctónicos. Estas bacterias son compoñentes importantes nos ciclos bioxeoquímicos ao degradar a materia orgánica disolta (MOD) exudada polos organismos fitoplanctónicos e liberar nutrientes inorgánicos volvendo a estar dispoñibles pola cadea trófica mariña e, polo tanto, puidendo volver ser consumida polo fitoplancton. Aínda que a abundancia do bacterioplancton é universal, observáronse cambios na estrutura e composición da súa comunidade asociada a variacións hidrográficas.

A costa galega, situada ao noroeste da Península Ibérica, caracterízase por presentar momentos de afloramento debidos a ventos do norte entre os meses de marzo-abril ata setembro-outubro, seguida por momentos de afundimento favorecidos por ventos do sur que predominan o resto do ano (de outubro a marzo). Estes afloramentos permiten a chegada de nutrientes a zonas superficiais incrementando a produtividade nestas zonas. Neste estudio recóllense as variacións estacionais do bacterioplancton dende a superficie ata 70 metros de profundidade e a súa relación coas variables ambientais como a salinidade, temperatura, nutrientes inorgánicos, etc. O noso traballo conclúe que a costa de A Coruña existe unha gran variedade de grupos taxonómicos sendo as Proteobacterias, Bacteroidetes e Actinobacterias, os filos máis abundantes. Ademáis, se obtivo unha clara diferenciación na composición bacteriana entre as mostras agrupadas por afloramento e afundimento e unha correlación entre a distribución na composición da comunidade bacteriana coas variables ambientais.

ABSTRACT

Bacterioplankton is made up of bacteria, mostly heterotrophic, that are part of planktonic organisms. These bacteria are relevant components in biogeochemical cycles by degrading dissolved organic matter (DOM) exuded by phytoplankton organisms and releasing inorganic nutrients, making them available again by the marine food chain and, therefore, being able to be used again by phytoplankton. Although the abundance of bacterioplankton is universal, changes have been observed in the structure and composition of its community associated with hydrographic variations.

The Galician coast, located to the northwest of the Iberian Peninsula, is characterized by upwelling moments, due to north winds between the months of March-April to September-October, followed by moments of downwelling favored by south winds that predominate the rest of the year (from October to March). These downwelling allow the arrival of nutrients to the superficial zones increasing the productivity in these zones.

This study collects the seasonal variations of the bacterioplankton from the surface to 70 meters depth and its relationship with the environmental variables. Our study concludes that on the coast of A Coruña there is a great variety of taxonomic groups, with Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria, being the most abundant phyla. In addition, a clear differentiation in the bacterial composition was obtained between the samples grouped by upwelling and downwelling and a correlation between the distribution in the composition of the bacterial community with the environmental variables.

PALABRAS CLAVE: Bacterioplancton, afloramiento, diversidad, distribución vertical y temporal, abundancia bacteriana, Galicia, NO España.

PALABRAS CLAVE: Bacterioplancton, afloramiento, diversidad, distribución vertical e temporal, abundancia bacteriana, Galicia, NO España.

KEYWORDS: Bacterioplankton, upwelling, diversity, vertical and temporal distribution, bacterial abundance, Galicia, NW Spain.

1. INTRODUCCIÓN.

El plancton es un conjunto de organismos de pequeño tamaño que se caracterizan por presentar movilidad pasiva, siendo desplazados por las corrientes de agua, y por constituir la base de las redes tróficas marinas. Prácticamente el 50% de la biomasa total está formada por el bacterioplancton (Arístegui et al., 2009), el cual, es clave en los ciclos biogeoquímicos (Furhrman et al., 2015) interviniendo tanto en el consumo como en la producción de materia orgánica e inorgánica, respectivamente (Glöckner et al., 2012).

En el medio marino, el dióxido de carbono (CO_2) es fijado por el fitoplancton y parte del mismo, es liberado a través de los exudados en forma de MOD. La degradación de la MOD es llevada a cabo por estas comunidades procariotas (tanto Bacteria como Archaeae) cuyos patrones de utilización de la MOD y su tasa de crecimiento afectan a los ciclos biogeoquímicos tanto del carbono como de otros nutrientes a escala local y global (Gasol et al., 2008; Teira et al., 2009). Tanto la tasa de suministro de la MOD como su composición son los principales factores que determinan la elevada diversidad procariota en los océanos. Los principales grupos bacterianos que representan la comunidad procariota en las aguas oceánicas superficiales son los Alfa-Beta-Gammaproteobacteria así como el grupo Bacteroidetes (Teira et al., 2009), formando todos parte de las bacterias Gram –, las cuales se caracterizan por presentar una pared celular con una fina capa de peptidoglicano y una membrana externa constituida por fosfolípidos y lipopolisacáridos. Tanto la abundancia como la actividad bacteriana disminuyen con la profundidad como consecuencia de la variación de los factores ambientales tanto físicos como químicos (Montes, 2016). Además, específicamente la abundancia relativa de diferentes grupos bacterianos está relacionada con varias variables ambientales como por ejemplo la temperatura o la salinidad (Furhman et al., 2015).

Las costas gallegas situadas al noroeste de la Península Ibérica se caracterizan por presentar períodos de afloramientos estacionales (Álvarez-Salgado et al., 1996) entre marzo y octubre, seguidos de períodos de hundimiento (Octubre a Marzo), en los que disminuyen los nutrientes inorgánicos a las capas superficiales. Por lo que, en una escala espacial reducida, permiten el estudio comparativo de condiciones hidrodinámicas caracterizadas por niveles de forzamiento físico muy marcado. Estos afloramientos son debidos a pulsos de vientos superficiales que soplan del norte, contribuyendo a la

fertilización de las Rías Gallegas ya que las masas de agua superficiales son sustituidas por masas de agua profundas frías y ricas en nutrientes inorgánicos como fosfatos y nitratos (Bode y Varela, 1998). Este proceso desencadena un “bloom” fitoplanctónico seguido de un “bloom” de zooplancton que producen MOD, que sirve de alimento al bacterioplancton. En la estación dominada por episodios de hundimiento la producción primaria baja, y se caracteriza por una acumulación de materia orgánica producida en la estación previa durante el afloramiento (Lønborg y Álvarez-Salgado, 2014).

2. OBJETIVOS.

- Determinar la diversidad y el patrón de distribución espacio-temporal del bacterioplancton en la costa de A Coruña.
- Analizar la relación existente entre las variables medioambientales de la zona estudiada y la diversidad bacteriana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Sitio de estudio y muestreo.

Las muestras objeto de estudio de este trabajo se recogieron durante los muestreos mensuales del proyecto NICANOR, vinculados a la serie temporal RADIALES del Instituto Español de Oceanografía (IEO), llevados a cabo a bordo del B/O Lura (Instituto Español de Oceanografía). Las muestras se recogieron entre febrero de 2014 y diciembre de 2015, en una estación costera de la Ría de A Coruña (NO de la Península Ibérica), en las coordenadas 43°N, 8°W'. Dicho punto se puede ver señalado en la Figura 1.

En cada fecha de muestreo, se hicieron perfiles verticales de temperatura, salinidad, y fluorescencia con una sonda de CTD (conductivity-temperature-depth) SBE-25 equipada con un fluorímetro. Las muestras de agua de 4 profundidades se recogieron con botellas Niskin de 5 L con una roseta oceanográfica acoplada al CTD. La máxima profundidad de muestreo fue a 70 metros. A continuación, se realizó el muestreo específico de microbiología en botellas de policarbonato, las cuales habían sido lavadas previamente en el laboratorio con ácido clorhídrico y agua destilada, y se realizó un aclarado previo con agua de mar en la propia embarcación.

