

Tesis defendida por
Paz Catalina Gutiérrez Rosas
y aprobada por el siguiente Comité



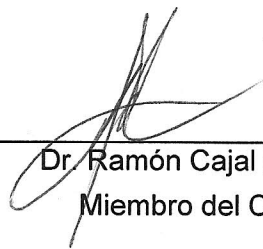
Dr. Helmut Maske Rubach
Director del Comité



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité



Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

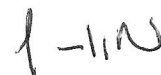


Dr. Ramón Cajal Medrano
Miembro del Comité



Dra. María Lucila del Carmen Lares
Reyes

Coordinador
del Posgrado en Ecología Marina



Dr. Jesús Favela Vara

Encargado del despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Septiembre del 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ecología Marina

Vitaminas y fitoplancton: aspectos metodológicos para determinar las vías de
adquisición en *T. pseudonana* y concentraciones de vitamina intracelular

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Paz Catalina Gutiérrez Rosas

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la Tesis de Paz Catalina Gutiérrez Rosas, presentada como requisito para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en el Posgrado de Ecología Marina.

Vitaminas y fitoplancton: aspectos metodológicos para determinar las vías de adquisición en *T. pseudonana* y concentraciones de vitamina intracelular

Resumen aprobado por:



Dr. Helmut Maske Rubach
Director de Tesis

Resumen

Gran parte del fitoplancton es auxótrofo de vitaminas B₁, B₇ y B₁₂, depende de éstas vitaminas para su crecimiento pero carece del metabolismo para producirlas, por lo que debe adquirirlas extracelularmente. Estas vitaminas hidrofílicas se encuentran disueltas en el océano a concentraciones picomolares, lo que podría limitar su adquisición y condicionar la producción primaria. La única fuente biológica reportada de producción de vitaminas está confinada a grupos de procariotas. El argumento actual es que existe un aporte constante de vitaminas de los procariotas productores al fitoplancton consumidor, ya sea incorporando las vitaminas disueltas por difusión, a través de simbiosis en intercambio celular directo, o por ingestión de las procariotas, p. ej. fagocitosis. Inicialmente, este trabajo consideró la hipótesis de lisis viral de procariotas productoras como fuente liberadora de vitaminas al océano. Para fundamentar esta hipótesis, fue necesario mostrar la existencia de una reserva intracelular de vitaminas en las células productoras, desarrollando la metodología para la cuantificación intracelular y extracelular de la vitamina B₁₂ en aguas costeras con el método de HPLC y por ensayo enzimático de inmunoafinidad ELISA. La dinámica entre productor y consumidor de vitaminas B₁₂ fue estimada por bioensayos de *Thalassiosira pseudonana* (diatomea auxótrofa) en interacción con bacterias heterótrofas tomadas de la bahía de Todos Santos, inoculados a diferentes condiciones de vitaminas. Los tratamientos donde se encontraba *T. pseudonana* con bacterias y sin vitaminas tuvieron una tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) cercana a los tratamientos de *T. pseudonana* axénica con vitaminas. Las mediciones en los cultivos mostraron altas concentraciones intracelulares de vitamina B₁₂ en las bacterias productoras. Las estimaciones de flujos basados en estos datos, deja abierta la posible vía de alimentación con vitamina B₁₂ para el fitoplancton costero.

Palabras clave: Vitaminas, Fitoplancton, bacterias, simbiosis.

Abstract of the thesis presented by Paz Catalina Gutiérrez Rosas as a partial requirement to obtain the Master in Science in Marine Ecology

Vitamins and phytoplankton: methodological aspects to determine the course of acquisition in *T. pseudonana* and the concentration of intracellular vitamin

Abstract approved by:



Dr. Helmut Maske Rubach
Thesis advisor

Abstract

A large number of phytoplankton is considered auxotrophic, depending on vitamin B₁, B₇, and B₁₂ for their growth, and lacking the metabolic pathway to produce them, hence depending on extracellular sources. These hydrophilic vitamins are found dissolved in the ocean and their concentrations are at the picomolar level, which could limit their acquisition by auxotrophs and affect primary production. These vitamins are produced in the ocean by part of the marine prokaryotes. The current concept of vitamin acquisition by auxotrophic phytoplankton calls for either incorporating them from the small pool of dissolved vitamins, by symbiosis using close proximity cellular exchange, or by ingestion of the prokaryotes, e.i. phagocytosis. Initially, this study considered the hypothesis of viral lysis of prokaryotes releasing dissolved vitamins in the ocean. To support this hypothesis, it was necessary to demonstrate the existence of an intracellular reserve of vitamins in producer cells, developing the methodology to quantify intracellular and extracellular vitamin B₁₂ in coastal water using HPLC or an enzymatic essay of immunoaffinity ELISA. The experimental model to investigate the dynamic between the vitamin producer and consumer incorporated bioassays of *Thalassiosira pseudonana*, (auxotrophic Diatom) and natural population of coastal heterotrophic prokaryotes. The bioassays included different treatments of vitamins and prokaryote presence. High growth rate was found when *T. pseudonana* without added vitamins was in contact with bacteria or in axenic *T. pseudonana* cultures with added vitamins. The measurements in mixed cultures of *T. pseudonana* and bacteria report high concentrations of intracellular vitamin B₁₂ in the latter. Preliminary estimates for coastal waters of vitamins B₁₂ available in different pools remained inconclusive with respect to the best route of acquisition of vitamin B₁₂ by close symbiosis, or through the dissolved vitamin pool.

Keywords: Vitamins, phytoplankton, bacteria, symbiosis.

Para Valentina, Ivanna y Pepe, divinos chapulines y futuros profesionistas.

*A mi madre por su ejemplo, a mis hermanos Carlos, Sara y a mi familia por
amarme y creer siempre en mí.*

Agradecimientos

A CONACyT, por el apoyo económico brindado en estos 2 años de maestría.

A CICESE, institución que fortaleció mi crecimiento profesional. A sus académicos, especialmente aquellos comprometidos con su vocación de hacer ciencia con una calidad humana admirable. Al personal administrativo y de apoyo, por su trabajo eficiente, amable y ejemplar, que además aderezan con una sonrisa cada día.

Al laboratorio de microbios marinos (MICMAR), pequeña gran familia que me brindó su apoyo para realizar mi tesis. Al Dr. Helmut Maske, por ser mi guía en este proceso, por su paciencia y compromiso. Por creer en mí y ayudarme a abrir las alas.

A los miembros del comité de evaluación, la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, el Dr. Ramón Cajal Medrano y el Dr. Axayácatl Rocha Olivares, por su apoyo y asesoría para realizar esta tesis.

A Cesar Almeda, Mary Carmen Ruiz, Ricardo Cruz y Josué Villegas, amigos y compañeros de trabajo que me enseñaron el ABC de un laboratorio con todos sus trucos, por compartir su tiempo, porque sin ustedes esta tesis no hubiera sido posible.

A los estudiantes de doctorado del PEM, por sus tutorías, apoyo y calidad humana para compartir su conocimiento y consejos en todo momento.

A mis compañeros y amigos cicesianos, por crecer juntos en este camino, por los momentos de crisis y alegrías, de risas y estrés, por los albures y sarcasmos, porque cada uno de ustedes me regalo un cachito de vida irremplazable.

A las incondicionales, amigas, terapeutas y hermanas de 24 horas: Sara, Mayra, Luz, Bety, Erika, Geovana, Valeria, Mary Carmen, Carolina, Tere, Ferchis, Paty, Eva y a mi Werito, por estar ahí siempre y por siempre.

Contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Agradecimientos	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1 Vitamina B ₁₂ en ecosistemas marinos	2
1.2. ¿Cómo adquiere el fitoplancton la vitamina B ₁₂ ?	4
1.3 Producción bacteriana de vitamina B ₁₂	5
1.4. Interacción fitoplancton-bacteria para la obtención de vitamina B ₁₂	6
1.5. Lisis viral como liberadora de vitamina B ₁₂	10
2. Hipótesis	11
3. Objetivos	11
4. Metodología	12
4.1 Inducción de lisis viral en procariotas con Mitomicina-C	12
4.2 Cuantificación celular por microscopia de epifluorescencia	13
4.3 Monitoreo de crecimiento algal por fluorescencia in vivo	16
4.4 Bioensayos	17
4.5 Cultivos axénicos de <i>T. pseudonana</i>	19
4.6 Diseño experimental: <i>T. pseudonana</i> + Bacterias Heterótrofas a diferentes condiciones de crecimiento	19
4.7 Cultivos de <i>Dinoroseobacter shibae</i> para cuantificación de vitamina B ₁₂	25
4.8 Cuantificación de la vitamina B ₁₂ en el océano	26
4.8.1 Extracción de vitamina B ₁₂ intracelular	27
4.8.2 Pre-concentración y extracción de vitamina B ₁₂ disuelta	28
4.8.3 Cuantificación de vitamina B ₁₂ con HPLC	28
4.8.4 Cuantificación de vitamina B ₁₂ con ELISA.....	30
4.8.5 Análisis de los Datos y estimación de tasas de crecimiento utilizando la función Gompertz.....	31
5. Resultados	33
5.1 Pruebas metodológicas para la cuantificación de vitamina B ₁₂ con Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	33
5.2 Bioensayos	34
5.2.1 Resultados por tratamientos	35
5.2.2. Cuantificación de vitamina B ₁₂ con prueba de inmonoafinidad ELISA ...	39
6. Discusión.....	40
Conclusiones.....	56
Referencias bibliográficas	57
Anexos.....	64

Lista de Figuras

Figura 1.	Estructuras de vitaminas del complejo B, Tiamina (B ₁), Biotina (B ₇) y Cobalamina (B ₁₂).....	1
Figura 2.	Vías de adquisición de vitaminas por fitoplancton auxótrofo.....	5
Figura 3.	Microscopia electrónica de barrido (SEM) de distintas diatomeas. Tomada de Amin <i>et al.</i> (2012).....	7
Figura 4.	Ejemplos de ficosfera en diatomeas para tamaños de 4 y 20 μm , tomado y modificado de Amin <i>et al.</i> (2012).....	8
Figura 5.	Imagen de <i>T. pseudonana</i> + bacterias heterótrofas teñidas con DAPI. Microscopia de epifluorecencia.....	14
Figura 6.	Imagen de autofluorescencia de <i>T.pseudonana</i> . Microscopia de fluorescencia.....	15
Figura 7.	<i>T. pseudonana</i> en microscopia electrónica de barrido, escala 5 μm , Tomado de Gröger <i>et al.</i> (2007).....	18
Figura 8.	Sitio Flucar. Origen de agua superficial para cultivos....	20
Figura 9.	Diseño experimental de los bioensayos.....	21
Figura 10.	Descripción de los tratamientos.....	22
Figura 11.	Cultivos control de <i>T. pseudonana</i> con y sin vitaminas..	24
Figura 12.	Estructura de la vitamina B ₁₂ y sus diferentes formas...	27
Figura 13.	Análisis de tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) con función Gompertz.....	32
Figura 14.	Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para análisis de diferencias entre tratamientos	35
Figura 15	Bacterias adheridas a la pared de <i>T. pseudonana</i>	45
Figura 16.	Comparativa estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, μ_{max} entre tratamientos <i>T. pseudonana</i> + B. heterótrofas sin vitaminas, sin glucosa vs <i>T. pseudonana</i> axénica con vitaminas	

.....	47
Figura 17. Comparativa cualitativa de $\mu_{\max}$ para los diferentes tratamientos.....	48
Figura 18. Promedio de seis años (1997-2003) concentraciones de clorofila (Chl-a) en la superficie de la Corriente de California (CC) de SeaWiFS para los meses de Junio-Agosto. Tomado y modificado de reporte IMECOCAL Baumgartner <i>et al.</i> (2008).....	51

Lista de Tablas

Tabla 1.	Porcentaje de vitaminas requeridas en diferentes filos algales. Modificado de tabla 1 de Croft <i>et al.</i> (2006).....	3
Tabla 2.	Significancia entre tratamientos, resultado de prueba de normalidad Q-Q.....	34
Tabla 3.	Valores de $\mu_{\max}$ de los tratamientos en 8 cultivos.	38
Tabla 4.	Resultados prueba de inmunoafinidad ELISA, cantidades de vitamina B ₁₂ en cultivo <i>T. pseudonana</i> en interacción con <i>B. heterótrofas</i> sin vitaminas	39
Tabla 5.	Resultados de la prueba ELISA para fracción disuelta y particulada del cultivo <i>T. pseudonana</i> + bacterias heterótrofas, sin vitaminas.....	44
Tabla 6.	Comparativa de valores de vitamina B ₁₂ intracelular en fitoplancton de trabajos de Swift y Taylor (1974), Droop (1968, 1970, 2007) y este trabajo.....	44
Tabla 7.	Vitamina B ₁₂ intracelular en <i>T. pseudonana</i> considerando la adhesión de 2 células bacterianas productoras de vitaminas.....	46
Tabla 8.	Valores de volumen, tasa máxima específica de crecimiento ($\mu_{\max}$) y vitamina B ₁₂ intracelular para <i>Thalassiosira pseudonana</i> y bacterias heterótrofas del cultivo experimental sin vitaminas y sin glucosa.....	52
Tabla 9.	Estimación de abundancia celular e incorporación de B ₁₂ en fitoplancton auxótrofo de volumen hipotético para aguas costeras.....	52
Tabla 10.	Estimación de abundancia y producción bacteriana de vitamina B ₁₂ para aguas costeras.....	53
Tabla 11.	Estimación de la liberación de vitamina B ₁₂ por lisis viral en abundancia bacteriana hipotética para zonas costeras.....	54

1. Introducción

Las vitaminas del complejo B son coenzimas que actúan como co-factores bioquímicos en diferentes vías metabólicas esenciales para la mayoría de eucariotas (Warren *et al.*, 2002). Principalmente, tres representantes de este grupo, la tiamina o B₁, biotina o B₇ y cobalamina o B₁₂ son esenciales para el crecimiento de muchas especies del fitoplancton (Provasoli y Carlucci, 1974). La vitamina B₁, es un co-factor del sistema piruvato-deshidrogenasa requerido para el metabolismo de los hidratos de carbono. La vitamina B₇ es esencial para las enzimas carboxilasas incluyendo la acetyl co-enzima A (CoA) empleada en la síntesis de ácidos grasos. Finalmente, la vitamina B₁₂ actúa entre otras funciones (anabólicas y catabólicas) en la síntesis de dos importantes enzimas: la metionina sintasa (MEtH) que interviene en la síntesis de ADN y la metimalonil CoA mutasa (MCM) requerida para asimilar carbono inorgánico, metabolizar ciertos aminoácidos y ácidos grasos de cadena impar (Gruber y Kratky, 2001; Panzeca *et al.*, 2006). De las tres vitaminas, la cobalamina o B₁₂ destaca por su alto grado de complejidad estructural (Fig. 1) necesitando casi 30 genes para su síntesis de *novo* (Croft *et al.*, 2006). A pesar de ser requerida por eucariotas y procariotas, la maquinaria genética para su producción esta confinada en ciertos grupos de bacterias y arqueas, el resto de procariotas y grupos animales no son capaces de producirla y dependen de su incorporación externa (Helliwell *et al.*, 2011).

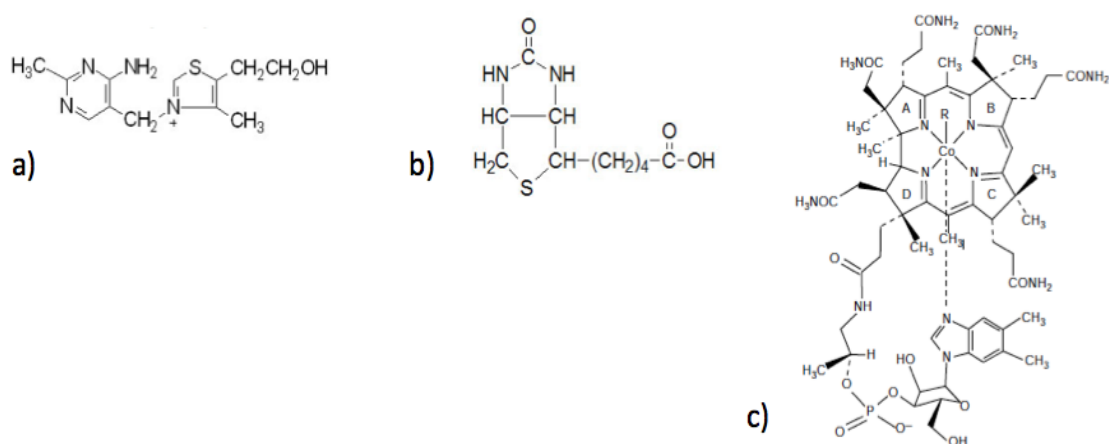


Fig. 1. Estructuras de a) Tiamina o B₁, b) Biotina o B₇ y c) Cobalamina o B₁₂. Recuperado de Ludwig *et al.*, 1996, *Structure*, 4(5), pp.505.