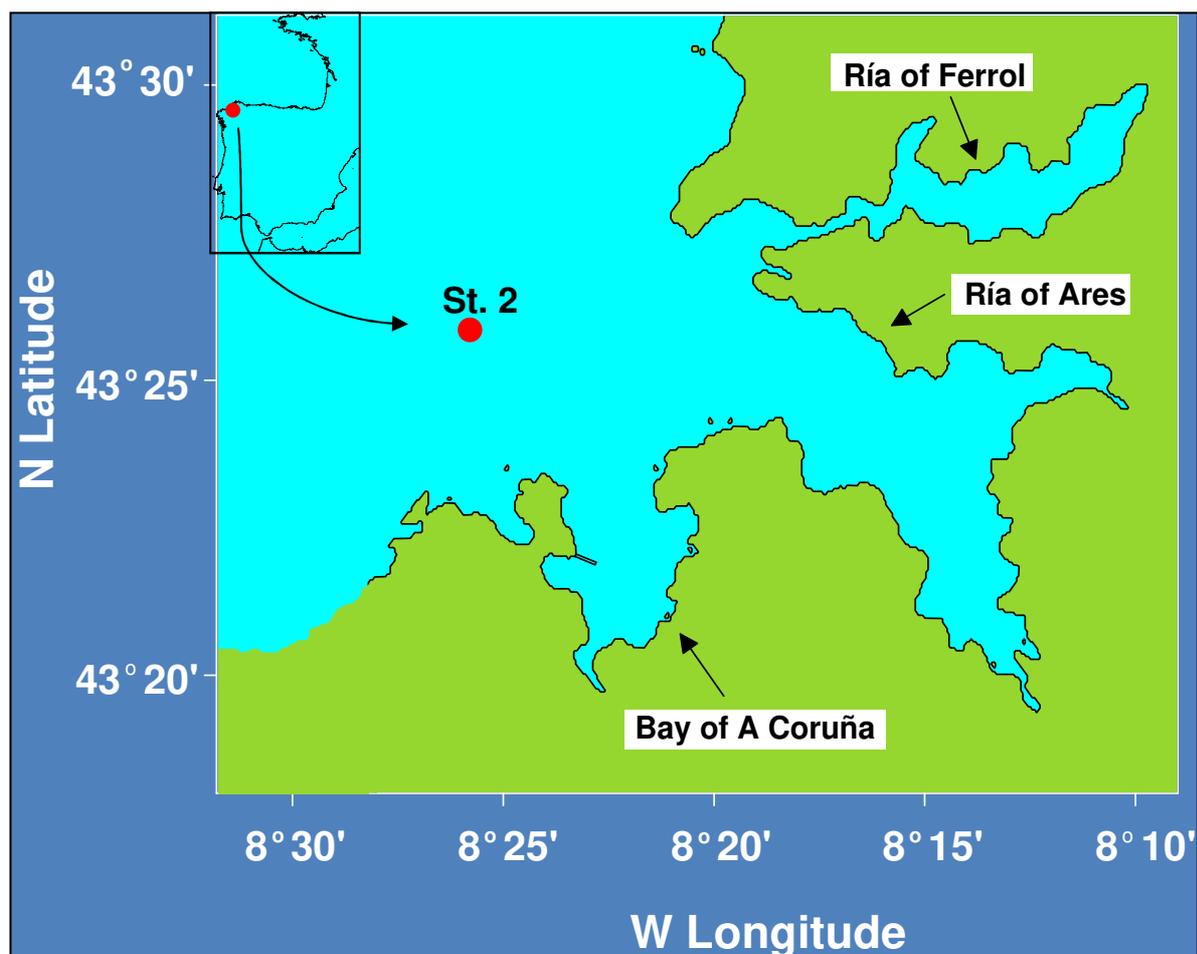


Figura 1. Localización de la estación de muestreo, St 2, próxima a la ciudad de A Coruña.

3.2. Variables hidrográficas.

Las muestras para determinar la concentración de nutrientes inorgánicos (nitrato y fosfato) se recogieron en botellas de polietileno de 50 mL para posterior congelación a -20°C y subsiguiente análisis en el laboratorio de Química Inorgánica del IEO. Las muestras fueron analizadas mediante métodos colorimétricos estándar, utilizando un Sistema de análisis de flujo segmentado de Bran-Luebbe con un autoanalizador (Hansen y Grasshoff, 1983).

También se determinó la concentración de clorofila-a. Para este propósito se tomaron muestras de 100 mL que se filtraron secuencialmente mediante un sistema de vacío a través de filtros de membrana y GF/F. Una vez realizada la filtración, los filtros fueron doblados e introducidos en viales, para ser conservados a -20°C hasta su análisis. Posteriormente se realizó la extracción de clorofila de los filtros, con acetona al 90% durante 8-10 h. en condiciones de oscuridad a 4°C , para luego determinar la

fluorescencia de clorofila-a, mediante la técnica de no acidificación (Welschmeyer, 1994) mediante un fluorímetro TD-700 calibrado con clorofila a pura.

Con la fluorescencia obtenida se calculó la concentración de clorofila a partir de la siguiente ecuación:

$$[Chla] = \frac{V_a}{V_f} [(I_a - I_b) * 0.2218]$$

Donde [Chla] corresponde a la concentración de clorofila-a en µg/L, *Ia* a la fluorescencia de clorofila-a obtenida con el fluorímetro, e *Ib* a la obtenida para el blanco. *Va* es el volumen de acetona utilizado en la extracción, y *Vf* el volumen de muestra filtrado, ambos en mL.

La tasa de producción primaria se midió usando el método de incorporación de ¹⁴C según se describe en Teira et al., (2015). Se llenaron cuatro botellas Corning previamente lavadas de 75 mL y se inocularon con 185 kBq (5µCi) de NaH ¹⁴CO₃. Las botellas se incubaron entre 3 y 4 h, para posteriormente ser filtradas secuencialmente en filtros de policarbonato de 0.2 µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro. Posteriormente se realizó la descontaminación de los filtros durante 12 h expuestos a vapor concentrado de HCl para eliminar el ¹⁴C inorgánico que no se incorporó como biomasa durante la incubación. Tras esto, los filtros se pasaron a viales de centelleo donde se les añadió 4 mL de líquido de centelleo para amplificar la emisión de energía del ¹⁴C, y tras 8 h se midió la radioactividad de cada muestra con un contador de centelleo modelo Perkin Elmer modelo Tri Carb 2800.

3.3. Biomasa bacteriana.

La abundancia de picoplancton se determinó por citometría de flujo siguiendo los protocolos de Gasol et al., (1999). A bordo se recogieron muestras de 1.8 ml que se fijaron con paraformaldehído y glutaraldehído (2-4%) para después ser congeladas en N₂ líquido durante 10 minutos y almacenadas a -80°C hasta su análisis. En el laboratorio en tierra, las muestras fueron procesadas a temperatura ambiente utilizando un citómetro de flujo, modelo FACS-Calibur de BD. Los organismos procariontes heterotróficos, se distinguieron dos grupos de bacterias: de bajo contenido en ADN (LNA, del inglés low nucleid acid) y de alto contenido en ADN (HNA, del inglés high nucleid acid). Estas dos poblaciones se diferenciaron en base a su fluorescencia verde (FL1, 530nm). Las bacterias de HNA presentaron mayor señal de fluorescencia verde que las de LNA. El bacterioplancton heterótrofo se tiñó con *Syto 13* en oscuridad durante 10 minutos, para

distinguir entre las poblaciones de los grupos anteriormente mencionados. Ambas miden entre 0.6-0.8 μm . Se usaron las calibraciones empíricas entre side scatter y el diámetro medio celular descritas en Calvo-Díaz y Morán (2006) para estimar el biovolumen (BV) de las bacterias heterótrofas. Dicho biovolumen se convirtió en biomasa usando la relación alométrica de (Norland, 1993) : $\text{fg C cell}^{-1} = 120 \times \text{BV}^{0.72}$

3.4. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación del 16S.

Para la extracción del ADN, se filtró un volumen de 2 L de agua de las botellas Niskin de cada profundidad, a través de filtros Millipore de 0.22 μm (Millipore, EE. UU.). Se añadieron 1.8 mL de *buffer* de lisis (EDTA 40 mM, 50 mM TRIS-HCl, 0.75 M de sacarosa) al cartucho del filtro y se almacenaron a -80 °C. La extracción de ADN se realizó por lisis enzimática de las células con lisoenzima y proteinasa K, seguido de la extracción con fenol-cloroformo. El ADN se precipitó mediante la adición de isopropanol. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en *buffer* TE estéril. Las muestras de ADN se cuantificaron y se verificó su calidad (según la proporción A260/A280) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, EE. UU.).

Una vez extraído, las regiones V3 a V4 del gen ARNr 16S se amplificaron mediante la implementación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el par de cebadores 341F / 805R para bacterias. Todos los productos de PCR se revisaron para el control de calidad en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p / v), luego se limpiaron y se purificaron con el kit de purificación 5-Prime ArchivePure (Fisher Scientific) y se mantuvieron a -20 ° C hasta su análisis posterior.

El ADN fue analizado mediante tecnología Illumina Miseq. Variantes exactas de la secuencia del amplicón (ASVs, del inglés exact amplicon sequence variants) se diferenciaron usando el *package* dada2 (Callahan et al., 2016) implementado en R (R Core Team, 2019), el cual resuelve ASVs de hasta 1 nucleótido de diferencia. Las secuencias se alinearon comparándolas con la base de datos SILVA 132 ARNr 16S (Quast et al., 2012). Finalmente, los singletons (ASV encontrados solo una vez en la Tabla final de ASVs) se eliminaron, ya que se ha demostrado que probablemente son el resultado de errores de PCR o secuenciación (Huse et al., 2010).

3.5. Representación de datos y tratamiento estadístico.

Para determinar la similitud entre las muestras biológicas en función de la composición de ASVs bacterianos, se llevó a cabo un análisis multidimensional no métrico (nMDS) usando la similitud Bray-Curtis. Posteriormente, las diferencias significativas de la comunidad de bacterioplancton entre muestras se determinó a través de un análisis permutacional de varianza (PERMANOVA, permutational multivariate analysis of variance) testando dos factores: el afloramiento y la profundidad. A continuación, 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 análisis de coordenada principales (PCO). Las variables ambientales utilizadas fueron la temperatura (°C), salinidad (UPS), profundidad de la capa de mezcla, el contenido en clorofila a (Chl-a, mg m⁻³), la producción primaria (PP, mg C m⁻³ d⁻¹), la concentración de nitratos (NO₃⁻, μM), y la concentración de bacterias de bajo y alto contenido en ADN (LNA y HNA, μg C L⁻¹, respectivamente). Para la matriz de similitud de las variables ambientales se empleó la similitud de distancia Euclídea. Tanto el estimador de la riqueza específica, Chao 1, como el índice de diversidad ecológica, Shannon-Weaver, fueron calculados utilizando la matriz biológica de ASVs. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa estadístico PRIMER v.6.1 (Clarke y Gorley, 2006) y PERMANOVA+ for PRIMER (Anderson et al., 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Variables ambientales.

El índice de afloramiento fue obtenido a partir de la página web del IEO (2020). Éste índice fue positivo desde mayo de 2014 hasta septiembre de ese mismo año y desde febrero hasta octubre de 2015 (exceptuando agosto y los meses de mayo y junio donde no se realizó muestreo), mientras que en los meses correspondientes con las estaciones de otoño e invierno el afloramiento mostró valores negativos (Figura 2). El valor más alto se alcanza en el mes de abril de 2015 ($540.4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ km}^{-1}$) coincidiendo con la estación de primavera y el valor más bajo se registra en diciembre del mismo año ($-1,199 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ km}^{-1}$) correspondiente con la estación de invierno.

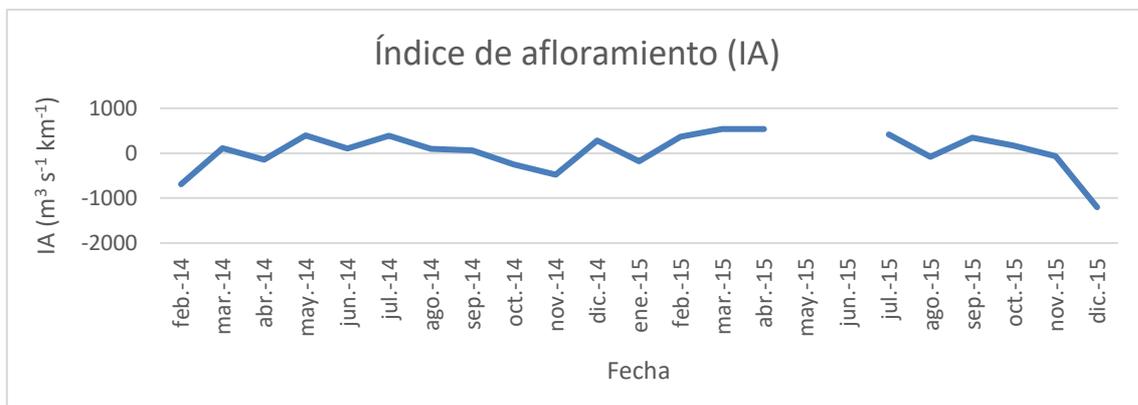


Figura 2. Distribución mensual del índice de afloramiento durante el período de los muestreos de RADIALES en la estación costera de A Coruña.

Al igual que en un estudio reciente previo (Montes et al., 2020), durante los días de afloramiento se aprecia un intenso gradiente vertical de densidad (evidente en la temperatura y la salinidad) debido a que dicho ascenso del agua profunda fría y rica en nutrientes inorgánicos, aunque esta no consigue penetrar en la capa superficial de la columna de agua.

En referente a la temperatura, se puede observar en la Tabla 1 valores más altos en las muestras superficiales (0 m) que en aquellas correspondientes a las zonas de máximo de clorofila (DCM, 40 m) y a la zona profunda (70 m). En las masas de agua superficiales, la temperatura en los meses de afloramiento se sitúa entre 13.50 y 16.40°C , mientras que en los meses de hundimiento varía entre 12.50 y 17.10°C .

Con respecto a la salinidad, esta es menor en las aguas superficiales y va aumentando con la profundidad. Además, en el mes de mayo de 2015 la salinidad disminuyó

ligeramente respecto a otros meses alcanzando valores entre 35.10 y 35.50 UPS para las muestras de 0 m y 70 m, respectivamente. El valor mínimo se registró en la muestra de febrero 2014 con un valor de 33.87 UPS. Los valores más bajos de salinidad en la zona superficial durante los meses de afloramiento coinciden con una mayor precipitación según los datos recogidos por AEMET (2020) que provocan una mayor descarga de los ríos de agua dulce al mar contribuyendo a la disminución de dicha salinidad.

Tabla 1. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y salinidad (UPS) durante los meses muestreados en la estación costera de A Coruña. Columnas azules y blancas corresponden con los meses de hundimiento y afloramiento, respectivamente.

	Prof.	Feb. 14	May. 14	Abr. 15	May. 15	Jun. 15	Jul. 15	Sep. 15	Nov. 15	Dic. 15
Temperatura	0 m	12.5	15.5	13.5	15.6	13.6	16.2	16.4	17.1	15.1
	20 m		14.6							
	40 m		13.4	11.9	15.1	12.0	13.7	14.0	17.0	14.9
	70 m			11.9	14.6	11.7	12.9	13.1	16.9	14.9
Salinidad	0 m	33.78	35.00	35.25	35.10	35.53	35.55	35.29	35.67	35.76
	20 m		35.42							
	40 m		35.48	35.60	35.22	35.62	35.62	35.60	35.68	35.76
	70 m			35.61	35.35	35.62	35.63	35.64	35.70	35.75

En lo referente a los nutrientes inorgánicos (nitratos y fosfatos), sus concentraciones son mayores en períodos de afloramiento y a 70 m de profundidad que en superficie (0 m), de acuerdo con estudios previos (Montes et al., 2020). Esto se debe a que asciende el agua fría ($<13^{\circ}\text{C}$) noratlántica central (ENACW) (Ríos et al., 1992), aflorando en cabo Finisterre. En el caso del nitrato (NO_3^-), los meses de mayo y noviembre de 2015 registran una disminución en las tres profundidades alcanzando valores $<1\mu\text{M}$ en las muestras de mayo, lo cual podría ser debido al consumo de los mismos por el fitoplancton ya que el mes posterior (junio) se registra un pico de producción primaria. Además, también se ha observado que los meses de afloramiento, la concentración de nitratos en la superficie (0 m) es en ocasiones menor que en los meses de hundimiento, debido posiblemente al intenso gradiente vertical (de T y Sal.) que actúa como una barrera para el transporte de nutrientes desde el agua de la capa de fondo hasta la superficie.

En el caso de los fosfatos (PO_4^{3-}), su concentración es mucho menor que la de nitrato ($<1\mu\text{M}$). No obstante, el patrón es similar al caso anterior con una disminución de su concentración en los meses de abril y mayo de 2015 mientras que, en verano, en el mes de septiembre, los nutrientes alcanzan una mayor concentración en la masa de agua profunda ($0.77\mu\text{M}$). En los períodos de hundimiento la mayor concentración de fosfato se obtiene a 70 m de profundidad en el mes de diciembre de 2015.

Tabla 2. Concentración de nitratos (μM) y fosfatos (μM) durante los meses muestreados en la estación costera de A Coruña. Columnas azules y blancas corresponden con los meses de hundimiento y afloramiento, respectivamente.

	Prof.	Feb. 14	May. 14	Abr. 15	May. 15	Jun. 15	Jul. 15	Sep. 15	Nov. 15	Dic. 15
Nitratos	0 m	6.90	0.13	1.30	0.00	3.69	0.10	2.40	1.06	3.42
	20 m		3.40							
	40 m		5.20	8.50	0.30	8.67	3.60	7.70	1.26	3.99
	70 m			8.60	0.72	9.13	7.60	8.60	1.34	4.61
Fosfatos	0 m	0.30	0.07	0.09	0.09	0.33	0.34	0.33	0.22	0.30
	20 m		0.29							
	40 m		0.42	0.21	0.16	0.64	0.39	0.55	0.18	0.33
	70 m			0.14	0.29	0.65	0.65	0.77	0.20	0.39

La biomasa de los microorganismos autótrofos se estima a partir de su principal pigmento fotosintético, la clorofila-a. En la Tabla 3 se aprecia como en la muestra de febrero 2014 la clorofila a no llega a 1 mg m^{-3} mientras que en mayo de ese mismo año se alcanza un valor máximo de 3.27 mg m^{-3} para la muestra de 20 m de profundidad. También se puede apreciar como en los meses de afloramiento, es decir en mayo 2014 y de abril a septiembre 2015, el contenido en Clorofila-a es mayor que en los meses de febrero 2014, noviembre y diciembre 2015, coincidiendo con los meses de hundimiento (Bode et al., 2004; Valencia et al., 2003). Además, por lo general, durante el afloramiento, las muestras situadas en el DCM (40 m) presentan mayor contenido en Clorofila-a que las muestras superficiales (0 m).