La vitamina B₁₂ se dio a conocer en la década de 1920 en estudios biomédicos que buscaban la cura para la anemia perniciosa, encontrándose en el hígado crudo una molécula que fue aislada y cristalizada con el nombre de vitamina B₁₂ o cobalamina, debido al ion cobalto que contiene en su estructura (Warren *et al.*, 2002) y en 1961, la química británica Dorothy Hodgkin determinó su estructura a través de cristalografía, siendo el enlace covalente Cobalto-carbono, uno de los pocos enlaces covalentes metal-carbono presentes en la naturaleza, y clave para la reactividad de las cobalaminas (Ludwig *et al.*, 1996). En los seres humanos, ésta vitamina es un requisito dietético por su acción enzimática en la MCM y MEtH, la formación de mielina del sistema nervioso central y la formación de eritrocitos. En macrofitas, plantas vasculares y hongos, la vitamina B₁₂ no es requerimiento esencial debido a que carecen de la enzima MCM y utilizan una vía alterna para la MEtH (Helliwell *et al.*, 2011). Sin embargo en el océano, más de la mitad de las especies de microalgas dependen de la vitamina B₁₂ para su crecimiento (Provasoli y Carlucci, 1974; Droop, 1968; Croft *et al.*, 2006).

1.1 Vitamina B₁₂ en ecosistemas marinos

Las algas como organismos autótrofos, requieren de luz y una mezcla de nutrientes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo, silicato, metales traza y vitaminas. Un estudio de 306 especies de algas en cultivos, mostró que más del 50% necesitaban de un aporte de cobalamina (B₁₂) para su crecimiento, el 22% de tiamina (B₁) y en menor proporción (5%) de biotina (B₇). (Croft *et al.*, 2006). El porcentaje depende de la composición taxonómica de los grupos algales. En estos cultivos, se dio a conocer que las especies algales auxótrofas de vitamina B₁₂, es decir, que requieren su incorporación externa para su crecimiento, son el 59% diatomeas (heterocontófitas) y el 89% dinoflagelados (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de vitaminas requeridas en diferentes filos algales. De las 306 especies analizadas, el 51% mostró necesitar vitamina B₁₂ (cobalamina) para su crecimiento, el 22% vitamina B₁ (tiamina) y el 5% de vitamina B₇ (Biotina). Recuperado y modificado de tabla 1 de Croft *et al.*, 2006, *Eukaryotic Cell*. 5(8), p. 1176.

Filo	No. de especies analizadas	Cobalamina %	Tiamina %	Biotina %
<i>Clorófita</i>	148	30	13	0
<i>Rodófita</i>	13	92	0	0
<i>Criptófita</i>	6	83	83	17
<i>Dinoflagelados</i>	27	89	26	26
<i>Euglenófita</i>	15	87	73	7
<i>Haptófita</i>	17	59	82	0
<i>Heterocontófita</i>	80	59	14	6
suma sp./porcentaje	306	51	22	5

La necesidad de vitaminas para el crecimiento algal se conoce desde hace más de 30 años, cuando Provasoli y Carlucci (1974) reportaron a la vitamina B₁₂ como metabolito esencial para la mayoría de especies de microalgas. Droop (1968, 1970 y 1974) por su parte, expuso los problemas en el crecimiento de cultivos algales a causa de la limitación de B₁₂, condiciones que de ocurrir en el océano, podrían estar condicionando al fitoplancton auxótrofo y con esto la producción primaria. Sin embargo, el interés por las vitaminas en el océano se vio menguado por muchos años debido a las dificultades metodológicas de su medición y a los nuevos intereses en estudiar los metales traza como el hierro como limitante en zonas de altos nutrientes y baja productividad primaria, conocidos en inglés como *High nutrient low chlorophyll* (HNLC) (Panzeca *et al.*, 2006). En los últimos 10 años, con el uso de nuevas técnicas como el HPLC (*ingl. High Performance Liquid Chromatography* o cromatografía líquida de alta resolución) la cuantificación de metabolitos y el interés en los mecanismos de control de la producción primaria acuática, se abrieron nuevas líneas de investigación dirigidas a las vitaminas en el océano. Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004) desarrollaron un método de cuantificación de vitamina B₁₂ con HPLC que permitió la cuantificación de vitaminas, principalmente la B₁₂ en aguas oceánicas y costeras, con el cual se reportan concentraciones oceánicas

que van de 1 a 60 picomolar (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2006; Bertrand *et al.*, 2012), concentraciones potencialmente limitantes para la productividad fitoplanctónica con posibles consecuencias para el resto de la cadena trófica. Las concentraciones de vitamina B₁₂ varían por todo el océano, creando “parches” de productividad que dependerán de una serie de factores fisicoquímicos como la presencia de ion cobalto disuelto para sintetizar la molécula de vitamina B₁₂ (Panzeca *et al.*, 2008), específicamente en ambientes oligotróficos. La distribución de B₁₂ depende también de factores biológicos como la producción bacteriana y el consumo de las vitaminas por organismos auxótrofos. Los pocos datos de campo generados para aguas costeras, sugieren que la vitamina B₁₂ estimula el crecimiento del fitoplancton de mayor tamaño (2 a 10 µm) el cual, en contraste con la fracción pequeña (< 2µm, picofitoplancton), se hunden más rápido como partículas orgánicas (POC) aumentando la exportación de carbono a las aguas profundas. Por lo tanto, la disponibilidad de vitamina B₁₂ en el océano estaría regulando no solo parte de la producción primaria y la composición de las comunidades fitoplanctónicas, sino también tendría un efecto indirecto en el secuestro de carbono de la bomba biológica (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2006). Todos estos datos inciden sobre el papel de la vitamina como requerimiento nutricional para el crecimiento del fitoplancton, pero se desconoce desde el punto de vista ecológico, las vías que utiliza el fitoplancton consumidor para incorporar las vitaminas, razón por la cual se originó la presente investigación con la siguiente pregunta.

1.2. ¿Cómo adquiere el fitoplancton la vitamina B₁₂?

La composición de las comunidades del fitoplancton está regulada en gran parte por un control de la tasa específica de crecimiento (*bottom-up, ingl.*) que se caracteriza por condiciones que regulan la abundancia de recursos principalmente químicos al inicio de la red trófica, como la disponibilidad y consumo de nutrientes (p. ej. el fósforo, nitrógeno, sílice, metales traza y vitaminas). En situaciones de estrés, como a falta de vitaminas, la conectividad en las comunidades microbianas podría ser la clave para sostener la diversidad biológica del fitoplancton (Giovannoni, 2012). En los ecosistemas marinos, existe una conexión a micro-escala compuesta por microorganismos como

protistas, bacterias (eubacterias, arqueas) y virus, que podrían estar contribuyendo a la producción y obtención de vitaminas. Las hipótesis de adquisición de vitaminas por el fitoplancton incluye la interacción con grupos de bacterias productoras por tres posibles vías: a) por simbiosis fitoplancton-bacteria (Kazamia *et al.*, 2012) en un intercambio directo de componentes orgánicos por el fitoplancton hacia las bacterias, a cambio de las vitaminas, b) por depredación (Jiang *et al.*, 2010) con lo cual las bacterias productoras serían fagocitadas para la obtención del metabolito y c) por medio de exudados, donde las bacterias productoras de vitamina liberan constantemente la B₁₂ al medio, volviéndose disponible para su adquisición por el fitoplancton (Croft *et al.*, 2005) (Fig. 2).

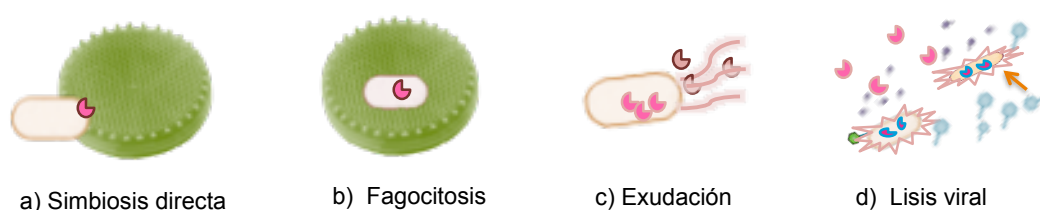


Figura 2. Esquema de las vías de adquisición de vitamina por fitoplancton auxótrofo. ● Fito-plancton, ○ bacterias heterótrofas, ● vitamina B₁₂ ● Virus. (Nota: las células no están a escala real).

Nosotros sugerimos una cuarta vía que involucra a un tercer miembro de la red microbiana: los virus. Nuestra hipótesis argumenta que los eventos de lisis viral (d) estarían liberando concentraciones intracelulares de vitamina B₁₂ presentes en las bacterias productoras, haciéndolas disponibles para el fitoplancton consumidor. Para que esta hipótesis tuviera fundamento, habría que demostrar en primera instancia que las bacterias productoras de vitamina B₁₂ mantienen una reserva intracelular.

1.3 Producción bacteriana de vitamina B₁₂

La síntesis *de novo* de la vitamina B₁₂ parece estar restringida únicamente a grupos de eubacterias y arqueas, indicando que toda la vitamina B₁₂ encontrada en algas podría originalmente ser producida por procariotas. Sin embargo, no todas las procariotas son capaces de producir la B₁₂ y una fracción de ellas

requiere también de su incorporación extracelular (Martens *et al.*, 2002). Considerar que existe una interacción directa entre fitoplancton consumidor y bacterias productoras de B₁₂ no es sorprendente, ya que en los últimos 100 años se ha mostrado que las bacterias marinas están involucradas en interacciones complejas con el fitoplancton, como la capacidad de remineralizar la materia orgánica en descomposición para producir nutrientes como el fósforo y nitrógeno (Azam y Mafatti, 2007) o la producción de sideróforos para la incorporación del hierro en el fitoplancton (Blain *et al.*, 2004). En el caso de las vitaminas, trabajos realizados en algas auxótrofas han mostrado que esta condición podría deberse a la pérdida de un solo gen, el gen (*metE*) que sintetiza la enzima metionina sintasa (METE), y que se encuentra presente en las bacterias, lo cual explica la dependencia (Helliwell *et al.*, 2011). Trabajos como el realizado por Croft *et al.* (2005) proponen que las algas auxótrofas pueden obtener la B₁₂ a través de simbiosis con bacterias, aunque la simbiosis directa no se ha demostrado aún para poblaciones naturales y el papel de la lisis viral de vitaminas no ha sido demostrado.

1.4. Interacción fitoplancton-bacteria para la obtención de vitamina B₁₂

Entre bacterias y fitoplancton existe una asociación desde hace 200 millones de años con la cual se ha documentado la adquisición de gran variedad de genes bacterianos involucrados en la adquisición del nitrógeno, recombinación del ADN y el ciclo de la urea (Allen *et al.*, 2011). Es esta asociación la que se ha propuesto para la adquisición de vitaminas por el fitoplancton, sin conocer aún del todo cuáles serían los procesos involucrados en el océano y qué papel tienen las interacciones virales en esta dinámica. En la búsqueda de respuestas, se diseñó un cultivo experimental para el cual se utilizó una especie del fitoplancton auxótrofo de vitamina B₁₂, la diatomea *Thalassiosira pseudonana*. Las diatomeas son células eucariotas responsables de aproximadamente el 50% de la fotosíntesis en el océano, generan carbono orgánico el cual se consume rápidamente y son parte de la base trófica marina. Poseen distintivas conchas de sílice porosa llamadas frústulas, las cuales tienen la característica de sedimentarse rápidamente debido a su peso específico,

según la teoría de lastre desempeñando un papel importante en la exportación de carbono orgánico al océano profundo (Armbrust, 2009) (Fig. 3).

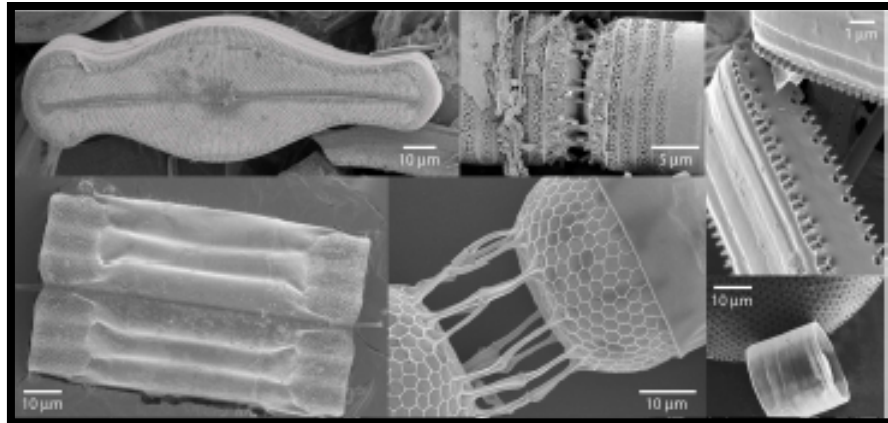


Figura 3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de distintas diatomeas. Recuperado de Amin *et al.*, 2012, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), pp. 668.

Anteriormente se creía que la actividad microbiana ligada a diatomeas se limitaba a la actividad saprofita, sin incluir a las mismas diatomeas en crecimiento. Posteriormente se demostró que algunas diatomeas se desarrollan en interacción con bacterias específicas desde su crecimiento temprano (Cole, 1982). Estas interacciones suelen ser muy específicas, ya que, en un sistema tan dinámico como el océano, la difusión gobierna el flujo de los nutrientes y la disponibilidad de los recursos extracelulares está regulada por los encuentros entre la ficosfera y los microorganismos. La ficosfera (*ingl. phycosphere*), es un término dado en 1972 por Bell y Mitchel (Amin *et al.*, 2012) a la zona que rodea las células algales, la cual involucra una relación compleja con bacterias y las células fototróficas dentro de una micro-escala espacial definida por la viscosidad del agua y el bajo número de Reynolds (Fig. 4).

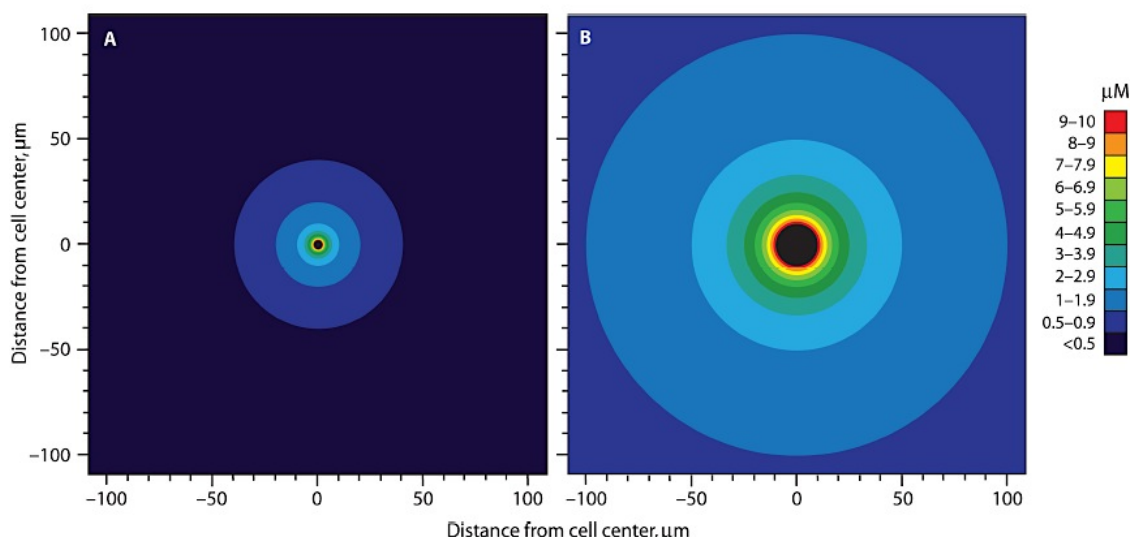


Figura 4. Ejemplos de *ficosfera* o capa límite difusiva alrededor de diatomeas céntricas (p. ej. *Thalassiosira pseudonana*). El gradiente en μM es la concentración de un compuesto excretado desde la superficie de la célula. A representa una célula de 4 μm y B de 20 μm , en ambos la ficosfera está definida por la difusión molecular. Recuperado y modificado de Amin *et al.*, 2012, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), p. 672.

En la ficosfera, el transporte de moléculas está limitado por la difusión molecular y los microorganismos se desplazan sin contribución significativa de la turbulencia, las moléculas de carácter hidrófilo como las vitaminas podrían ser transportadas hasta la superficie celular del fitoplancton por difusión o en una simbiosis directa por grupos de bacterias heterótrofas adheridas a la superficie celular (Amin *et al.*, 2012). La superficie celular de las diatomeas podría encontrarse cubierta por componentes orgánicos, excretados en forma de geles conocidos como TEP's. Los TEP's son exopolímeros orgánicos producidos y excretados al medio de forma continua, incrementando su producción dependiendo de las condiciones fisiológicas de las diatomeas; por ejemplo al final de un florecimiento cuando hay escases de nutrientes, metales traza o vitaminas. En estas condiciones, la biomasa se encuentra limitada y la producción de TEP's facilita la formación de agregados que agilizan la tasa de hundimiento al océano profundo (Kahl *et al.*, 2008). Los TEP's pueden también ser utilizados por las bacterias heterótrofas para la reincorporación de materia orgánica disuelta (DOM) a la red alimenticia a través de diversos mecanismos (Azam y Mafatti, 2007). Por lo tanto, la relación funcional entre fitoplancton y bacterias heterótrofas no es unidireccional. Ciertos grupos bacterianos podrían

haber co-evolucionado en la señalización de moléculas, receptores y cascadas reguladoras cercanas a la superficie celular de las diatomeas, activando respuestas fisiológicas para la adquisición de vitaminas, siempre y cuando éstas se encuentren disponibles para su incorporación.

Además de las bajas concentraciones reportadas de vitamina B₁₂ disuelta en el océano (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2006), en ciertas algas como *Euglena gracilis* y *Pavlova lutheri* (antes *Monochrysis lutheri*) utilizadas para el estudio de vitaminas (Droop 1968) se encontró una sustancia que se une a la vitamina B₁₂, aparentemente una glicoproteína, la cual “atrapa” la vitamina B₁₂ limitando su disponibilidad e inhibiendo la adquisición de los organismos auxótrofos. Esta glicoproteína es conocida como “*Binding factor*” (*ingl.*) y ha sido reportada en cultivos de diatomeas, crisofitas, criptofitas, dinoflagelados y algas verde-azules (Droop, 1968, 1970, 1974; Swift y Taylor, 1974; Pintner y Altmeyer 1979; Sarhan *et al.*, 1980; Wyk y Britz 2010). Hasta el momento, no se ha demostrado su producción por procariotas y su papel fisiológico y ecológico sigue siendo motivo de especulación. Por una parte, puede considerarse una estrategia de las algas no auxótrofas para disponer de mayor concentración de los nutrientes presentes en el medio, limitando con esto el crecimiento de los grupos algales auxótrofos, disminuyendo la competencia (Davies y Leftley, 1985). Sin embargo, Droop (1968) señala que para ello, tendrían que existir altas densidades celulares, como las de los florecimientos y cultivos algales. Por lo tanto, de existir concentraciones óptimas de vitamina B₁₂ disueltas, se espera que las microalgas presentes tengan altas tasas de incorporación de la B₁₂ y que los sitios de captación o receptores primarios superficiales compitan con el *binding factor*. En situaciones de alta abundancia celular, es posible que las tasas de disociación del *binding factor* sean lo suficientemente lentas para que se mantenga el equilibrio la distribución de la B₁₂ y su disponibilidad en el medio, asegurando con esto un “control” en los crecimientos algales (Davies y Leftley, 1985). La simbiosis directa entre productores y consumidores de B₁₂ podría ser una estrategia de incorporación para los auxótrofos ante estas limitaciones por unión molecular, así como otro tipo de procesos involucrados en la liberación de vitamina B₁₂ intracelular.

1.5. Lisis viral como liberadora de vitamina B₁₂

Aun cuando el campo de la ecología viral ha sido explorado desde 1980, se desconoce mucho acerca de los procesos mediados por virus en sistemas acuáticos. Se ha propuesto que los virus marinos juegan papeles vitales a pequeña y gran escala, tanto en ciclos biogeoquímicos, estructura de las comunidades, transferencia de genes, terminaciones de florecimientos algales así como en la evolución de los organismos (Jacquet *et al.*, 2010). La abundancia viral, en su mayoría bacteriófagos (específicos de bacterias) se encuentra un orden de magnitud mayor a la abundancia bacteriana, generalmente para sistemas marinos se considera un promedio de 10^7 ml^{-1} (Suttle, 2007). El incremento de la producción bacteriana promueve la proliferación de fagos, en equilibrio dinámico entre los procesos de producción, descomposición y la posible liberación de vitaminas (Thingstad *et al.*, 1996).

2. Hipótesis

H_1 : Las bacterias productoras de vitaminas poseen una reserva intracelular.

H_2 : El fitoplancton auxótrofo depende de la simbiosis directa e indirecta con bacterias productoras de vitaminas para su crecimiento.

3. Objetivos

- Estimar las concentraciones intracelulares y extracelulares de vitaminas (vitamina B₁₂) que se encuentran en cultivos de fitoplancton en interacción con bacterias. Determinar la cuota de vitamina B₁₂ intracelular para ambos grupos celulares.
- Desarrollar bioensayos con fitoplancton auxótrofo de vitaminas en interacción con bacterias heterótrofas (B.h.) en condiciones de crecimiento limitadas de vitaminas.
- Estimar las tasas máximas de crecimiento de fitoplancton auxótrofo para observar respuestas a diferentes condiciones de nutrientes.

4. Metodología

4.1 Inducción de lisis viral en procariotas con Mitomicina-C

La lisis viral de procariotas origina una serie de eventos entre los que se encuentran la liberación de nuevas entidades virales, la modificación en la abundancia de grupos taxonómicos de procariotas y la posible liberación de vitaminas. La Mitomicina-C es un antibiótico utilizado desde los 60's para el tratamiento de cáncer debido a su actividad antitumoral. Su mecanismo de acción consiste en la formación de un enlace cruzado (*ingl. cross-link*) en hebras complementarias de ADN mediante una alquilación monofuncional, es decir, la unión de la molécula del fármaco a una sola hebra de ADN evitando la replicación del material genético (Tomasz y Palom 1997).

En el campo de la microbiología marina, la *Mitomicina-C* ha sido utilizada principalmente en estudios donde se busca inducir condiciones lisogénicas a procariotas. En la lisogenia, un fago (virus exclusivos de bacterias) se fija a una bacteria huésped para posteriormente integrar su genoma en el genoma bacteriano (profago). El estado lisogénico puede continuar por muchas generaciones hasta que el profago es activado por agentes mutagénicos como la radiación ultravioleta (UV) o Mitomicina-C (Weinbauer and Suttle, 1999) temperatura o ausencia de nutrientes (Paul y Weinbauer, 2010), induciendo la replicación viral interna y finalmente la lisis del hospedero. En el presente trabajo se utilizó *Mitomicina-C* con el fin de liberar las vitaminas intracelulares producidas por las bacterias presentes en muestras de agua natural o cultivos. De este modo, después de utilizar el fármaco se espera un aumento de entidades virales (VLP's) y concentraciones de vitaminas disueltas provenientes de las bacterias lisadas.

La muestra de mar o cultivo fue filtrada por 1µm para eliminar la fracción fitoplanctónica presente. Al volumen final se agregó Mitomicina-C (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1µg ml⁻¹. Las muestras se colocaron en condiciones de oscuridad entre 6-12 horas. Transcurrido el tiempo fueron

fijadas con formaldehído al 1% y teñidas con colorante SYBR Green para la cuantificación con microscopia de epifluorescencia de partículas virales (*ingl. virus like particles, VLP's*) y bacterias.

4.2 Cuantificación celular por microscopia de epifluorescencia

La microscopia de epifluorescencia es un método eficaz para la identificación y cuantificación de microorganismos, basándose en la propiedad de fluorescencia de marcadores moleculares fluorescentes llamadas fluorocromos. Los fluorocromos tienen alta afinidad por compuestos biológicos de interés, como los ácidos nucleicos y trabajan con determinadas longitudes de onda de excitación y emisión específicas. En estudios de microorganismos acuáticos, los fluorocromos empleados con mayor frecuencia son el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) específico para ADN, y SYBR Green I (Invitrogen) específico para ambos tipos de ácidos nucleicos: ADN y ARN (Porter y Feig, 1980; Noble y Fuhrman, 1998). La autofluorescencia de la clorofila-a puede ser suficiente para ser detectada por microscopia de epifluorescencia, así como las ficobiliproteínas en las cianobacterias y parte del fitoplancton fototrófico como los dinoflagelados.

Para este trabajo se utilizaron dos tipos de fluorocromos: DAPI para la cuantificación e identificación de diatomeas y bacterias heterótrofas presentes en los bioensayos y SYBR-Green I para la cuantificación e identificación de bacterias y VLP's. Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioskope II plus, Carl Zeiss, Oberkochen) lámpara de excitación de Xenon acoplado por fibra óptica, con un objetivo 100 x y una cámara CCD (Clara E, Andor). El control de filtros de excitación, emisión, nivel de enfoque y toma de imágenes está controlado por el programa ©MicroManager (Vale Lab, UCSF 2006-2011). Se tomaron series verticales de imágenes o *stacks* (*ingl.*) a diferentes niveles de enfoque, que permiten el análisis de una muestra en toda su dimensión Z, abarcando todos los organismos presentes. Posteriormente se realizó el análisis digital, fusionado el compilado de imágenes como una sola, agregando color para la identificación de diferentes fluorocromos utilizando el programa ImageJ (National Insititute of Health, USA).

DAPI como fluorocromo para cuantificación en bioensayos.

De cada cultivo experimental se tomó una muestra de 500 μl que fue filtrada por 0.4 μm donde permaneció la fracción fitoplanctónica y 0.2 μm para la fracción bacteriana. Las muestras fueron teñidas con el fluorocromo DAPI a una concentración de $1\mu\text{g ml}^{-1}$. El DAPI se entrelaza con la doble hélice de ADN aumentando su eficiencia cuántica de fluorescencia y tiene una alta afinidad a los enlaces timina – adenina. Esto hace posible observar el núcleo de *T. pseudonana* y las bacterias heterótrofas presentes en la muestra. La excitación de DAPI se da en el UV (365 nm) y la emisión en la banda azul (>420 nm). La luz emitida del núcleo en *T. pseudonana* fue suficiente para reflejarse en la pared celular de sílice y facilitar así la identificación de estas células (Fig 5).

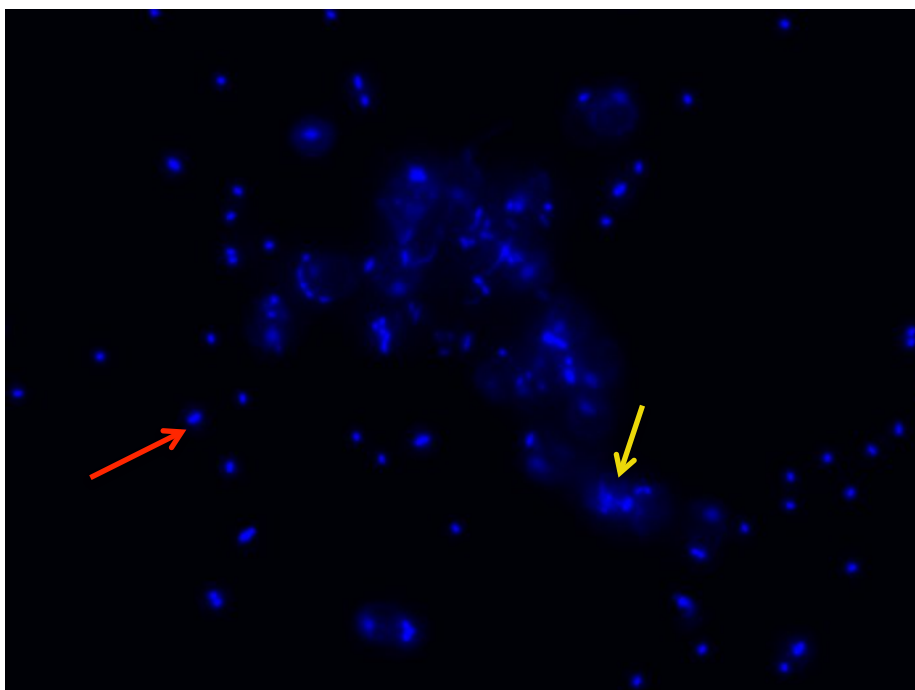


Figura 5. *Thalassiosira pseudonana* + bacterias heterótrofas teñidas con DAPI. Flecha roja, célula bacteriana, flecha amarilla, núcleo de *T. pseudonana*. Emisión en canal azul a 445 nm, tinción de ADN excitado a 352 nm. Tamaño de la imagen 63 μm x 85 μm . Objetivo 100 x.

Autofluorescencia

T. pseudonana posee clorofila (Chl-*a*), de modo que sobre la misma muestra teñida con DAPI fue posible observar la autofluorescencia de los cloroplastos y con esto confirmar la identidad de los organismos fototróficos. Para la autofluorescencia se utilizó el filtro dicróico y de emisión para tomar imágenes entre los 662 y 728 nm (Fig. 6).

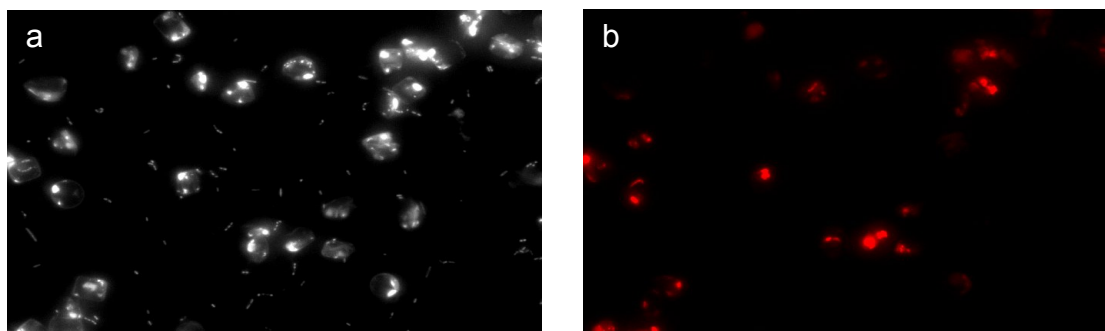


Figura 6. *Thalassiosira pseudonana* con microscopia de fluorescencia. a) *T.pseudonana* teñido con DAPI, imagen gris. b) Auto-fluorescencia de cloroplastos de *T. pseudonana* excitados a 488 nm (color rojo falso de *Image J*). Tamaño cada imagen 63 μm x 85 μm . Objetivo 100x.

SYBR como fluorocromo para cuantificación de bacterias heterótrofas y VLP's

La cantidad de ADN contenida en los virus es muy baja a diferencia de la contenida en las bacterias, lo cual dificulta los conteos de estas partículas con fluorocromos como DAPI debido a un rápido blanqueamiento del fluorocromo. Por esta razón, en muestras donde se busca determinar la abundancia bacteriana pero principalmente la viral, se utiliza el fluorocromo SYBR Green I. Este colorante fluorescente con base de cianina, tiene alta afinidad a los dos tipos de ácidos nucleicos (ADN y ARN), en comparación con DAPI, es más brillante y no muestra incompatibilidad con los conservadores como el formaldehído (Shibata *et al.*, 2006). El SYBR Green I se excita a una luz azul (450-490 nm) y emite en el verde o amarillo (520 nm) y ha sido utilizado en la estimación de abundancias virales en muestras oceánicas (Suttle y Fuhrman, 2010). Un mililitro de muestra natural o de cultivo fue fijada con formaldehído al 1% por >15 min a - 4°C y filtrada en un filtro Anodisc (Whatman) de 0.02 μm . El

filtro con la fracción viral y bacteriana se coloca en 13 μL de solución SYBR Green a una concentración 10,000 x (longitud de onda de 494 nm), dejándose por 15 minutos en la oscuridad. La muestra teñida se coloca sobre una solución de montaje (900 μL de PBS y glicerol con 100 μL de 0.1% de p-fenilenediamina) la cual sirve para reducir el blanqueamiento del fluorocromo al momento de la excitación y análisis con microscopia de epifluorescencia. El conteo de abundancia bacteriana y partículas virales se realiza en las imágenes obtenidas por microscopia de epifluorescencia, con un objetivo de 100x y aceite de inmersión. Se toman de 10 a 20 campos al azar para la estimación de abundancia (C , células ml^{-1}) registrando la suma de partículas (N) contadas en todos los campos contados (n) el área de campo microscópico en mm^2 (A_m) el área del filtro en mm^2 (A_f) y el volumen de la muestra filtrada en ml (S).

$$C [\text{células ml}^{-1}] = (N n^{-1}) (A_f A_m^{-1}) S^{-1} \quad (1)$$

Debido al tamaño relativamente pequeño de los virus, se pueden tener errores de falsos positivos al momento del análisis y cuantificación, ya sea porque una partícula viral puede ser confundida con una bacteria de menor tamaño o por fracciones de ADN extracelular cuantificados como virus. Por este motivo, estos son llamados “partículas semejantes a virus” (*virus like particles*, VLP's *ingl.*).