En lo referente a la producción primaria (PP), nos encontramos con un pico de producción en la muestra de junio 2015 a 0 m de profundidad relacionado con el período de afloramiento en primavera y con un gran contenido en clorofila-a (Tabla 3). En este

mismo mes, la muestra a 40 m de profundidad alcanza un valor bajo de PP, no llegando a los 20 mg C m⁻³ d⁻¹. Por otro lado, en las estaciones relacionadas con períodos de hundimiento (otoño e invierno), se registran valores más bajos de PP que en los períodos de afloramiento (Valencia et al. 2003). Esta PP proporciona materia orgánica disuelta (MOD) exudada durante el proceso fotosintético que sirve de alimento al bacterioplancton heterótrofo (Teira et al., 2009).

Tabla 3. Clorofila-a (Chl-a, mg m⁻³) y producción primaria (PP, mg C m⁻³ d⁻¹) durante los meses muestreados en la estación costera de A Coruña. Columnas azules y blancas corresponden con los meses de hundimiento y afloramiento, respectivamente.

	Prof.	Feb. 14	May. 14	Abr. 15	May. 15	Jun. 15	Jul. 15	Sep. 15	Nov. 15	Dic. 15
Chl-a	0 m	0.52	1.65	1.62	1.40	1.49	0.43	1.12	0.90	1.00
	20 m		3.27							
	40 m		1.98	2.25	1.55	0.26	0.47	0.13	0.47	0.73
PP	0 m	35.52	91.04	124.08	87.29	373.70	58.15	127.39	23.61	31.52
	20 m		141.29							
	40 m		107.41	155.79	81.58	16.45	35.26	4.72	41.28	29.40

4.2. Biomasa microbiana total y de alto contenido en ADN.

La citometría de flujo permitió la caracterización de dos grupos fisiológicos de bacterias, de bajo y alto contenido en DNA, respectivamente (LNA y HNA). En la Tabla 4 se observa como el porcentaje de HNA es superior al de LNA en todas las muestras. Los mayores valores de biomasa bacteriana total (BBt) obtenidos corresponden con los meses de mayo 2014 a septiembre 2015 durante el período de afloramiento, registrándose un valor máximo de 10.46 µg C L⁻¹ en la muestra superficial de mayo 2014. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en otras zonas geográficas (Rokkan Iversen y Seuthe, 2011; Valencia et al., 2003). Además, los valores más altos de biomasa se encontraron en las muestras situadas en la capa superficial (0 m) disminuyendo con la profundidad (Teira et al., 2003). Por otro lado, el valor más bajo se obtuvo en invierno, en concreto, en el mes de diciembre de 2015 a 70 m de profundidad (0.64 µg C L⁻¹) cuando la columna de agua se encuentra mezclada. La biomasa bacteriana se ve afectada por varios factores ambientales, como pueden ser la temperatura, salinidad y los nutrientes inorgánicos (Fuhrman et al., 2015; Kirchman, 1994).

HNA, presentó sus valores más elevados en el mes de abril de 2015 a 70 m de profundidad (92.14%), mientras que el valor más bajo ese mismo año corresponde con el mes de diciembre en la superficie ($\approx 60\%$). Desde mayo de 2015 hasta julio de ese mismo año el porcentaje de HNA se incrementa ligeramente mientras que en los siguientes meses, correspondientes a la estación de otoño e invierno, su contribución disminuye.

Tabla 4. Biomasa bacteriana total (BB total, $\mu\text{g C L}^{-1}$) y bacterias de alto contenido en ADN (HNA, %) durante los meses muestreados en la estación costera de A Coruña. Columnas azules y blancas corresponden con los meses de hundimiento y afloramiento, respectivamente.

	Prof.	Feb. 14	May. 14	Abr. 15	May. 15	Jun. 15	Jul. 15	Sep. 15	Nov. 15	Dic. 15
BB _{Total}	0 m	3.94	10.46	5.04	6.52	5.98	3.64	4.78	3.74	2.53
	40 m		5.04	3.91	5.55	1.61	2.31	2.77	3.57	2.46
	70 m			9.48	5.23	2.05	3.04	2.18	3.37	0.64
HNA	0 m	74.36	84.07	76.33	62.65	79.66	82.49	72.10	62.30	59.01
	40 m		49.66	91.35	67.05	69.58	72.69	65.54	68.10	61.99
	70 m			92.14	68.46	73.22	76.80	70.32	59.13	73.04

4.3. Diversidad y composición de la comunidad bacteriana.

El número total de secuencias diferentes obtenidas fue 495358. Después de normalizar las secuencias al menor número se obtuvieron 7591 lecturas por muestra, para igualar el esfuerzo de muestreo, y se obtuvo un total de 2505 ASVs diferentes.

Para determinar la riqueza y la diversidad específica se calculó Chao 1 y el índice de diversidad de Shannon-Weaver. Chao 1 es un estimador no paramétrico de la riqueza específica que tiene en cuenta el número de especies representadas por un individuo y el número de especies representadas por dos individuos, mientras que el índice de diversidad de Shannon-Weaver se empleó para cuantificar la diversidad específica contemplando la riqueza y la abundancia de las especies.

En la Figura 3 se muestra la diversidad bacteriana a lo largo de los meses muestreados. Junio y diciembre de 2015 fueron los meses que mayor riqueza específica presentaron con un índice de diversidad de Shannon de 2.0 ± 0.3 y 2.1 ± 0.1 , respectivamente. El menor número de ASVs/especies (129) se obtiene durante el período de hundimiento en el mes de noviembre a 40 m de profundidad, no obstante, es el mes de abril de 2015 el que

presenta la menor diversidad específica (1.8 ± 0.1). Además, se puede apreciar como el número de especies observadas y el número de especies obtenido por el estimador Chao 1 es similar, lo que quiere decir que nuestras muestras recogen prácticamente todas las especies que hay en el lugar de estudio.

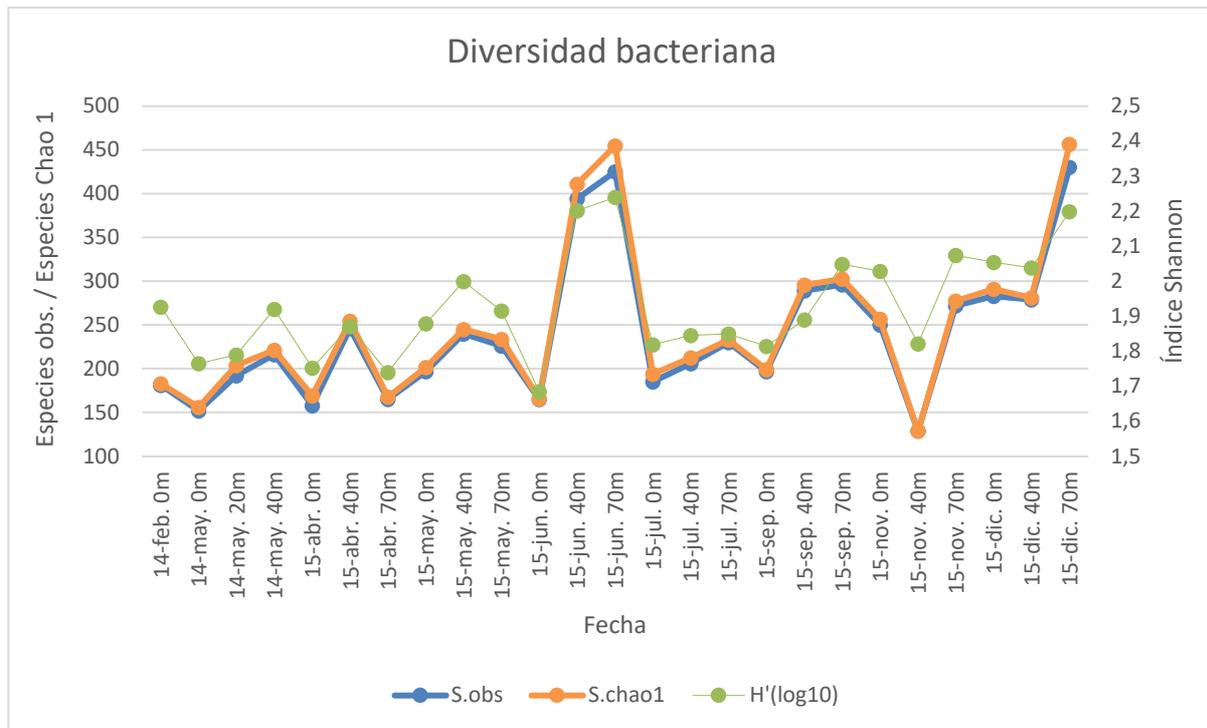


Figura 3. Diversidad bacteriana de las muestras biológicas en la estación costera de A Coruña.