4.3 Monitoreo de crecimiento algal por fluorescencia *in vivo*

El crecimiento específico de cultivos algales se parametriza con un cambio de biomasa (ΔB) por promedio de biomasa (B^{-1}) y unidad de tiempo (t^{-1}). En los cultivos discontinuos, de lote o *Batch* (*ingl.*) se requieren mediciones en series de tiempo de biomasa para obtener la tasa de crecimiento. Esto puede obtenerse por conteos celulares o mediante el uso de parámetros indicadores como la fluorescencia *in vivo* (Wood et al., 2005) los cuales deben tener una relación con la abundancia celular. La medición por fluorescencia *in vivo* es una medida indirecta de biomasa en relación a la concentración de clorofila y su fluorescencia. Esta relación puede cambiar con el estado fisiológico de los organismos en cultivo, por lo que queda sujeta a variables como la

disponibilidad de nutrientes, el nivel de irradiancia o el ciclo diurno de la eficiencia cuántica de la fluorescencia. Cuando la energía luminosa es absorbida por pigmentos fotosintéticos, parte de esta energía es atrapada en el centro de reacción donde es químicamente útil y otra parte es disipada como calor o re-emitida como fluorescencia (González *et al*, 2008). La relación entre estos tres procesos puede cambiar con el estado fisiológico, típicamente hay una depresión de la fluorescencia aproximadamente al medio día (luz natural) por sobresaturación de luz o una depresión menor por la tarde en condiciones de irradiancia más baja como la luz artificial. La eficiencia diurna dependerá del estado fisiológico actual del cultivo, se espera que durante el crecimiento exponencial donde el estado fisiológico es constante, la fluorescencia sea un indicador adecuado. Para este trabajo, los bioensayos experimentales (mencionados a detalle en la sección 4.6) se colocaron en una incubadora para su crecimiento en condiciones de 12/12 (luz/oscuridad) a una irradiancia de $100 \mu\text{M cuantas m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 20°C . Tratando de minimizar las variables, se tomó diariamente cada bioensayo experimental (10ml) entre las 13:00 y 14:00 horas para la medición de fluorescencia, utilizado un fluorómetro (Turner Designs 10) conectado a un voltímetro digital.

4.4 Bioensayos

Los estudios de bioensayos nos ofrecen aproximaciones del crecimiento de las especies a sus condiciones naturales, definidas por su respuesta fisiológica. En el caso de las microalgas, responden a perturbaciones en su ambiente y su aclimatación de crecimiento se logra después de una larga exposición a condiciones estables. El concepto de las vitaminas como nutrientes limitantes para el crecimiento del fitoplancton se conoce desde los años 70's, cuando Carlucci y Silbernagel (1969) y Provasoli (1963) utilizaron diferentes especies en cultivos discontinuos para estudios de rendimiento en acuicultura. En este tipo de trabajos, las microalgas axénicas eran colocadas en medios de cultivo con vitaminas y sin vitaminas, cuantificando la biomasa máxima de la fase estacionaria de acuerdo al principio de limitación de Liebig (o ley del mínimo) donde el rendimiento final de un cultivo, es determinado por la concentración

inicial del nutriente que presenta una disponibilidad más baja que el requerimiento celular, en este caso, las vitaminas. Nuestro trabajo con bioensayos busca demostrar las interacciones (simbiosis) entre microorganismos productores de vitaminas (bacterias) y consumidores dependientes (fitoplancton) de vitaminas. Para el desarrollo de los bioensayos, se adquirió una cepa de fitoplancton auxótrofo de vitaminas, la diatomea *Thalassiosira pseudonana* (*T. pseudonana*) cepa CCMP1335 del National center for Marine Algae and Microbiota (EEUU). *T. pseudonana* es una microalga eucariota unicelular, perteneciente a la división Bacillariophyceae, céntrica, con aproximados 5 µm de diámetro (Fig. 7). Fue la primera eucariota marina a la cual se secuenció su genoma completo, con 34 millones de pares de bases (Armbrust et al., 2004). *T. pseudonana* produce paredes celulares a base de sílice con nano patrones porosas, es resistente y robusta, de rápido crecimiento específico (tasas por día), ideal para los objetivos de este trabajo.

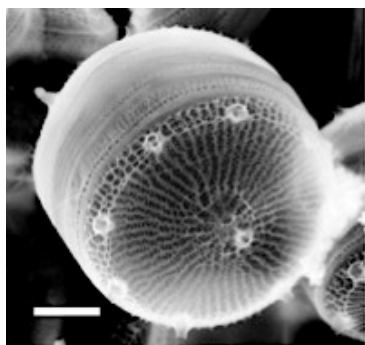


Figura 7. *T. pseudonana* en microscopia electrónica de barrido. Escala 5µm. Recuperado de Gröger et al., 2007, *Journal of Structural Biology*, 161(1), pp. 56.

Las bacterias heterótrofas libres en suspensión se obtuvieron en la costa de la Bahía de todos Santos de muestras de agua tomadas a 5 metros de profundidad. Para separarlas de los demás organismos, se utilizaron filtros GFF de 45 mm de diámetro con luz de poro de 0.8 µm. *T. pseudonana* y las bacterias heterótrofas se inocularon en un medio de cultivo L1 de Guillard y Hargreaves (1993) al 50 % con nutrientes inorgánicos (N, P, Si y Mt) sin vitaminas y sin glucosa. La glucosa es un sustrato orgánico de crecimiento para las bacterias heterótrofas así como las vitaminas para *T. pseudonana*. Se realizaron 4 diferentes tratamientos, cada uno colocado en un tubo de ensayo con diferentes condiciones de vitaminas y glucosa que se describen a detalle en el apartado de metodología y diseño experimental. Para caracterizar el crecimiento de *T.*

pseudonana, se utilizaron las tasas máximas de crecimiento específicas ($\mu_{\max}$) de cada tratamiento.

4.5 Cultivos axénicos de *T. pseudonana*

Antes del montaje de nuestros bioensayos, fue necesario tratar con antibióticos los cultivos madre de *T. pseudonana* para eliminar la fracción bacteriana presente. Se realizó un tratamiento de antibióticos utilizando una mezcla de Penicilina $\sim 5000 \text{ U ml}^{-1}$, Neomicina 10 mg ml^{-1} y Estreptomicina 5 mg ml^{-1} (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.3 ml y 0.4 ml por cada 10 ml de cultivo madre de *T. pseudonana*. Después de 72 horas de aplicada la dosis, 1 ml de cada tratamiento se transfirió a 10 ml de nuevo medio L1 (N, P, Si y M.T) al 10% de su concentración nominal (Anexo 1.1) Simultáneamente se tomó una muestra de cada tratamiento para ser observada por microscopia de epifluorescencia, con la técnica de tinción DAPI para la cuantificación de bacterias. Los cultivos fueron monitoreados diariamente con fluorescencia para determinar el crecimiento de *T. pseudonana* incubándose a 20°C alternando luz y oscuridad (12/12 hrs). Una vez obtenidos los cultivos axénicos, éstos se utilizaron para el montaje del diseño experimental con Bioensayos.

4.6 Diseño experimental: *T. pseudonana* + Bacterias Heterótrofas a diferentes condiciones de crecimiento

Antes del desarrollo experimental, se estandarizaron condiciones para el medio de cultivo donde se inocularán *T. pseudonana* y las bacterias heterótrofas, estas condiciones se mantuvieron sin modificación para todos los tratamientos:

- El agua de mar utilizada para los bioensayos se colectó de la costa cercana a Bahía de Todos Santos, cerca del sitio Flucar a 31.671° latitud norte y 116.693° longitud oeste (Fig. 8) a una profundidad de 5 metros.

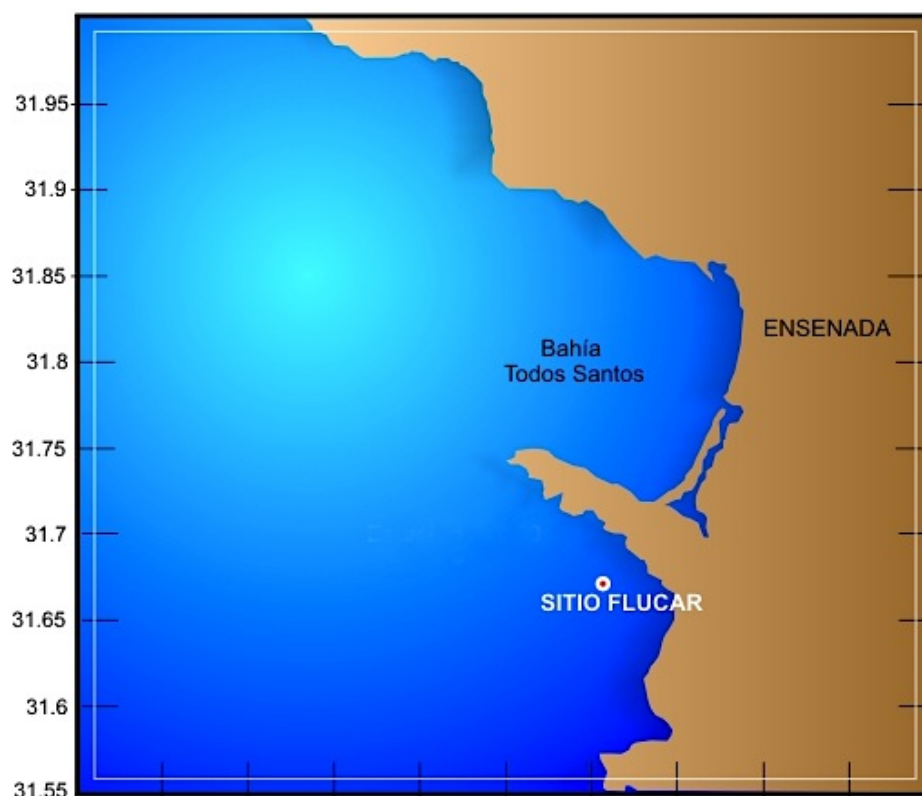


Figura 8. Estación Flucar. 31.671° latitud norte y 116.693° longitud oeste. Recuperado y modificado el 26 de Agosto de: <http://www.flucar.cicese.mx>.

Esta agua fue tratada siguiendo el protocolo de ozonificación (Anexo 1.2), con el objetivo de minimizar la cantidad de la materia orgánica lábil presente. Posteriormente se burbujeó con CO₂ y se esterilizó en autoclave, para después ponerse en equilibrio con el aire llegando a un pH de 8 - 8.2.

- *T. pseudonana* y las bacterias heterótrofas fueron inoculadas en medio de nutrientes L1 de Guillard y Hargreaves (1993) (anexo 1.3) al 50% de su concentración nominal. Las condiciones de incubación fueron a temperatura de 20°C, con 12/12 Luz/oscuridad.

Para cada bioensayo se colocaron 10 ml de agua de mar en tubos de ensayo. En total fueron 12 bioensayos, 6 con su réplica, a los cuales nombramos “tratamientos” para su identificación experimental. 4 de ellos fueron la combinación de *T. pseudonana* con bacterias heterótrofas a diferentes condiciones de vitaminas y glucosa y los otros 2 fueron controles de *T. pseudonana* axénica con y sin vitaminas. Los tratamientos experimentales donde interactuaban *T. pseudonana* con bacterias heterótrofas se inocularon

con 400 μL de cultivo axénico de *T. pseudonana* y 15 μL de bacterias heterótrofas de una muestra de agua costera de la bahía, previamente filtrada por 0.4 μm . Para los controles de *T. pseudonana* con vitaminas y sin vitaminas se inocularon 400 μL de *T. pseudonana* axénica. Las vitaminas que se aplicaron pertenecen al kit de L1, un combinado de vitaminas B_1 , B_7 y B_{12} . Se agregaron 1.25 μL de este combinado por cada 10 ml de medio. La glucosa (Sigma-Aldrich) se agregó a una concentración de 20 pM para los tratamientos donde se utiliza como nutriente orgánico para las bacterias (Fig 9).

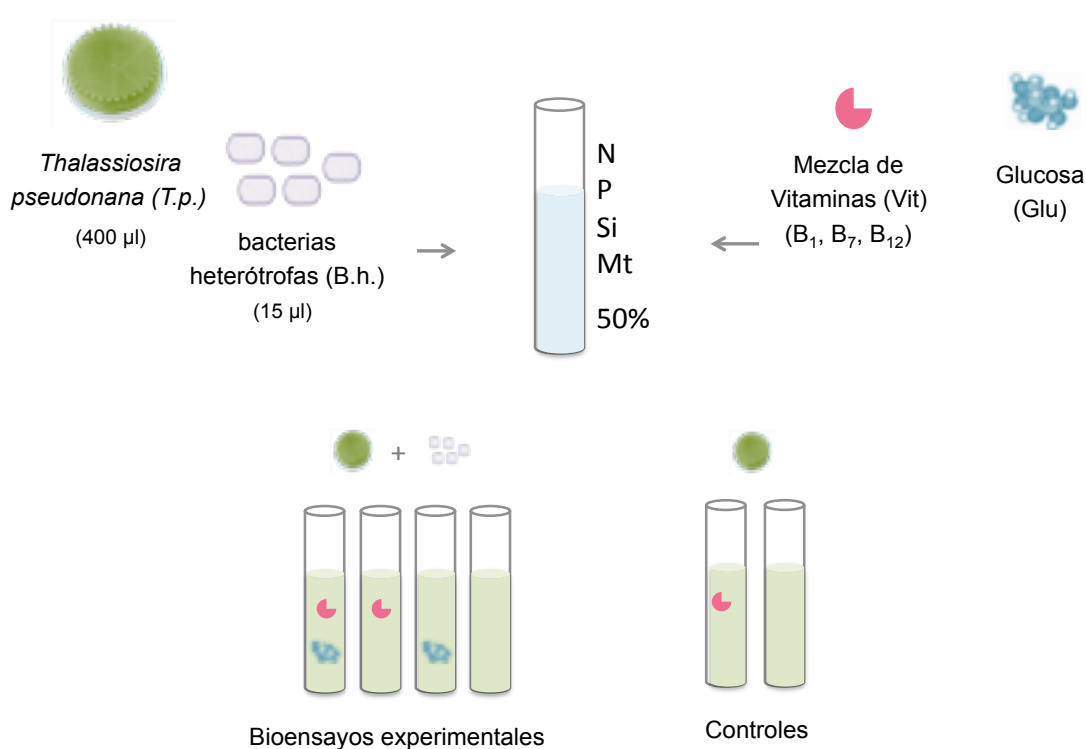


Figura 9. Diseño experimental de los bioensayos que muestran a las especies modelo *T. pseudonana* y bacterias heterótrofas inoculadas en un medio de cultivo L1 al 50% de su concentración nominal con Nitrógeno (N), Fósforo (F), Silicatos (Si) y Metales traza (Mt). Las vitaminas y glucosa son aplicadas a 4 diferentes tratamientos donde interactúan estos grupos celulares y 2 controles de *T. pseudonana* axénica.

Una vez montados los bioensayos, cada tratamiento fue monitoreado diariamente con fluorescencia *en vivo* para estimar el crecimiento de *T. pseudonana* y por conteos celulares para las bacterias heterótrofas. A cada tubo con bioensayo se agregó un agitador de teflón para facilitar el agitación manual antes de cada medición de fluorescencia. Se realizaron recambios de

tratamientos cada 10 días, cuando *T. pseudonana* típicamente se encontraba en su fase exponencial tardía de crecimiento. Se inocularon 400 µL de cada tratamiento en 10 ml de medio de cultivo L1 al 50% de su concentración nominal manteniendo las condiciones experimentales de nutrientes para cada tratamiento.

Descripción de los tratamientos experimentales

Recordando que todos los tratamientos cuentan con nutrientes inorgánicos (N, P, Si y Mt) del medio de cultivo L1 al 50%, las condiciones variables serán las vitaminas y la glucosa presentes (Fig. 10).

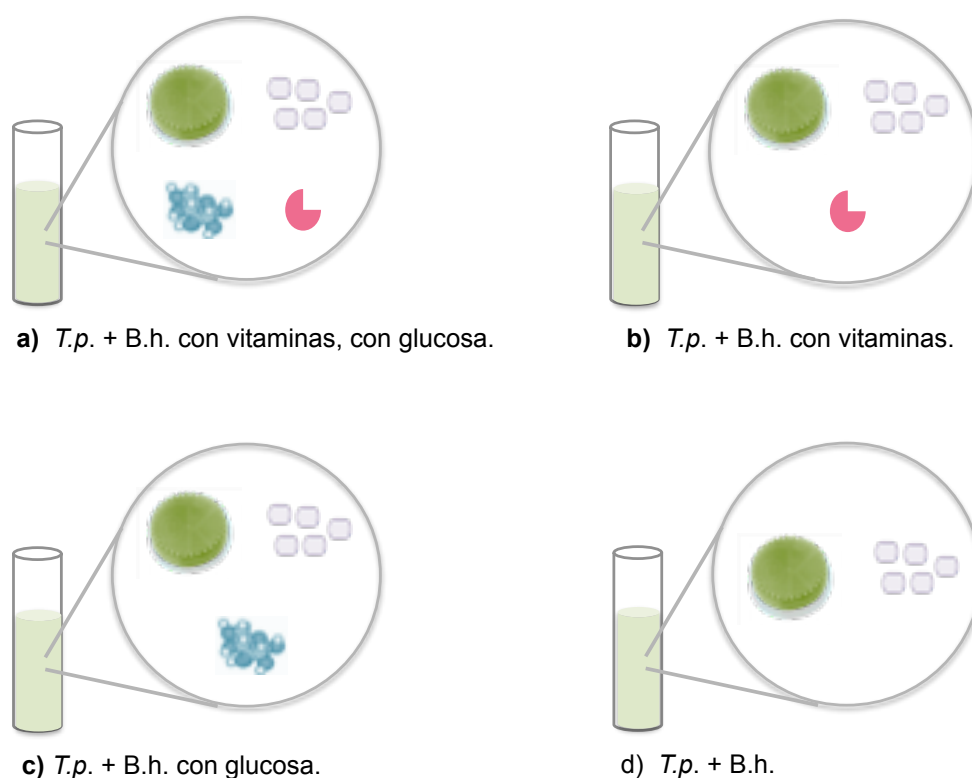


Figura 10. Descripción de los tratamientos experimentales a diferentes condiciones de crecimiento para *T. pseudonana* (*T. p*) en combinación con las bacterias heterótrofas de la bahía (B.h). a) *T. pseudonana* más b. heterótrofas con vitaminas y glucosa. b) *T. pseudonana* más b. heterótrofas con vitaminas, sin glucosa. c) *T. pseudonana* más b. heterótrofas sin vitaminas, con glucosa y d) *T. pseudonana* más b. heterótrofas sin vitaminas, sin glucosa.

✚ Tratamiento 1: *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas
con Vitaminas, con Glucosa.

En este tratamiento no esperamos simbiosis, ya que *T. pseudonana* se encuentran en estado óptimo de crecimiento con la adición de vitaminas. Las bacterias presentes no necesitan los exudados orgánicos de *T. pseudonana*, de este modo no hay probabilidad de interacción entre especies en la búsqueda del nutriente limitante (Fig. 10 a).

✚ Tratamiento 2: *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas
con Vitaminas, sin Glucosa.

T. pseudonana cuenta con un aporte de vitaminas, por lo tanto es poco probable que exista una dependencia a las bacterias productoras. Las bacterias por su parte buscarán los exudados orgánicos de *T. pseudonana* para cubrir su demanda de fuente para la energía celular. Se espera una simbiosis de tipo comensalismo, donde las bacterias heterótrofas resulten beneficiadas del aporte orgánico de *T. pseudonana*, sin que a las diatomeas represente una ganancia. Posiblemente después de varios recambios en este tratamiento, las bacterias que se mantengan en el cultivo serán aquellas que sean beneficiadas con la presencia de *T. pseudonana* (Fig. 10 b).

✚ Tratamiento 3. *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas
sin Vitaminas, con Glucosa.

El medio no cuenta con un aporte de vitaminas para *T. pseudonana*, razón por la cual ésta podría buscar el aporte de las bacterias heterótrofas productoras en una simbiosis de comensalismo. Las bacterias heterótrofas no se verán en la misma necesidad de una interacción con *T. pseudonana*, y al contar con suficiente glucosa estaríamos esperando dos cosas: 1) Que exista mayor abundancia de bacterias, las cuales ofrezcan mayor cantidad de vitaminas. 2) Que además de ser abundantes, las bacterias sean de mayor tamaño, razón por la cual exista una posible competencia por los nutrientes inorgánicos con *T. pseudonana* (Fig. 10 c)

Tratamiento 4: *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas
sin Vitaminas, sin Glucosa.

En estas condiciones de crecimiento se espera una potencial simbiosis entre especies. *T. pseudonana* a falta de vitaminas cuenta con el aporte de las bacterias heterótrofas presentes, las cuales utilizarán los exudados orgánicos de *T. pseudonana* como fuente de energía. Considerando que a microescala las condiciones de viscosidad limitan el roce celular, se esperan dos posibles vías de adquisición de estos nutrientes: a) Por contacto directo: Las bacterias heterótrofas serán epibiontes en la pared celular de *T. pseudonana* rica en componentes orgánicos, estableciendo el intercambio de vitaminas. b) *T. pseudonana* exuda materia orgánica al medio, donde las bacterias heterótrofas pueden acceder sin hacer simbiosis directa y *T.p.* accede a las vitaminas en dilución del medio (Fig. 10 d).

Controles

Estos tratamientos, al igual que los combinados, serán recambiados cada 10 días con medio L1 al 50%, manteniendo las mismas condiciones experimentales de nutrientes (Fig. 11).



Figura 11. Cultivos control de *Thalassiosira pseudonana* (T.p.) axénica con I) vitaminas y II) sin vitaminas.

T. pseudonana axénica, con Vitaminas

T. pseudonana sin bacterias y con vitaminas, servirá de base para monitorear el crecimiento esperado y contrastar publicaciones previas que hablan de la importancia de las vitaminas en microalgas.

T. pseudonana axénica, sin Vitaminas

Segunda referencia de qué sucede cuando el fitoplancton está limitado de vitaminas. Al no contar con bacterias, las probabilidades de que sobreviva a varios recambios son muy bajas, esperando una disminución con el tiempo.

4.7 Cultivos de *Dinoroseobacter shibae* para cuantificación de vitamina B₁₂

Perteneciente al clado Roseobacter, *Dinoroseobacter shibae* es una alfa-proteobacteria epibionte de dinoflagelados, la cual se ha demostrado es capaz de crecer de los metabolitos excretados por estos miembros del fitoplancton, como la degradación de dimethylsulfoniopropionate (DMSP) para la obtención de productos volátiles de azufre (Moran y Miller, 2007 en Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Queda claro que estas bacterias pueden prosperar con los metabolitos de algas, pero no se conoce aún la ventaja para el fitoplancton anfitrión. Con el objetivo de cuantificar la vitamina B₁₂ intracelular, se realizó un cultivo de la bacteria *Dinoroseobacter shibae* (DFL12), la cual conoce es productora de vitamina B₁₂ (Biebl *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2010). La cepa fue adquirida del National Center for Marine Algae and Microbiota (NMCA, EEUU). y de ésta se montaron dos tipos de cultivos con diferentes nutrientes para su crecimiento, uno a base de peptona (0.625 gL⁻¹) y levadura (1 gL⁻¹) (Sigma S9883) y otro utilizando peptona (0.625 gL⁻¹) y glucosa (0.1 gL⁻¹) en reemplazo a la levadura. Debido a que la levadura contiene vitaminas, se espera que la cuantificación final en la extracción de vitamina B₁₂ del cultivo con glucosa sea resultado de la producción intracelular. Este estudio se llevó a cabo para las pruebas de cuantificación con HPLC, independiente a los bioensayos. La extracción de vitamina B₁₂ se realizó siguiendo el método de Wyk y Britz

(2010) que se menciona en los apartados siguientes. Ambos cultivos fueron monitoreados utilizando microscopia de epifluorescencia con tinción DAPI.

4.8 Cuantificación de la vitamina B₁₂ en el océano

Actualmente el estudio de las vitaminas en el océano es un tema poco explorado debido a la dificultad de cuantificación. Para la vitamina B₁₂, estas concentraciones van de ~60 pM en aguas costeras y ~20 pM para aguas oceánicas (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2006), lo cual requiere trabajar con volúmenes de muestra mayor a 2 litros para concentrar la vitamina presente. Hace 20 años, el uso de bioensayos era el único método de cuantificar las vitaminas, sin embargo, los resultados estaban sujetos a errores debido a factores como la fisiología del organismo cultivado y las condiciones ambientales de su crecimiento. Cabe señalar que hasta el momento los estudios de vitamina B₁₂ en el océano se basan en la vitamina disuelta, para nuestros objetivos fue necesario estandarizar una metodología para la vitamina B₁₂ intracelular, tomando el protocolo de extracción de vitamina de Van Wyk y Britz (2010) y técnicas de fracción celular combinados con tratamiento por temperatura para la liberación de la vitamina B₁₂ ligadas a posibles proteínas. Para la vitamina B₁₂ que se encuentra disuelta se utilizó el protocolo de extracción y concentración con fase sólida de Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004).

Las concentraciones de vitamina B₁₂ reportadas en el océano se encuentran por debajo del límite de detección de los métodos de cuantificación disponibles, que incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC - 0.1 g L⁻¹) y recientemente técnicas moleculares como el método de inmunoensayo ELISA (0.2 µg ml⁻¹). En el presente trabajo se analizaron dinámicas ecológicas a escalas microbianas en diseños experimentales de 10 milímetros, para su cuantificación fue necesario escalar el cultivo a un volumen de 2 litros, obteniendo tres parámetros para cuantificar la vitamina B₁₂: Fracción de B₁₂ disuelta en el agua, fracción de B₁₂ intracelular de las bacterias y la fracción de B₁₂ intracelular del fitoplancton (*T. pseudonana*).

4.8.1 Extracción de vitamina B₁₂ intracelular

Para cuantificar la vitamina B₁₂ intracelular tanto del fitoplancton como de las bacterias, la muestra fue pasada por un sistema de filtrado secuencial pasando primero por filtros GF-D de 1.5 µm donde se retuvo la fracción fitoplanctónica y después por filtros de policarbonato de 0.2 µm tamaño de poro para obtener la fracción procariota. Las muestras en filtro fueron colocadas en buffer de cianuro de sodio (NaCN) a una concentración de 1M, con un pH de 4.5 con el objeto de convertir las diferentes formas de cobalamina (adenosincobalamina, metilcobalamina, hidroxycobalamina, sulfitocobalamina) a Cianocobalamina, su forma más estable (Fig. 12) haciendo más específica la selección y concentrando más la vitamina B₁₂ al cuantificar por HPLC (Wyk y Britz, 2010).

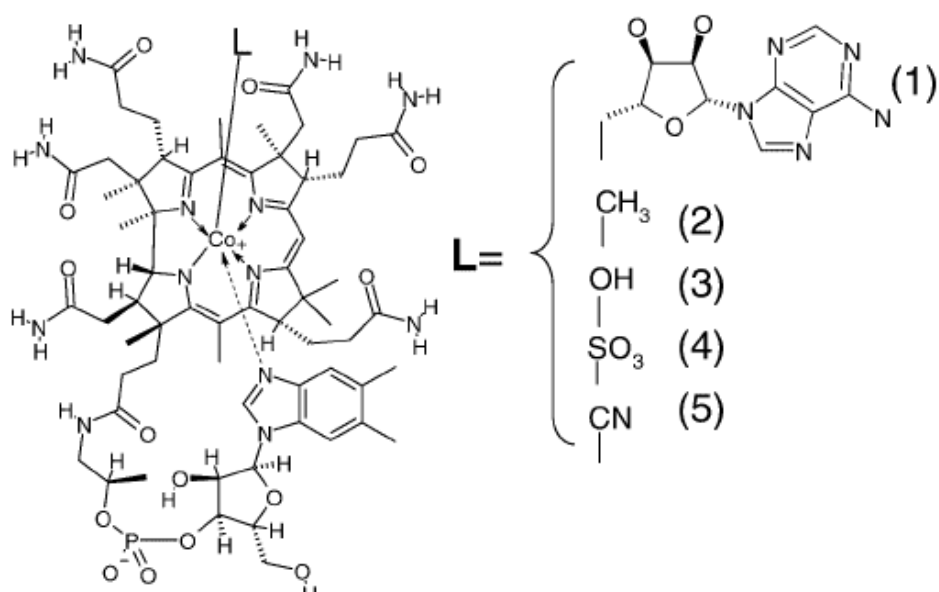


Figura 12. Estructura de la cobalamina (vitamina B₁₂) y sus diferentes formas representadas con L. 1:5'deoxyadenosylcobalamina; 2:metilcobalamina; 3:hidroxycobalamina; 4:sulfitocobalamina; 5: cianocobalamina o vitamina B₁₂. Recuperado de Watanabe., 2007, *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), pp. 1267.

Para el caso de la medición con el inmunoensayo ELISA, el uso del buffer NaCN no es necesario, debido a que este método reconoce todas las formas de cobalamina presentes en la muestra, por lo cual se ha considerado que la

extracción con H₂O es suficiente. Las muestras en extracción son protegidas de la luz y tratadas alternando congelamiento-descongelamiento “freeze-thaw” a -40 y 60 °C a 60/60 minutos para romper la pared celular y liberar la vitamina B₁₂ intracelular, aplicando Vórtex por 3 minutos entre cada descongelamiento para homogenizar. La muestra extraída es centrifugada a 13,000 rpm por 10 minutos. Según Wyk y Britz (2010) la vitamina B₁₂ puede estar ligada con proteínas, por lo que las muestras se colocaron en autoclave a 121 °C durante 25 min, el tratamiento con calor desnaturaliza la proteína desligándola así de la vitamina B₁₂.

4.8.2 Pre-concentración y extracción de vitamina B₁₂ disuelta

El volumen de muestra líquida, que resulta de las filtraciones para la obtención de la fracción particulada, es ajustado a un pH de 6.4 con ácido clorhídrico (HCl-1M). El método de pre-concentración para la vitamina disuelta consiste en hacer pasar la muestra por columnas de fase inversa en un proceso conocido como extracción por fase sólida (*ingl.* SPE). Siguiendo un principio de polaridades, la vitamina B₁₂ (con propiedad polar) se adsorbe de manera relativamente selectiva sobre las partículas de la fase sólida, las cuales poseen un núcleo de sílice cubierto por cadenas de 18 carbonos (C-18) (con propiedad no polar). La muestra concentrada en la columna es eluída con 5 ml de metanol (MeOH), el cual será nuevamente concentrado por calor a 65°C por 1 hora. Esta temperatura es lo suficiente para evaporar el metanol y concentrar la muestra a 2 ml sin modificar las moléculas de vitamina B₁₂. Finalmente, los 2 ml concentrados se llevan a medición ya sea en HPLC o su análisis con ELISA.

4.8.3 Cuantificación de vitamina B₁₂ con HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica utilizada tanto en bioquímica y química analítica para identificar, cuantificar y purificar los componentes de una mezcla. En estudios de vitaminas, el HPLC ha tenido un límite de detección de >0.1 ng L⁻¹ y recientemente de 0.042 ngL⁻¹ como lo

demostrado por Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004) para la determinación de vitamina B₁₂ disuelta en el océano.

El método consiste en dos fases: una estacionaria y una móvil (Skoog *et al.*, 2000). En la fase estacionaria, el compuesto de interés pasa por una columna cromatográfica con la ayuda de una bomba de pistón de alta presión que representa la fase móvil. Dependiendo de las características físico-químicas de los componentes de la mezcla y su interacción con las partículas internas de la columna, los compuestos se separan a diferentes velocidades de migración. El equipo de HPLC empleado en este estudio fue un Spectra Physics 8700 compuesto de una bomba con tres válvulas que controla la composición de la fase móvil, mezclando las soluciones de acuerdo a un gradiente específico programado para el solvente. Las soluciones son: a) 92.5% de Acetato de amonio, 7.5% de MeOH, b) 84% de Acetato de amonio, 16% MeOH y c) 70% de Acetato de amonio, 30% MeOH. La tasa de bombeo es constante a 1ml por minuto. El estándar o la muestra inyectada (50 µL) pasa por una columna de fase reversa (RPC₁₈) de 250 x 5 mm y después a través de un detector espectrofotométrico (HoloChrome UV-monitor, Gilson) donde se mide la absorbancia a 362 nm de la vitamina B₁₂. La columna está compuesta por partículas de sílice cubiertas por carbono octadécilo (C18) que retarda el avance de la vitamina B₁₂ para separarla de otros compuestos contenidos en el extracto crudo. Esta columna fue colocada en baño maría para mantener una temperatura estable a 65 °C con el fin de reducir la presión en el sistema del HPLC al pasar la muestra. Los datos del detector de la presión y tiempo de inyección junto con la absorbancia del detector son registrados digitalmente con un convertidor análogo-digital y computadora.