Para cada uno de los diferentes ASVs se llevó a cabo el cálculo de la abundancia relativa a diferentes niveles taxonómicos que fueron agrupados en el rango taxonómico de filo y género.

En la Figura 4 se representa la abundancia bacteriana relativa a nivel de filo. La composición bacteriana en las costas gallegas concuerda con otros estudios realizados en otros ecosistemas oceánicos (Bunse et al., 2016; DeLong et al., 2006; Varela et al., 2007; Yokokawa et al., 2010). Según estos, los filos más abundantes en el agua marina son Proteobacteria, Bacteroidetes y, en menor medida, Actinobacteria concordando con los resultados de esta investigación. Proteobacteria presentó la abundancia más elevada y esta fue constante a lo largo de todos los meses muestreados. Este filo alcanzó un valor máximo de 63% para la muestra a 0 m de abril 2015 y un valor mínimo de 35% para la muestra a 70 m de profundidad de julio de ese mismo año. El segundo filo

mayoritario lo constituye Bacteroidetes con una mayor abundancia promedio en los meses de primavera-verano ($33\pm 10\%$) durante la época de afloramiento, llegando a alcanzar un valor máximo de 52% para la muestra de superficie (0 m) en el mes de julio 2015. Sus valores más bajos coinciden con los meses de otoño-invierno ($16\pm 4\%$) con un valor mínimo del 12% para la muestra de diciembre 2015 a 0 metros. Actinobacteria fue el tercer filo con mayor representación. Al contrario que Bacteroidetes, Actinobacteria presenta una menor abundancia durante los meses de afloramiento, primavera-verano ($12\pm 7\%$) incrementando sus valores durante otoño-invierno ($21\pm 4\%$). Por otro lado, el filo Verrucomicrobia presentó una abundancia relativa mayor en primavera y verano ($5\pm 3\%$) respecto a otoño e invierno ($2\pm 0.4\%$), mientras que la abundancia del filo Planctomycetes fue similar en todas las estaciones. Coincidiendo con lo encontrado en otros estudios marinos (Friedline et al., 2012; Montes, 2016; Montes et al., 2020), otros filios menos abundantes fueron Acidobacteria, Cyanobacteria, Fusobacteria, Dadabacteria, Fibrobacteres, Chloroflexi y Firmicutes con una abundancia relativa $<5\%$. También hubo un porcentaje de secuencias que no fueron asociadas con ningún grupo taxonómico específico que constituyen $\approx 0.5\pm 0.6\%$ de la abundancia total bacteriana.

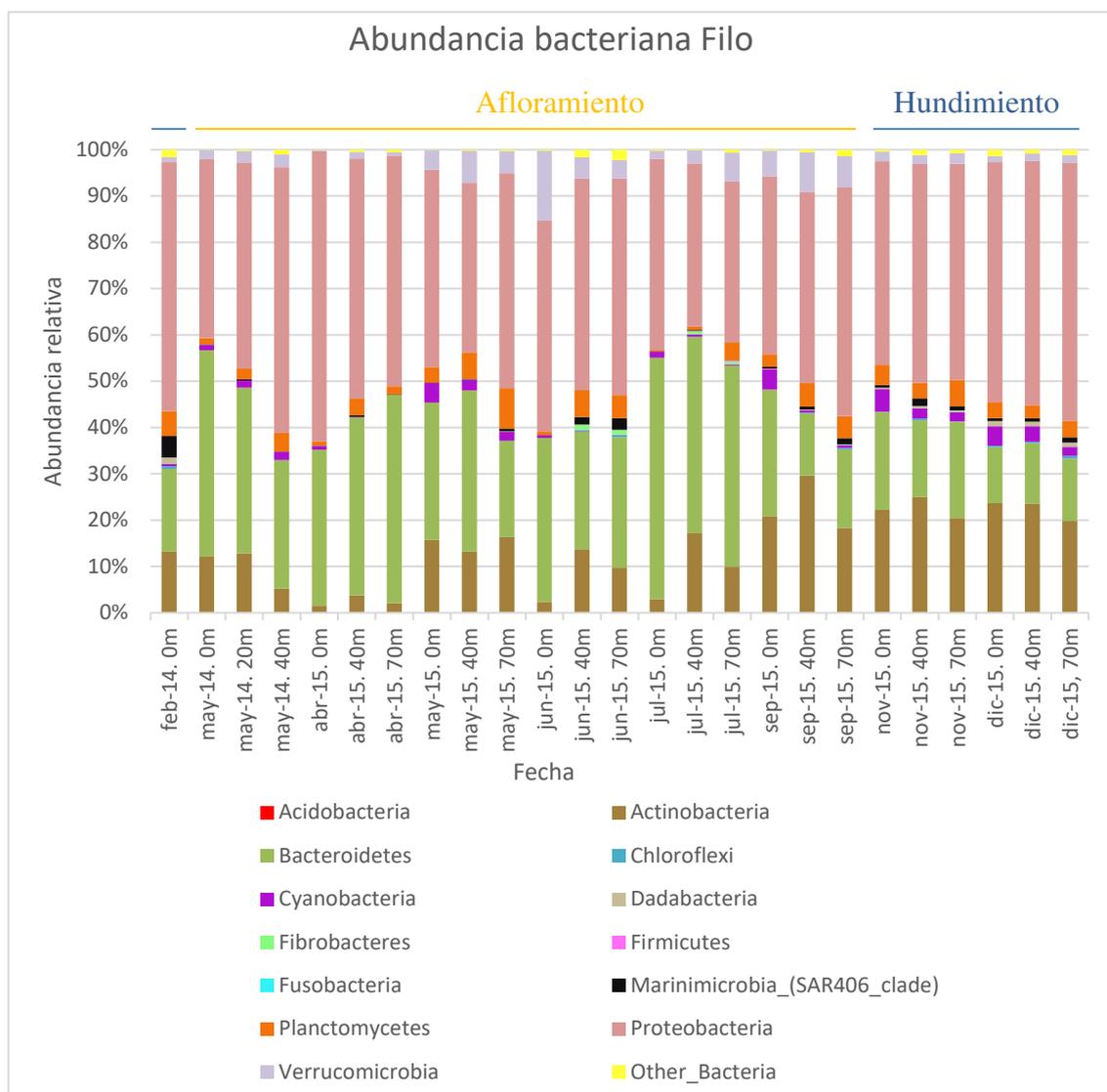


Figura 4. Abundancia bacteriana a nivel de Filo en la estación costera de A Coruña.

En la Figura 5 se muestra la abundancia bacteriana a nivel de género.

El grupo bacteriano más abundante fue *Candidatus Actinomarina* perteneciente al filo Actinobacteria. Sus valores fueron mayores en las estaciones de otoño e invierno ($19\pm 4\%$) que en primavera o verano ($11\pm 7\%$). Varios estudios (Bunse et al., 2016; Montes et al., 2020) correlacionan las Actinobacteria con la biomasa fitoplanctónica ya que ayudan a descomponer la materia orgánica y permiten su absorción por parte del fitoplancton.

Dentro del filo Proteobacterias el cluster SAR86 es un grupo perteneciente a la clase Gammaproteobacterias y relativamente frecuente en el medio marino, cuya abundancia relativa fue ligeramente superior en los meses que comprenden las estaciones de otoño e invierno ($7\pm 1\%$) que en los meses primaverales y estivales ($4\pm 2\%$). En este mismo filo,

dentro de la clase Alphaproteobacterias, encontramos otros grupos como el grupo marino AEGEAN 169 o el clado la perteniente al cluster SAR11, muy frecuente en el medio marino. Ambos grupos fueron abundantes durante el período de hundimiento otoño-invierno ($5\pm 1\%$).

Dentro del filo Bacteroidetes, tenemos a los grupos marinos NS4, NS5 y NS9, *Aurantivirga* y *Polaribacter 2*, cinco géneros pertenecientes a la familia de las Flavobacteriaceae muy importantes en los “blooms” fitoplanctónicos costeros (Montes et al., 2020) . Tanto el grupo marino NS4 como NS5 alcanzaron su valor máximo en verano, en la muestra de julio 2015 a 0 m de profundidad (10 y 9%, respectivamente), mientras que el grupo NS9 lo alcanzó a 70 m en el mes anterior, junio, (6%). El género *Aurantivirga* obtuvo el valor más alto durante el afloramiento en primavera, en concreto, en abril 2015 a 40 m de profundidad (13%), mientras que, en los meses de hundimiento (noviembre y diciembre), este género estuvo prácticamente ausente con una abundancia relativa $< 1\%$. *Polaribacter 2* registró su mayor abundancia relativa (17%) en julio 2015 a 70 m de profundidad, estando ausente en las muestras de invierno correspondientes con el período de hundimiento.

En el filo Verrucomicrobia nos encontramos el género *Roseibacillus* con una mayor abundancia en mayo y septiembre 2015 ($5\pm 1\%$) y el género *Persicirhabdus* que destaca por presentar una abundancia relativa del 15% en la muestra superficial del mes de junio 2015.

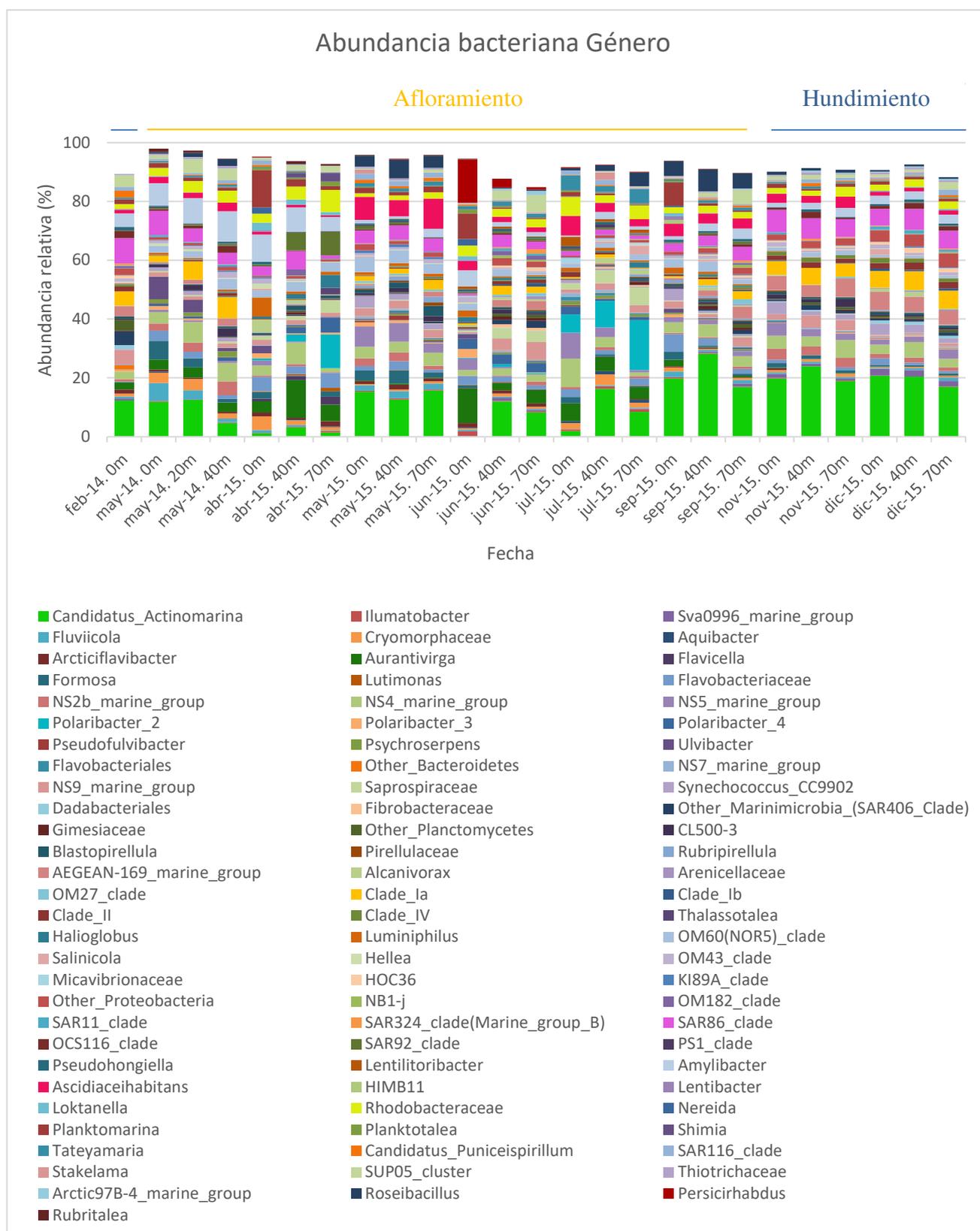


Figura 5. Abundancia bacteriana a nivel de Género en la estación costera de A Coruña.
 Nota: Sólo se representaron aquellos géneros con una abundancia relativa superior al 1%.

Con el fin de estudiar la variabilidad temporal y vertical entre las muestras biológicas se llevó a cabo un análisis multidimensional no métrico (nMDS, Figura 6) y posteriormente un PERMANOVA, donde se observó tres grupos de muestras diferenciadas por afloramiento y hundimiento con un 50% de similitud entre ellas (PERMANOVA, P-valor <0.05). Por el contrario, no hubo diferencia entre muestras en función de la profundidad (PERMANOVA, P-valor >0.05).

El grupo de hundimiento corresponde con los meses de febrero 2014 y noviembre y diciembre 2015 donde la mayor parte de la abundancia está representada por los géneros *Candidatus Actinomarina*, el clado SAR86, el grupo marino AEGEAN 169 y el clado la, mientras que la abundancia de los géneros *Polaribacter 2* y el grupo marino NS5 pertenecientes al filo Bacteroidetes es menor respecto a las muestras de afloramiento. Por otro, tenemos un segundo grupo que incluye a las muestras de afloramiento de los meses de mayo 2014, y mayo, julio y septiembre 2015 donde la abundancia de *Candidatus Actinomarina* es menor al grupo anterior mientras que la abundancia de los géneros *Ascidiaceihabitans* (Proteobacteria), *Roseibacillus*, *Polaribacter 2* y el grupo marino NS5 se incrementa. Por último, tenemos un tercer grupo de afloramiento que agrupa a las muestras de abril y junio 2015 que se diferencian del otro grupo de afloramiento por presentar una abundancia relativa menor de *Candidatus Actinomarina* y una mayor representación de *Aurantivirga*, de las Proteobacterias *Planktonmarina* y *Amylibacter* y de la Verrucomicrobia *Persicirhabdus*, entre otros.

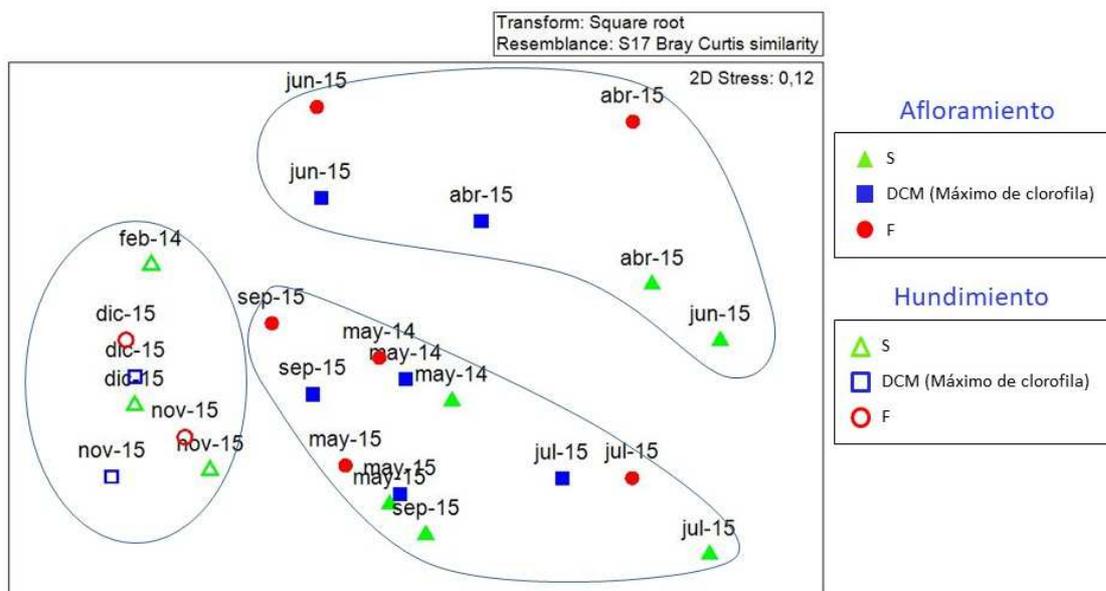


Figura 6. Análisis multidimensional no métrico (nMDS) de las muestras biológicas en la estación costera de A Coruña.