Previo a la utilización del equipo HPLC se realizaron varios ajustes que consistieron en la regulación de la tasa de bombeo, la eficiencia de la columna C18 para adsorción de vitamina, eliminar las fugas y la formación de burbujas, homogeneizar los solventes mezclados y la regulación de la temperatura de la columna. Una vez montado el equipo, se procesaron las muestras para la cuantificación de vitamina disuelta y particulada donde se utilizaron cultivos de bacterias costeras de la Bahía de Todos los Santos, cultivos de *Dinoroseobacter shibae*, cultivo de *Monochrysis luteri* y agua del cultivo del dinoflagelado

Lingulodinium polyedrum. Cada medición fue contrastada con un estándar vitamina B₁₂ (cobalamina, Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones cercanas al límite de detección del HPLC (0.15 pM) 0.33 gL⁻¹ (solución madre) 0.033 gL⁻¹, 0.0033 gL⁻¹, 0.00165 gL⁻¹. Todas las muestras fueron tratadas con pre-concentración por fase sólida y calor para la obtención de vitamina disuelta y por extracción, concentración y calor para la obtención de vitamina particulada.

4.8.4 Cuantificación de vitamina B₁₂ con ELISA

El método de ELISA (Inmuno-Absorción Ligado a Enzimas) se basa en el reconocimiento de una molécula de interés, que actúa como antígeno, por parte de un anticuerpo específico. Se basa en una interacción de afinidad reversible antígeno-anticuerpo. Se utilizó un kit de ELISA de Immuno lab GmbH (Kassel, Germany) específico para determinar vitamina B₁₂ el cual reconoce todas las formas de vitamina B₁₂ con un 100% de reactividad sin distinguir componentes individuales de B₁₂ (cianocobalamina, metilcobalamina, e hidroxicobalamina). Por lo tanto ELISA cuantifica la cantidad total de vitamina B₁₂ (Zhu *et al.* 2011), a un límite de detección de ELISA de 0.2ng mL⁻¹ ó 150 pM.

Las muestras previamente concentradas fueron colocadas en pozos de microplacas donde se realizó el inmunoensayo competitivo indirecto, involucrando un solo paso de inmunoreacción. Debido al tamaño de la vitamina B₁₂ (P.M.1355.4) se tienen relativamente pocos sitios de unión sobre la molécula limitando la formación del complejo anticuerpo-B₁₂-anticuerpo. La lectura de la cuantificación se obtuvo en un lector ELISA (Thermo scientific multiskan Go) de 450 nm del laboratorio de Biotecnología, en CICESE. Todas las muestras fueron sonicadas por 15 minutos antes de la cuantificación por microscopia y por inmunoensayo ELISA para liberar a *T. pseudonana* de las matrices orgánicas y las posibles bacterias incluidas en esta.

4.8.5 Análisis de los Datos y estimación de tasas de crecimiento utilizando la función Gompertz

Para analizar la respuesta de *T. pseudonana* a los diferentes tratamientos se calculó la tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max}$) utilizando la función de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990).

$$B(t) = a * e^{-e^{-(b - c t)}} \quad (2)$$

donde B es la biomasa promedio, t es el tiempo (días), a , b y c son los parámetros que definen la curva de crecimiento y e es la base natural (número de Euler). La tasa de crecimiento de *T. pseudonana* (μ) es definida como $\mu = \Delta B (\Delta t B)^{-1}$, ΔB es el cambio de la biomasa, por unidad de tiempo (Δt). La función Gompertz asume la curva de crecimiento como una sigmoideal, con un punto de inflexión donde se encuentra la tasa máxima de crecimiento (Zwietering *et al.*, 1990). En la fase inicial de la curva se observa un periodo donde la tasa de crecimiento es cercana a cero, conocida como fase *lag* que representa el tiempo de aclimatación de *T. pseudonana* a las condiciones de nutrientes iniciales, seguida de una fase exponencial, que depende del aporte de vitaminas, la cual tendrá un punto máximo con una línea tangente en el punto de inflexión. La asíntota (biomasa) máxima dependerá de los factores fisiológicos en respuesta a los tratamientos, como la ausencia de uno o varios nutrientes o la respuesta al aporte de vitaminas como las del combinado del medio L1 (B_1 , B_7 y B_{12}). Los parámetros utilizados en la ecuación de Gompertz nos representan estas tres fases del crecimiento; donde a es el nivel de la asíntota ($A = \ln(B_{t\infty}/B_{t0})$) como el valor máximo alcanzado por la población, b la fase lag, donde intercepta el eje X con la tangente y c la tangente en el punto de inflexión (Fig 13).

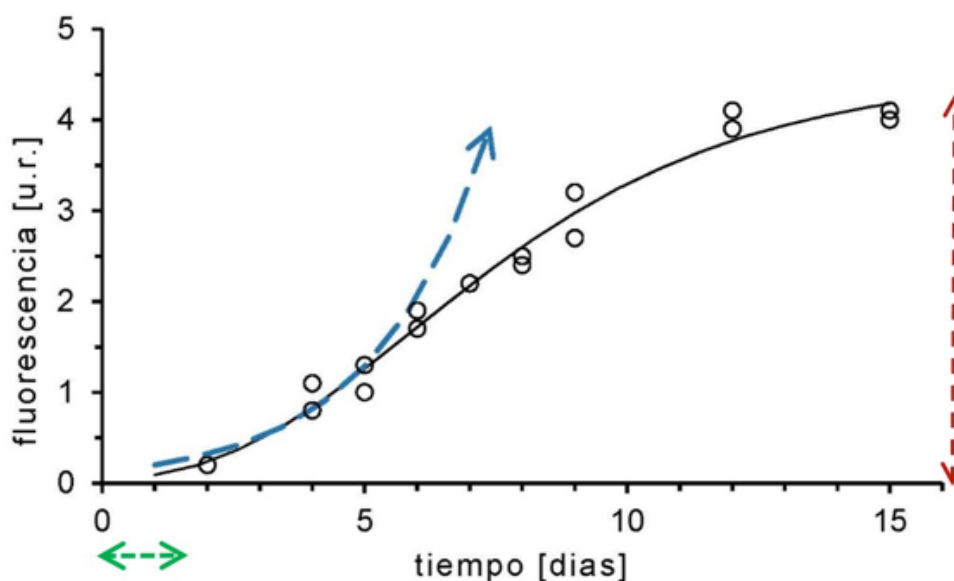


Figura 13. Análisis de tasa específica de crecimiento máxima (μ_{max}) con función Gompertz. Los círculos representan los datos del bioensayo. Los parámetros de la ecuación Gompertz se indican con las flechas: a (rojo) biomasa máxima; b (verde) periodo lag; c (azul) μ_{max} . En este ejemplo, el valor $\mu_{max} = a c e^{-1} = 0.47$ (día⁻¹).

Los datos que se emplearon para el análisis de crecimiento fueron los valores de fluorescencia de cada tratamiento. El análisis de datos se efectuó con el software STATISTICA® (Stat Soft, 10.0) utilizando el algoritmo Levenberg-Marquardt buscando de manera iterativa los parámetros de la ecuación Gompertz, minimizando los errores cuadrados entre los datos numéricos y los datos experimentales. Una vez obtenidos los parámetros, la tasa máxima específica de crecimiento es calculada con la ecuación de Zwietering *et al*, (1990).

$$\mu_{max} = a c e^{-1} \quad (3)$$

Donde e representa la base natural.

5. Resultados

5.1 Pruebas metodológicas para la cuantificación de vitamina B₁₂ con HPLC.

Se llevaron a cabo más de 16 pruebas de cuantificación de vitamina B₁₂ disuelta y particulada en trabajo conjunto con el estudiante de doctorado Josué Villegas (UABC). Estas pruebas incluyeron cultivos de bacterias costeras de la Bahía de Todos los Santos, cultivos de *Dinoroseobacter shibae* (bacterias productoras de vitamina B₁₂), cultivo de *Pavlova lutheri* (antes *Monochrysis luteri*, microalga auxótrofa) crecida en medio con vitaminas y agua del cultivo de *Lingulodinium polyedrum* (dinoflagelado) No se obtuvo señal de vitamina B₁₂ en ninguna de las muestras procesadas (Anexo 2).

Antes de medir cada muestra, un estándar de vitamina (cobalamina, Sigma Aldrich) era inyectado en el HPLC para corroborar el funcionamiento del equipo. Todos los estándares mostraron señal en fotómetro a los 362 nm correspondiente al máximo de absorción de vitamina B₁₂, a concentraciones de 0.33 gL⁻¹ (solución madre) 0.033 gL⁻¹, 0.0033 gL⁻¹ y 0.00165 gL⁻¹ mostrando la detectabilidad del compuesto por el equipo. Estos datos servirían además para contrastar la presencia de vitamina en la muestra de interés. Todas las pruebas siguieron a fidelidad el protocolo propuesto por Okbami y Sañudo, 2007 respetándose los valores indicados para los solventes, pH, elución, velocidad de flujo, y ajustándose la temperatura, presión, tiempos y gradientes. En las primeras pruebas se utilizó agua de mar siguiendo el objetivo de estimar las concentraciones de vitamina presente en el océano. Sin embargo, no se obtuvieron resultados, los cromatogramas no mostraron presencia de vitamina B₁₂ en estas muestras, ni en las posteriores donde se utilizaron diferentes tipos de cultivos (Anexo 2). Hasta el momento, no está claro por qué no fue posible detectar vitamina B₁₂ con nuestro equipo de HPLC. Se esperaba encontrar concentraciones de vitamina B₁₂ en la mayoría de muestras, potencialmente en los cultivos de bacterias a diferencia de las muestras costeras.

5.2 Bioensayos

Los datos de $\mu_{\max}$ de *T. pseudonana* en los cuatro bioensayos experimentales, también llamados tratamientos, sus controles y las réplicas (total de 12 ensayos) fueron analizados con una prueba de normalidad Q-Q (Q = cuartil) la cual compara los valores de una variable con los cuartiles de una distribución teórica específica (en este caso, cada tratamiento en relación a la distribución normal) mostrando que tres de estos tratamientos no presentan una distribución normal (Tabla 2).

Tabla 2. Significancia entre tratamientos resultado de prueba de normalidad Q-Q.

	+ Vit + Glu	+ Vit - Glu	-Vit -+Glu	-Vit - Glu	T.p. + Vit	T.p.
Normalidad (Q-Q)	0.84	0.81	0.93	0.96	0.80	0.93
R crítica (r0.05, 14)	0.93	0.93	0.94	0.93	0.93	0.93
Significancia	no	no	si	si	no	si

Al no haber normalidad en la mitad de nuestros datos, se optó por un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis (Fig. 14) para comparar el crecimiento de *T. pseudonana* en los diferentes tratamientos, en el cual no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Esto indica que la variabilidad en las tasas máximas de crecimiento de *T. pseudonana* tuvo una respuesta similar en las diferentes condiciones experimentales, ya sea añadiendo vitaminas al medio, o en combinación con las bacterias productoras de vitaminas.

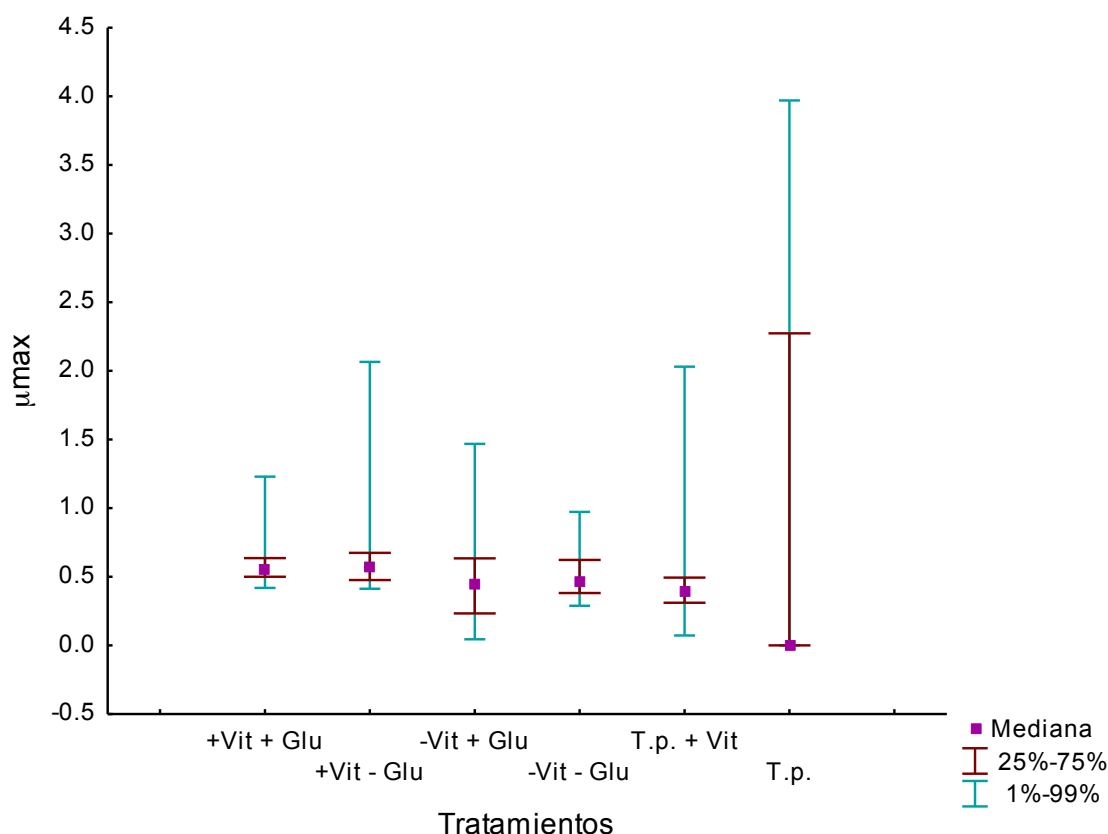


Figura 14. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Diferencias en la $\mu_{\max}$ (día^{-1}) de todos los cultivos para cada tratamiento experimental con el valor de la mediana. De izquierda a derecha: *T.p.* + B.h. con vitaminas, con glucosa (+Vit + Glu), *T.p.* + B.h. con vitaminas, sin glucosa (+Vit - Glu), *T.p.* + B.h. sin vitaminas, con glucosa, *T.p.* + B.h. sin vitaminas, sin glucosa, *T.p.* axénica con vitaminas. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.043$). Barras azules muestran el intervalo de confianza de los datos, barras rojas muestran el rango de datos que caen entre el 25 y 75%. *T.p.* axénica sin vitaminas tuvo crecimiento de tres cultivos con altos valores de $\mu_{\max}$, para después dejar de crecer, el análisis estadístico considera estos tres valores en el 75% de los datos para este tratamiento.

5.2.1 Resultados por tratamientos

Tratamiento 1: *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas con vitaminas con glucosa.

T. pseudonana creció de manera óptima en todos los cultivos, con un valor de $\mu_{\max}$ de 0.6 día^{-1} . La presencia de bacterias no tuvo consecuencias experimentales en el crecimiento de *T. pseudonana* debido a que ambas

especies contaban con los nutrientes esenciales para su crecimiento, por lo que se esperaba que no se presentara simbiosis entre especies.

✚ Tratamiento 2: *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas con vitaminas sin glucosa.

En este tratamiento, *T. pseudonana* creció a una $\mu_{\max}$ de 0.8 dia^{-1} , la mayor tasa de todos los tratamientos, aun sin ser estadísticamente significativa con respecto a los otros tratamientos. El aporte de la mezcla de vitaminas hizo que *T. pseudonana* no dependiera de la simbiosis con bacterias heterótrofas, pero muy probablemente éstas si dependieron de los exudados orgánicos de *T. pseudonana*. La fracción bacteriana creció en una relación de abundancia celular 1:3 con las diatomeas, demostrando un crecimiento casi paralelo. Es posible que al agotarse las vitaminas de la mezcla (B_1 , B_7 y B_{12}), el cultivo continúe en crecimiento con el aporte de vitaminas producidas por las bacterias.

✚ Tratamiento 3: *T. pseudonana* + bacteria heterótrofas sin vitaminas, con glucosa.

Siguiendo el concepto de la producción de vitaminas por bacterias heterótrofas, en el diseño experimental de este tratamiento consideramos que a mayor glucosa, habría más bacterias y por lo tanto más vitaminas producidas. Sin embargo, *T. pseudonana* mostró un descenso en su crecimiento, contrario a lo que se esperaba. La biomasa bacteriana presentó una relación promedio de 7:1 con las diatomeas, llegando a alcanzar valores de 18:1 en algunos cultivos. Por su parte, las diatomeas presentaron una $\mu_{\max}$ de 0.5 dia^{-1} . Este valor ligeramente menor a los tratamientos 1 y 2, no es estadísticamente significativo pero podría indicar que en estas condiciones de nutrientes, la biomasa bacteriana pudo estar compitiendo con *T. pseudonana* por los nutrientes inorgánicos y las vitaminas presentes en el medio.

Tratamiento 4: *T. pseudonana* + bacteria heterótrofas sin vitaminas y sin glucosa.

La presencia de bacterias en combinación con *T. pseudonana* en este tratamiento resultó como lo esperado. El crecimiento de *T. pseudonana* se mantuvo constante en todos los cultivos, siendo incluso más estable en tiempo que los cultivos que contaban con adición de vitaminas. Con una $\mu_{\max}$ de 0.5 día^{-1} y una relación de abundancia con bacterias de 3:1, se demostró un aporte de vitaminas por parte de las bacterias presentes. Aun cuando no se conocen los grupos específicos de las bacterias presentes, las observaciones a microscopio revelan homogeneidad en el tamaño, lo que podría indicar que ciertos grupos fueron compatibles con los exudados orgánicos de *T. pseudonana* aún sin conocer qué porcentaje podría producir vitaminas.

Control: *T. pseudonana* axénica con vitaminas.

El crecimiento de *T. pseudonana* axénica con el aporte de la mezcla de vitaminas tuvo un promedio de tasa $\mu_{\max}$ de 0.5 día^{-1} , similar a los tratamientos 3 y 4. Este resultado confirma que la producción de vitaminas por bacterias es suficiente para mantener a *T. pseudonana* en crecimiento exponencial alcanzando tasas de crecimiento similares a los cultivos donde se agregó la mezcla de vitaminas.

Control: *T. pseudonana* axénica sin vitaminas.

T. pseudonana al no contar con bacterias, ni las vitaminas de la mezcla, muestra su auxotrofia limitando su crecimiento. El valor para la $\mu_{\max}$ durante los primeros 3 cultivos fue de 0.7 día^{-1} , un valor alto comparado con algunos de los tratamientos. Los valores de $\mu_{\max}$ obtenidos representan sólo los tres primeros bioensayos de los ocho en total (Tabla 3). Con tres valores, se complica el ajuste estadístico ocasionando variabilidad paramétrica. El crecimiento de *T. pseudonana* en estos tres cultivos probablemente estuvo apoyado por las

concentraciones de vitaminas presentes en la fracción disuelta y particulada del cultivo primordial, del cual se tomó el inóculo inicial (1ml) para este tratamiento. Las vitaminas presentes en ese mililitro pudieron ser suficientes para mantener el crecimiento de *T. pseudonana* axénica sin vitaminas los siguientes 3 cultivos (26 días), tomando en cuenta que cada cultivo representa una serie de tratamientos (9-10 días cada cultivo) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de $\mu_{\max}$ (día⁻¹) de los tratamientos en 8 cultivos. El tratamiento de *T.p.* axénica sin vitaminas (*T.p.*) mostro crecimiento en los cultivos 2, 3 y 4 (recuadro rojo) para posteriormente caer. El cultivo #1 de tratamientos no presentó crecimiento por ajuste metodológico de nutrientes.

	+Vit + Glu	+Vit - Glu	-Vit + Glu	-Vit - Glu	T.p. + Vit	T.p.
Cultivo 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cultivo 2	1.1	2.1	0.7	0.8	0.1	3.0
Cultivo 3	0.5	0.5	0.8	0.6	0.5	2.3
Cultivo 4	0.6	0.6	0.6	0.7	1.0	0.4
Cultivo 5	0.6	0.6	0.5	0.4	0.3	0.0
Cultivo 6	0.5	0.4	0.6	0.5	0.4	0.0
Cultivo 7	0.6	0.5	0.2	0.3	0.4	0.0
Cultivo 8	0.4	0.7	0.3	0.4	0.3	0.0

En la mayoría de los tratamientos se ve una tendencia de reducción de $\mu_{\max}$ en los cultivos finales.

✚ Cultivo de 2 litros de *T. pseudonana* + B. heterótrofas sin vitaminas, para la cuantificación de B₁₂ extracelular e intracelular.

Los resultados de los bioensayos confirman que la presencia de bacterias en los tratamientos apoya el crecimiento de *T. pseudonana* en un medio sin vitaminas añadidas, respaldando la hipótesis de una producción de vitaminas por procariotas. Entre las vías de adquisición, se mencionó la simbiosis directa bacteria-fitoplancton y la excreción de vitaminas al medio por las bacterias productoras, para cualquiera de estos supuestos, fue necesario mostrarla

existencia de vitamina intracelular (B_{12}), en las bacterias productoras y en *T. pseudonana*. Sin embargo, por el volumen de nuestros bioensayos (10 ml) no era posible cuantificar las concentraciones de vitamina B_{12} presentes, ni en la fracción particulada ni en la disuelta. Cabe recordar que para concentrar la vitamina B_{12} presente en el medio, se necesita un volumen mayor a 5 litros en muestras naturales, pero al tratarse de cultivos, se decidió trabajar con 2 litros, utilizando el tratamiento de *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas sin vitaminas para observar el crecimiento de las diatomeas en relación a la cantidad de vitamina aportada por la fracción bacteriana. Una vez en su fase exponencial (día 5^{to} de crecimiento) el cultivo fue filtrado separando la fracción de diatomeas por filtros de microfibra GF-D de 2.7 μm tamaño de poro y 45 mm diámetro (Whatman) y la fracción bacteriana por filtros de policarbonato de 0.4 μm de poro y 45 mm de diámetro, extrayendo y concentrando la vitamina B_{12} (ver metodología). La concentración de vitamina B_{12} en partículas (*T. pseudonana* y bacterias heterótrofas) se estimó en relación al volumen celular, número de células y la cantidad de vitamina B_{12} presente en la biomasa total.

5.2.2. Cuantificación de vitamina B_{12} con prueba de inmunoafinidad ELISA

Los resultados de la prueba de inmunoafinidad ELISA (Tabla 4) muestran que se obtuvo una concentración de 5×10^{-19} mol vit- B_{12} por célula para *T. pseudonana* y 2×10^{-19} mol vit- B_{12} por célula para la fracción bacteriana.

Tabla 4. Resultados prueba de inmunoafinidad ELISA, cantidades de vitamina B_{12} en cultivo *T. pseudonana* en interacción con B. heterótrofas sin vitaminas.

ELISA	células (ml)	mol vit- B_{12} cél ⁻¹	g vit- B_{12} cél ⁻¹
T.p.	2×10^6	5×10^{-19}	7×10^{-16}
B.h.	5×10^6	2×10^{-19}	3×10^{-16}

6. Discusión

Pese a la importancia que representa la productividad primaria de los ecosistemas marinos, los estudios de vitaminas en el océano especialmente del complejo B como la biotina (B_7) tiamina (B_1) y cobalamina (B_{12}) esenciales para el crecimiento del fitoplancton son escasos, desconociéndose las vías de adquisición, biodisponibilidad y los procesos ecológicos involucrados. Los bioensayos experimentales del presente trabajo representan eventos donde el fitoplancton auxótrofo recibe un aporte de vitaminas resultado de la interacción con las bacterias heterótrofas productoras. Al ser un estudio exploratorio, el desarrollo experimental presentó ventajas y desventajas. Una de las limitantes es la cuantificación de vitaminas en el océano debido a que las concentraciones se encuentran a nivel picomolar lo que implica trabajar con volúmenes de varios litros de agua por muestra para poder concentrarla a niveles detectables. Nosotros necesitábamos cuantificar las vitaminas y probar que existe una reserva intracelular en las bacterias productoras así como conocer la concentración disuelta en el medio disponible para el fitoplancton consumidor.

Durante mucho tiempo, la técnica de bioensayos fue el único estimador de vitamina en cultivos de microalgas (Swift y Taylor, 1974) en los cuales se utilizaban diferentes concentraciones para el rendimiento en el crecimiento del fitoplancton, calculando el número de células producidas por unidad de vitamina añadida (*ing. yield*). Los estudios de crecimiento algal hechos por Droop (1968, 1970) empleaban cobalto radioactivo (^{56}Co) en diatomeas, el cual se acopla covalentemente a la molécula de cobalamina como centro reactivo, cuantificando así la vitamina B_{12} marcada (B_{12}^*) intra y extracelularmente. Droop argumenta que el crecimiento de las diatomeas en sus ensayos se basa en la reserva de vitamina B_{12} intracelular, incluso más que en la concentración añadida disuelta en el medio. El método empleado por Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004) hace referencia a las concentraciones naturales de vitamina B_{12} en el océano utilizando pre-concentración con fase sólida, HPLC y detección por espectrofotómetro de masas. La pre-concentración por fase sólida como método selectivo permite concentrar la fracción de orgánicos disueltos como las

moléculas de polaridad similar a las vitaminas del grupo B, además de ser más accesible que el cobalto radioactivo. Nosotros nos apoyamos en ésta metodología para trabajar en nuestra hipótesis inicial de la lisis viral como liberador de vitaminas, de modo que necesitábamos cuantificar la vitamina B₁₂ disuelta en el medio antes y después de los eventos de lisis y la vitamina B₁₂ intracelular en las bacterias productoras. Sin embargo, el método de Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004) está diseñado para estimar la vitamina B₁₂ disuelta y no para cuantificar las concentraciones intracelulares en bacterias y el fitoplancton consumidor. Para éste objetivo, tomamos el método de extracción de vitamina B₁₂ intracelular descrito por Wyk y Britz (2010) aplicado a cultivos bacterianos del género *Propionibacterium freudenreichii* característicos de productos lácteos con el objetivo de detectar deficiencias nutricionales en alimentos del sur de África. Un factor clave de este estudio es el uso de buffer de cianuro de sodio (NaCN), para convertir las diferentes formas de cobalamina en cianocobalamina, su forma más estable. Cuantificar la vitamina B₁₂ intracelular es un tema poco explorado en investigaciones algales y hasta el momento no se ha realizado para sistemas acuáticos, ya que explorar las interacciones ecológicas entre bacterias productoras de vitaminas y la adquisición por el fitoplancton auxótrofo implica conocer la cuota celular presente en ambos tipos celulares.

De acuerdo a los resultados, no fue posible detectar señal de vitamina B₁₂ en la fracción intracelular y disuelta en ninguna de las pruebas. Las razones podrían deberse a posibles fallas metodológicas, debido a que nuestro HPLC es un instrumento de segunda mano. La presencia de ruido en las señales cromatográficas y la poca sensibilidad de detección a las bajas concentraciones de vitamina B₁₂ pudieron ser factores que enmascararon la señal. Por otra parte, el trabajo con muestras naturales costeras implica la presencia de materia orgánica, las moléculas orgánicas al igual que las vitaminas se absorben a los 362 nm en el detector del HPLC, que ocasiona una línea base ruidosa que dificulta la identificación de B₁₂. La disponibilidad de la vitamina B₁₂ disuelta en las muestras y cultivos podría además contar con la presencia de un “factor de unión” (*ing. binding factor*) (Droop, 1968, 1970, 1974; Swift y Taylor, 1974; Pintner y Almeyer, 1979; Sarhan *et al.*, 1980; Davies y Leftley, 1985; Wyk y Britz, 2010) reduciendo la concentración de vitamina disponible para los

organismos auxótrofos. Nosotros consideramos que esta glicoproteína, podría estar presente en las muestras naturales y cultivos, evitando la adsorción de vitamina B₁₂ en las partículas C₁₈ de la fase sólida y con esto limitando la señal al cuantificar las muestras. Para liberar la molécula de vitamina B₁₂ del posible *binding factor*, se aplicó temperatura a >100 °C por 15 - 20 minutos para la mitad de las muestras antes de su cuantificación (Wyk y Britz, 2010). Finalmente, en los resultados del HPLC no se observó diferencia entre las muestras tratadas con temperatura y sin ella. El tema del *binding factor* es ambiguo, ya que no conocemos cómo se produce ni qué lo libera. Se ha sugerido que es una estrategia de competencia entre el mismo fitoplancton, de modo que los organismos no auxótrofos encuentran mayor crecimiento liberando esta proteína para limitar el crecimiento para los que dependen de la vitamina B₁₂ y con esto aprovechar los nutrientes.

Al no tener resultados con la cuantificación analítica (HPLC) se optó por utilizar el método de inmunoensayo enzimático específico (ELISA). Este método fue aplicado por Zhe *et al.* (2011) para determinar vitamina B₁₂ en agua de mar y agua intersticial de sedimentos marinos. Los autores señalan que la especificidad del ELISA no puede obtenerse con la fase reversa C₁₈ del HPLC, ya que el agua de mar y sedimentos costeros son ricos en materia orgánica disuelta (DOM) lo que podría adsorberse a la carga de las partículas C₁₈ contenidas en la columna del HPLC, evitando la adsorción y concentración de B₁₂. El inmunoensayo ELISA nos permitió analizar la respuesta de uno de los bioensayos experimentales montados con *T. pseudonana* como diatomea auxótrofa de vitamina B₁₂ en interacción con bacterias heterótrofas en condiciones limitadas de vitamina B₁₂. Los resultados mostraron que en este cultivo, *T. pseudonana* y las bacterias heterótrofas arrojaron valores superiores de vitamina B₁₂ intracelular en relación a los encontrados en la fracción disuelta (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la prueba ELISA para fracción disuelta y particulada del cultivo *T. pseudonana* + bacterias heterótrofas, sin vitaminas.

Muestra	vol filtrado (ml)	vit- B ₁₂ (ng ml ⁻¹)	células (ml)	g vit-B ₁₂ cel ⁻¹	mol vit-B ₁₂ cel ⁻¹
<i>T. pseudonana</i>	940	95	2x10 ⁶	7x10 ⁻¹⁶	5x10 ⁻¹⁹
B. heterótrofas	920	88	5x10 ⁶	3x10 ⁻¹⁶	2x10 ⁻¹⁹
vitamina B ₁₂ disuelta	920	1.0	--	--	--

En primera instancia, sugerimos que las bajas concentraciones de vitamina B₁₂ disuelta podrían deberse al consumo de ambos grupos celulares. En una comparación con los trabajos previos de Swift y Taylor (1974) y Droop (1968, 1970, 2007) observamos que las concentraciones intracelulares de *T. pseudonana* en este trabajo contienen más vitamina B₁₂ que el fitoplancton axénico de estos trabajos (Tabla 6). Las concentraciones intracelulares de *T. pseudonana* se encontraron cuatro órdenes de magnitud mayor (5x10⁻¹⁹ mol vit-B₁₂ cel⁻¹) a las calculadas por Droop (1968) para la diatomea *Pavlova lutheri* con 3 x10⁻²³ y los valores arrojados por Swift y Taylor (1974) para *T. pseudonana* los cuales tienen valores de 5x10⁻²² en casi todos sus cultivos axénicos, calculados a partir de la biomasa total por gramo de vitamina B₁₂.

Tabla. 6. Comparación de concentraciones de vitaminas intracelulares en fitoplancton de previos trabajos y el nuestro. Las cantidades se reportan en mol de vitaminas B₁₂ por célula.

Autor(es)	Fitoplancton	mol vit-B ₁₂ cel ⁻¹
Swift&Taylor 1974	<i>T.pseudonana</i> *	6x10 ⁻²²
	<i>T.pseudonana</i> *	7x10 ⁻²²
	<i>P. lutheri</i> *	1x10 ⁻²¹
	<i>I. galbana</i> *	3x10 ⁻²¹
Droop 1970	<i>P. lutheri</i> *	2x10 ⁻²¹
Droop 1970	<i>P. lutheri</i> *	4x10 ⁻²⁰
Droop 2007	<i>T. pseudonana</i> *	
Este trabajo	<i>T. pseudonana</i> +b.h.	5x10 ⁻¹⁹

* Cultivos axénicos.

Es posible que gran parte de las bacterias productoras de vitamina B₁₂ presentes en nuestro cultivo se encontraran adheridas a la capa orgánica de *T. pseudonana* al momento de ser filtradas para su cuantificación. Las observaciones a microscopio muestran que *T. pseudonana* tiende a “aglutinarse” formando racimos de 5 a más diatomeas. Esto se debe a la excreción de polisacáridos por *T. pseudonana* que sirven de protección contra el ambiente e influyen en la obtención de nutrientes del medio, creando un efecto de “pegamento” celular (Passow, 2002; Kahl *et al.*, 2008). Dentro del espacio que rodea a *T. pseudonana*, se encontraron bacterias que suponemos estarían intercambiando vitaminas por los compuestos orgánicos extracelulares. En una primera estimación, si restamos la abundancia bacteriana total presente en este bioensayo y solo agregamos 2 bacterias por cada célula de *T. pseudonana*, considerando que en el conteo con microscopia se observa un promedio de 2-4 bacterias adheridas a la pared celular de *T. pseudonana* (Fig. 15) las concentraciones de vitamina B₁₂ disminuye de 5x10⁻¹⁹ a 7x10⁻²² por célula (Tabla 7) lo cual nos da valores similares a las concentraciones reportadas en el fitoplancton axénico de Droop 1970.