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

Tanto la abundancia y biomasa como la composición de las comunidades bacterianas están relacionados con diversos factores bióticos y abióticos (temperatura, salinidad, nutrientes inorgánicos, co-ocurrencia de especies) (Fuhrman et al., 2015; Kirchman, 1994; Montes, 2016). El régimen hidrográfico y las variables ambientales del NO de la Península Ibérica presentan condiciones muy contrastadas, con situaciones de estratificación vertical y afloramiento costero durante el verano, y situaciones de mezcla vertical durante el otoño e invierno (Álvarez et al., 2012). Adicionalmente, y como hemos mostrado en el apartado 4.4. Nuestro trabajo ha encontrado que la estructura de la comunidad bacteriana sigue un patrón estacional, por lo que llevamos a cabo un análisis de coordenadas principales (PCO) para estudiar la relación entre la estructura de la composición de las comunidades bacterianas y las variables ambientales. En dicho análisis se eliminaron las muestras correspondientes a la zona profunda (70 m) al carecer de datos para varias variables ambientales. En la Figura 7, podemos observar que, las muestras del período hundimiento, la composición de las comunidades bacterianas, formada principalmente por Proteobacterias y Actinobacterias, está relacionada con la salinidad y con la profundidad de la capa de mezcla, mientras que las muestras del período de afloramiento, constituidas mayoritariamente por Proteobacteria y Bacteroidetes, se relacionan con condiciones de PP total, nitrato, clorofila-a, temperatura y biomasa de HNA y LNA. En concreto, las muestras de mayo 2014 y junio 2015 del DCM están relacionadas con la concentración de nitrato, mientras que las muestras de superficie (S) y DCM de julio de 2015, con una gran abundancia de *Polaribacter 2*, están relacionadas con la PP total. La abundancia de LNA se relaciona con las muestras de superficie y DCM de mayo 2015, mes donde la abundancia de *Asciidiaceihabitans* alcanza los valores más elevados. Por otro lado, la abundancia de HNA está relacionada con la muestra superficial de mayo 2014 que se caracteriza por presentar los valores más altos para los géneros *Ulvibacter* y *Formosa* pertenecientes al filo Bacteroidetes. También podemos apreciar en dicha Figura 7, que la clorofila-a y la PP <10 µm se correlacionan con las muestras superficiales de abril y junio 2015 donde el género *Planktomarina* está más representada y *Candidatus Actinomarina* se encuentra prácticamente ausente.

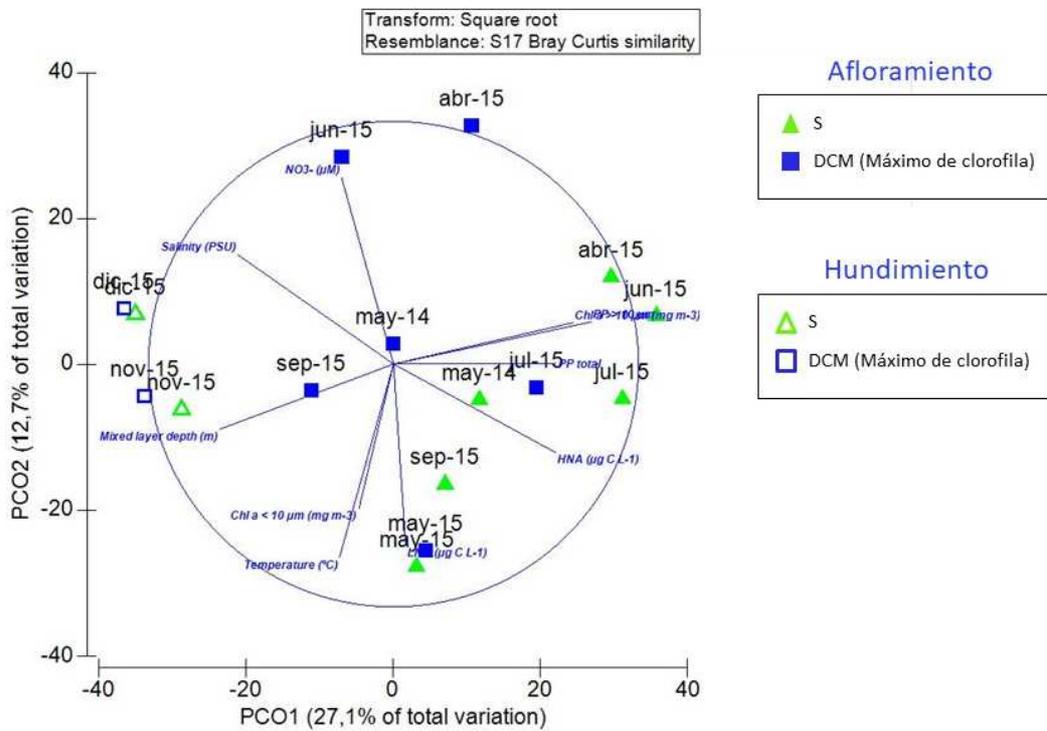


Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCO) mostrando la relación entre la diversidad bacteriana y las variables ambientales en la estación costera de A Coruña.

Estos hallazgos son consistentes con estudios previos realizados en otras regiones templadas (Fuhrman et al., 2015; Suzuki et al., 2001) y sugieren una marcada influencia de los factores regionales estacionales, como la dinámica de afloramiento-hundimiento, en la comunidad bacteriana que habita estas aguas costeras.

5. CONCLUSIONES.

- La estructura de la composición bacteriana en la costa de A Coruña está compuesta principalmente por los filos Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacteria. Los géneros más abundantes han resultado ser *Candidatus Actinomarina*, *Aurantivirga*, el cluster SAR86, Rhodobacteraceae y los grupos marinos NS4, NS5, NS9, entre otros.
- Nuestros resultados muestran que algunos grupos taxonómicos (ej. grupos marinos NS4 y NS5) muestran una co-ocurrencia, y que, por lo tanto, responden de forma similar a factores ambientales locales, sugiriendo que podrían desempeñar funciones similares, adaptándose a nichos similares. Mientras que hay otros que dominan sólo en ciertas épocas del año (ej. *Candidatus Actinomarina* y clado la) y que podrían responder a las contrastadas condiciones medioambientales encontradas durante nuestro estudio o a la competencia por recursos.
- Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa en la composición bacteriana entre las muestras de hundimiento y afloramiento. Mientras que las muestras del período de hundimiento estaban compuestas principalmente por los géneros *Candidatus Actinomarina*, el grupo marino AEGEAN 169, el clado SAR86 y el clado la y una menor abundancia de *Aurantivirga* y *Polaribacter 2*, las muestras de afloramiento estaban dominadas por la presencia de *Aurantivirga*, *Asciadiaceihabitans*, *Amylibacter*, *Roseibacillus* y *Polaribacter 2* y una menor abundancia de *Candidatus Actinomarina*.
- Esta distribución en la composición de la comunidad bacteriana estuvo correlacionada con las variables ambientales, encontrándose que las muestras de hundimiento se relacionaron con la salinidad y con la profundidad de la capa de mezcla, mientras que las muestras de afloramiento se correlacionaron con la clorofila-a, PP, nitratos, temperatura y con bacterias de alto y bajo contenido en ADN.

CONCLUSIÓNS

- A estrutura da composición bacteriana na costa de A Coruña está composta principalmente polos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria. Os xéneros máis abundantes resultaron ser *Candidatus Actinomarina*, *Aurantivirga*, o cluster SAR86, Rhodobacteraceae e os grupos mariños NS4, NS5, NS9, entre outros.
- Os nosos resultados amosan unha variedade de grupos taxonómicos (ex. grupos mariños NS4 e NS5) que amosan unha co-ocurrencia, e, polo tanto, responden de forma similar a factores ambientais locais, suxerindo que poderían desempeñar funcións similares, adaptándose a nichos similares. Mentres que hai outros que dominan só durante certas épocas do ano (ex. *Candidatus Actinomarina* e clado la) e que poderían responder ás contrastadas condicións medioambientais atopadas durante o noso estudo ou á competencia por recursos.
- Atopouse unha clara diferenciación na composición bacteriana entre as mostras agrupadas por afundimento e afloramento. Mentres que as mostras de afundimento estaban compostas principalmente polos xéneros *Candidatus Actinomarina*, o grupo mariño AEGEAN 169, o clado SAR86 e o clado la e unha menor abundancia de *Aurantivirga* e *Polaribacter 2*, as mostras de afloramento estaban dominadas pola presenza de *Aurantivirga*, *Ascidiaceihabitans*, *Roseibacillus*, *Amylibacter* e *Polaribacter 2* e unha menor abundancia de *Candidatus Actinomarina*.
- Esta distribución na composición da comunidade bacteriana estivo correlacionada coas variables ambientais, atopándose que as mostras de afundimento se relacionaron coa salinidade e coa profundidade da capa de mestura, mentres que as mostras de afloramento correlacionáronse coa clorofila-a, PP, nitratos, temperatura e coas bacterias de alto e baixo contido en ADN.

CONCLUSIONS

- The structure of the bacterial composition on the coast of A Coruña is mainly made up of the Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria phyla. The most abundant genus were *Candidatus Actinomarina*, *Aurantivirga*, the cluster SAR86, Rhodobacteraceae and the marine groups NS4, NS5, NS9, among others.
- Our results show that some taxonomic groups (eg NS4 and NS5 marine groups) show a co-occurrence, so, they respond similarly to local environmental factors, suggesting that they could perform similar functions, adapting to similar niches. While there are others that dominate only at certain times of the year (eg *Candidatus Actinomarina* and Ia clade) and that could respond to the contrasted environmental conditions found during our study or to competition for resources.
- A statistically significant difference in the bacterial composition has been found between downwelling and upwelling samples. While the samples from the downwelling period were mainly composed of *Candidatus Actinomarina*, AEGEAN 169 marine group, SAR86 clade and Ia clade, and a lower abundance of *Aurantivirga* and *Polaribacter 2*, the upwelling samples were dominated by the presence of *Aurantivirga*, *Ascidiaceihabitans*, *Amylibacter*, *Roseibacillus* and *Polaribacter 2* and a lower abundance of *Candidatus Actinomarina*.
- This distribution in the composition of the bacterial community was correlated with the environmental variables, finding that downwelling samples were related to salinity and the depth of the mix layer, while the upwelling samples were correlated with chlorophyll- a, PP, nitrates, temperature and with bacteria with high and low DNA content.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- AEMET. (2020). *Precipitación diaria y mensual en A Coruña. Agencia Estatal de Meteorología (AEMET)*. <http://www.aemet.es>. Última consulta: 22/04/2020.
- Álvarez, I., Prego, R., Castro, M., & Varela, M. (2012). Revisión de los eventos de afloramiento en Galicia: Eventos fuera de temporada en las rías (1967-2009). *Ciencias marinas*, 38, 143-159.
- Álvarez-Salgado, X. A., Rosón, G., Pérez, F. F., Figueiras, F. G., & Ríos, A. F. (1996). Nitrogen cycling in an estuarine upwelling system, the Ría de Arousa (NW Spain). II. Spatial differences in the short-time-scale evolution of fluxes and net budgets. *Marine Ecology Progress Series*, 135, 275-288. <https://doi.org/10.3354/meps135275>
- Anderson, M., Gorley, R. N., & Clarke, K. (2008). *PERMANOVA+ for primer: Guide to software and statistical methods*. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Aristegui, J., Gasol, J. M., Duarte, C. M., & Herndl, G. J. (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnology and Oceanography*, 54(5), 1501-1529. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.5.1501>
- Bode, A., & Varela, M. (1998). Primary production and phytoplankton in three Galician Rias Altas (NW Spain): Seasonal and spatial variability. *Scientia Marina*, 62(4), 319-330. <https://doi.org/10.3989/scimar.1998.62n4319>
- Bode, A., Varela, M. M., Teira, E., Fernández, E., González, N., & Varela, M. (2004). Planktonic carbon and nitrogen cycling off northwest Spain: Variations in production of particulate and dissolved organic pools. *Aquatic Microbial Ecology*, 37, 95-107. <https://doi.org/10.3354/ame037095>
- Bunse, C., Bertos-Fortis, M., Sassenhagen, I., Sildever, S., Sjöqvist, C., Godhe, A., Gross, S., Kremp, A., Lips, I., Lundholm, N., Rengefors, K., Seibom, J., Pinhassi, J., & Legrand, C. (2016). Spatio-Temporal Interdependence of Bacteria and Phytoplankton during a Baltic

- Sea Spring Bloom. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00517>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Calvo-Díaz, A., & Morán, X. A. G. (2006). Seasonal dynamics of picoplankton in shelf waters of the southern Bay of Biscay. *Aquatic Microbial Ecology*, 42, 159-174.
<https://doi.org/10.3354/ame042159>
- Clarke, K., & Gorley, R. (2006). *Primer v6: User Manual/Tutorial. Plymouth routine in multivariate ecological research*. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N.-U., Martínez, A., Sullivan, M. B., Edwards, R., Brito, B. R., Chisholm, S. W., & Karl, D. M. (2006). Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Science*, 311(5760), 496-503. <https://doi.org/10.1126/science.1120250>
- Friedline, C. J., Franklin, R. B., McCallister, S. L., & Rivera, M. C. (2012). Microbial community diversity of the eastern Atlantic Ocean reveals geographic differences. *Biogeosciences Discussions*, 9(1), 109-150. <https://doi.org/10.5194/bgd-9-109-2012>
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), 133-146.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>
- Gasol, J. M., Pinhassi, J., Alonso-Sáez, L., Ducklow, H., Herndl, G. J., Koblížek, M., Labrenz, M., Luo, Y., Morán, X. A. G., Reinthaler, T., & Simon, M. (2008). Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea*. *Aquatic Microbial Ecology*, 53, 21-38.
<https://doi.org/10.3354/ame01230>
- Gasol, J. M., Zweifel, U. L., Peters, F., Fuhrman, J. A., & Hagström, Å. (1999). Significance of Size and Nucleic Acid Content Heterogeneity as Measured by Flow Cytometry in Natural Planktonic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4475.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4475-4483.1999>

- Glöckner, F. O., Gasol, J. M., MCDonough, N., & Calewaert, J.-B. (2012). *Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change*. European Science Foundation, Marine Board.
- Hansen, H. P., & Grasshoff, K. (1983). Procedures for the automated determination of seawater constituents. En K. Grasshoff, M. Ehrhardt, & K. Kremling (Eds.), *Methods of seawater analysis* (2.^a ed., pp. 362-379). Verlag Chemie.
- Huse, S. M., Welch, D. M., Morrison, H. G., & Sogin, M. L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering: Ironing out the wrinkles in the rare biosphere. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1889-1898.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x>
- IEO. (2020). *Índice de afloramiento*. Instituto Español de Oceanografía (IEO).
<http://www.indicedeafloramiento.ieo.es>. Última consulta: 22/04/2020.
- Kirchman, D. L. (1994). The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology*, 28(2), 255-271. <https://doi.org/10.1007/BF00166816>
- Lønborg, C., & 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 Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 85, 35-46.
<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2013.11.002>
- Montes, T. (2016). *Diversidad de bacterioplancton en relación con los factores ambientales en las aguas superficiales de la costa de A Coruña* [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de A Coruña, A Coruña.
- Montes, T., Guerrero-Feijóo, E., Bode, A., Ruiz-Villarreal, M., Moreira-Coello, V., Mouriño-Carballido, B., & Varela, M. M. (2020). Vertical zonation of bacterial assemblages attributed to physical stratification during the summer relaxation of the coastal upwelling off Galicia (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106791>

- Norland, S. (1993). The relationship between biomass and volume of bacteria. En P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, & J. J. Cole (Eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (Vol. 1, pp. 303-307). Lewis Publishers.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing* (R Foundation for Statistical Computing) [Programa informático]. <https://www.R-project.org/>
- Ríos, A. F., Pérez, F. F., & Fraga, F. (1992). Water masses in the upper and middle North Atlantic Ocean east of the Azores. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, *39*(3-4), 645-658. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(92\)90093-9](https://doi.org/10.1016/0198-0149(92)90093-9)
- Rokkan Iversen, K., & Seuthe, L. (2011). Seasonal microbial processes in a high-latitude fjord (Kongsfjorden, Svalbard): I. Heterotrophic bacteria, picoplankton and nanoflagellates. *Polar Biology*, *34*(5), 731-749. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0929-2>
- Suzuki, M. T., Preston, C. M., Chavez, F. P., & DeLong, E. F. (2001). Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: Field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. *Aquatic Microbial Ecology*, *24*, 117-127. <https://doi.org/10.3354/ame024117>
- Teira, E., Abalde, J., Álvarez-Ossorio, M. T., Bode, A., Cariño, C., Cid, Á., Fernández, E., González, N., 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*, *265*, 31-43. <https://doi.org/10.3354/meps265031>
- Teira, E., Hernando-Morales, V., Fernández, A., Martínez-García, S., Álvarez-Salgado, X. A., Bode, A., & Varela, M. M. (2015). Local differences in phytoplankton-bacterioplankton coupling in the coastal upwelling off Galicia (NW Spain). *Marine Ecology Progress Series*, *528*, 53-69. <https://doi.org/10.3354/meps11228>

- Teira, E., Martínez-García, S., Lønborg, C., & Álvarez-Salgado, X. A. (2009). Growth rates of different phylogenetic bacterioplankton groups in a coastal upwelling system. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 545-554. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00079.x>
- Valencia, J., Abalde, J., Bode, A., Cid, Á., 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(2), 143-157.
- Varela, M. M., van Aken, H. M., Sintés, E., & Herndl, G. J. (2007). Latitudinal trends of Crenarchaeota and Bacteria in the meso- and bathypelagic water masses of the Eastern North Atlantic. *Environmental Microbiology*, 10(1), 110-124. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01437.x>
- Welschmeyer, N. A. (1994). Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnology and Oceanography*, 39(8), 1985-1992. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.8.1985>
- Yokokawa, T., De Corte, D., Sintés, E., & Herndl, G. J. (2010). Spatial patterns of bacterial abundance, activity and community composition in relation to water masses in the eastern Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 59, 185-195. <https://doi.org/10.3354/ame01393>