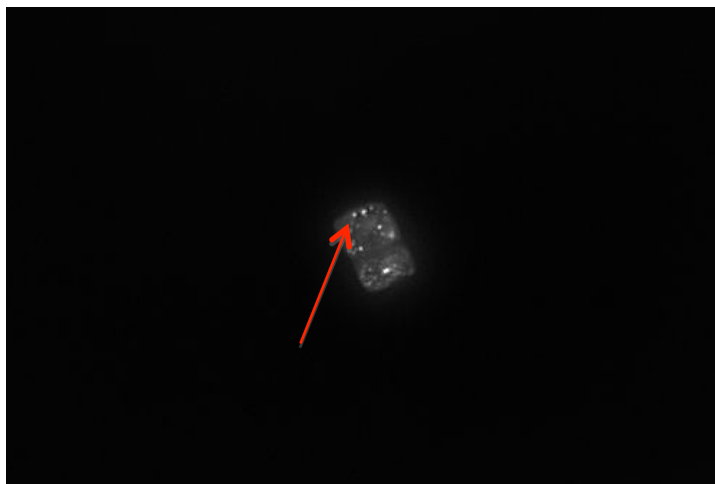


Figura 15. Bacterias que podrían estar adheridas a la pared celular de *T. pseudonana*, puntos más claros. Tinción DAPI, Emisión en canal azul a 445 nm, tinción de ADN excitado a 352 nm. Tamaño de *T. pseudonana* 5 μm . Objetivo 100 x.

Tabla 7. Vitamina intracelular en *T. pseudonana* considerando la adhesión de 2 células bacterianas productoras de vitamina B₁₂.

Fuente potencial de vitamina B ₁₂	Abundancia celular	mol vit-B ₁₂ cel ⁻¹
<i>T. pseudonana</i> + b.h. adheridas	2x10 ⁶	5x10 ⁻¹⁹
Bacterias heterótrofas filtradas	5x10 ⁶	2x10 ⁻¹⁹
<i>T. pseudonana</i> sin bacterias (estimada)	2x10 ⁶	5x10 ⁻²⁰ *

* Con 2 bacterias adheridas estimadas

Estos datos y las observaciones a microscopio sugieren que nuestros valores reportados de vitamina B₁₂ intracelular para *T. pseudonana* incluirían además vitamina B₁₂ contenida en las bacterias presentes de la matriz orgánica excretada. Habría que preguntarse si ¿Todas las bacterias presentes dentro de

esta matriz orgánica son productoras de vitamina B₁₂? y ¿Cuántas de estas bacterias se encuentran en asociación directa con la pared celular de *T. pseudonana*? De las observaciones a microscopio, aproximadamente 2 a 4 bacterias se encuentran en posible adhesión con la pared celular de *T. pseudonana*, aun cuando no se cuenta con los suficientes datos para reforzar esta relación, lo que nos lleva a pensar que podrían ser bacterias productoras de B₁₂ en simbiosis directa. El resto de bioensayos experimentales no fueron analizados con ELISA por limitación de tiempo, de modo que se analizaron de forma indirecta para observar el crecimiento de *T. pseudonana* en ausencia o presencia de vitaminas. Estudios anteriores de vitamina B₁₂ fueron evaluados con este método, tomando como referencia la biomasa total del fitoplancton en respuesta a las condiciones de vitaminas disueltas disponibles (Provasoli y Carlucci, 1974). Evaluar la formación de biomasa en la fase estacionaria es comúnmente aplicado para determinar las concentraciones de vitaminas en respuesta al consumo por el fitoplancton. En nuestro caso es diferente, ya que en la interacción de *T. pseudonana* con bacterias se espera que las bacterias presentes produzcan la vitamina B₁₂ a una tasa que soporte la tasa de crecimiento de las microalgas auxótrofas, aun cuando las concentraciones iniciales de vitaminas son escasas. El nutriente limitante depende de la estequiometría de nutrientes que controla la biomasa máxima, como lo es el hierro en determinadas zonas oceánicas (HNLC), y en éste caso las vitaminas. El principio del mínimo o nutriente limitante fue formulado por el químico alemán Von Liebig en el siglo 19 mejorando el crecimiento de plantas con el primer fertilizante a base de nitrógeno. Este concepto es comúnmente aplicado a los estudios de vitaminas donde se busca conocer el rendimiento en la biomasa de cultivos algales axénicos.

En nuestro caso, los bioensayos experimentales se diseñaron siguiendo el concepto de limitación de tasas metabólicas de Blackman (1905) en el cual se determinan las tasas máximas alcanzadas en los diferentes tratamientos, debido a que estos contienen bacterias y se espera que sean proveedoras de vitaminas para *T. pseudonana* a falta de un aporte en el medio. Los resultados mostraron que aquellos bioensayos en los que existe una interacción de *T. pseudonana* y bacterias heterótrofas sin la adición de vitaminas presentaron

tasas máximas de crecimiento específico ($\mu_{\max}$) similares que el bioensayo donde *T. pseudonana* es axénica y con vitaminas añadidas (Fig 16).

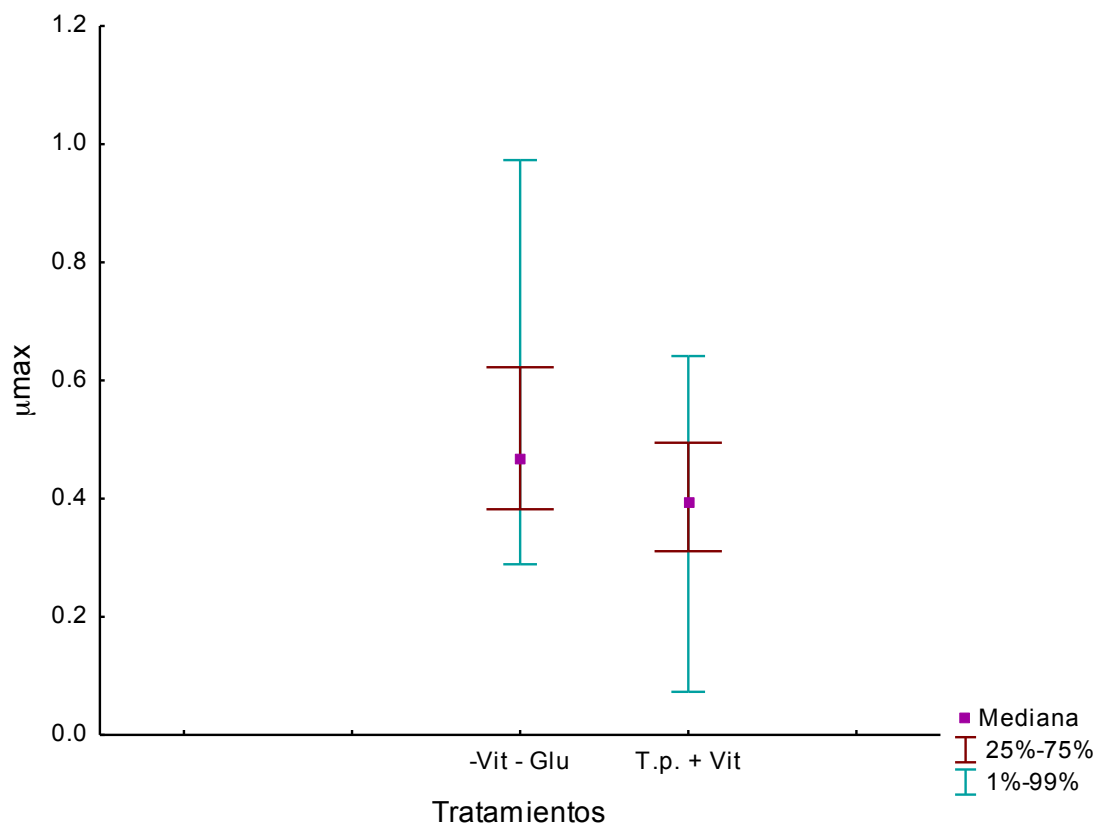


Figura 16. Comparación estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, $\mu_{\max}$ entre tratamientos *T. pseudonana* + b. heterótrofas sin vitaminas, sin glucosa vs *T. pseudonana* axénica con vitaminas. Barras verticales indican el intervalo de confianza y barras rojas el rango de datos que caen entre el 25 y 75%.

Ambos casos tuvieron una $\mu_{\max}$ de 0.5 día^{-1} . Por otra parte, el tratamiento de *T. pseudonana* que no contenía bacterias ni vitaminas se mantuvo en crecimiento tres cultivos, 26 días (Fig. 17) para posteriormente menguar su crecimiento hasta decaer.

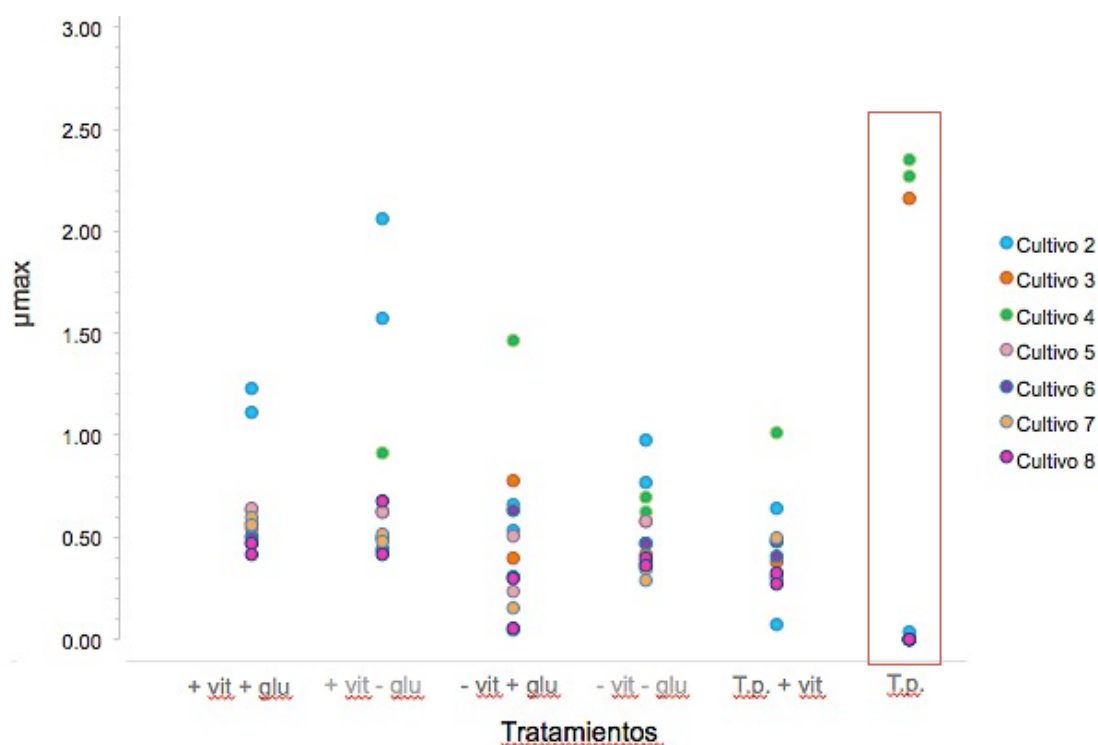


Figura 17. Comparación cualitativa de $\mu_{\max}$ para los diferentes tratamientos. El tratamiento de *T. pseudonana* axénica sin vitaminas (cuadro rojo) se mantuvo sólo tres cultivos para luego decaer. Los círculos de colores representan el crecimiento de los tratamientos en las secuencia de cultivos.

Lo anterior confirma lo expuesto inicialmente por Provasoli y Carlucci (1974), el fitoplancton auxótrofo no puede mantenerse sin vitaminas. ¿Por qué este tratamiento no cayó desde el primer inóculo sin vitaminas ni bacterias? Apoyados en Droop (1968, 1970) sugerimos que el crecimiento *T. pseudonana* se mantuvo sin el aporte de vitaminas ni bacterias gracias a una cuota interna de almacenaje. Para poder entender esto, hay que recordar que los tratamientos o bioensayos eran tratados con recambios cada 9-10 días (tiempo estimado de su fase exponencial tardía) con el objetivo de ir “lavando” la vitamina B₁₂ que pudiese encontrarse desde el primer inóculo, ya que el cultivo madre de *T. pseudonana* contenía 1.2 μ l de mezcla de vitaminas al 50% de concentración nominal en 10 ml de medio de cultivo. Los recambios consistían en tomar 1 ml del cultivo anterior para agregarse a 10 ml de nuevo medio sin vitaminas, pero con nutrientes inorgánicos (Si, N, P) y metales traza. Por lo tanto, las vitaminas disueltas y particuladas presentes en el cultivo primordial del cual se tomó el inóculo inicial para el tratamiento de *T. pseudonana* axénica sin vitaminas se diluyeron a 0.08 % en los 3 cultivos secuenciales. La “cuota

celular” propuesta por Droop (1968, 1970, 1974, 2007) indica que las concentraciones intracelulares de vitaminas varían dependiendo de las condiciones de crecimiento del fitoplancton, con altas tasas de crecimiento e incorporación a concentraciones mayores de vitaminas. Una vez incorporada, la vitamina intracelular podría ser aprovechada cuando las concentraciones exteriores son bajas, ayudando a mantener las siguientes generaciones en ausencia de vitaminas disponibles. Lo anterior puede interpretarse como una estrategia de sobrevivencia a condiciones variables de vitaminas en el medio (Bertrand *et al.*, 2007). Si esta cuota permite al fitoplancton mantener su crecimiento, se espera que las tasas de crecimiento en este tratamiento se debieran al consumo de las concentraciones de vitamina B₁₂ internos.

Hasta el momento los dos casos expuestos (*T. pseudonana* + bacterias heterótrofas sin vitaminas, sin glucosa y *T. pseudonana* axénica sin vitaminas) confirman parte de la hipótesis de Croft (2004), donde las bacterias heterótrofas estarían aportando vitaminas al fitoplancton consumidor mientras que éste aporta la suficiente materia orgánica para el crecimiento de las bacterias en una simbiosis. ¿Qué tipo de simbiosis? ¿Directa en contacto físico entre *T. pseudonana* y bacterias? ¿Indirecta en la liberación de orgánicos al medio? Se sugiere que los exudados orgánicos de *T. pseudonana* permiten un acercamiento de las bacterias productoras al fitoplancton consumidor. Entonces, ¿Se esperaría que a mayor cantidad de materia orgánica exista mayor producción de vitaminas? Una respuesta indirecta se obtuvo en uno de los tratamientos experimentales, en el cual se añadió glucosa, sin vitaminas. El aporte extra de glucosa, permitiría una abundancia bacteriana elevada y con esto, un mayor aporte de vitaminas como la B₁₂ que favorecería el crecimiento de las diatomeas. El resultado para este tratamiento, fue inverso a lo esperado, la adición de glucosa incrementó en tamaño las células bacterianas y la población de *T. pseudonana* comenzó a decaer. La dinámica de los microorganismos es compleja, es posible que al aumentar en biomasa bacteriana la demanda de nutrientes inorgánicos como nitrógeno o fósforo indujera la competencia con *T. pseudonana* reduciendo las concentraciones y limitando su crecimiento, o que las bacterias prefieran el consumo de glucosa al material polimérico exudado por las diatomeas. Por otra parte, debemos recordar que menos del 50% del consorcio bacteriano posee el metabolismo

para la producción de vitaminas (Helliwell *et al.*, 2011) y que no conocemos nada sobre la taxonomía bacteriana presente en nuestros tratamientos. Es posible que existiera un desplazamiento por competencia de nutrientes inorgánicos pero también por vitaminas, ya que, aproximadamente dos tercios de la población bacteriana adquieren también cobalamina extracelular (Rodionov *et al.*, 2003).

Los resultados de los bioensayos son una primera aproximación de la dinámica ecológica que existe entre productores y consumidores de vitaminas como la B₁₂. El diseño experimental de los bioensayos permitió analizar la interacción bacteria- fitoplancton en el aporte de vitamina B₁₂, las tasas de crecimiento y la relación de abundancia entre ambas especies, mostrando un claro crecimiento en las diatomeas que tuvieron interacción bacteriana. La presente línea de investigación tendría además como objetivos caracterizar la taxonomía de los grupos bacterianos presentes utilizando el método de marcaje de células *in situ* por hibridación con fluorocromos (*ingl.* FISH) y la inducción de lisis en las bacterias presentes para la liberación de vitamina B₁₂ intracelular. Por razones de tiempo estas pruebas no se llevaron a cabo, quedando abiertas líneas de investigación para dar continuidad y reforzar el concepto de posibles interacciones entre bacterias y fitoplancton en la dinámica de obtención de metabolitos esenciales como las vitaminas. La pregunta de cómo se llevan estas dinámicas en ambientes naturales sigue sin respuesta, pero realizamos una estimación aproximada de las cantidades de vitamina B₁₂ que podrían encontrarse en el fitoplancton y las bacterias de ambientes costeros como la bahía de Todos Santos, Ensenada, México. A falta de muestras naturales, se decidió utilizar el valor promedio de clorofila-a (Chl-a) de la zona 0.5 µg L⁻¹ (Baumgartner *et al.* 2008) (Fig 18) para estimar la biomasa fitoplanctónica y la cantidad aproximada de vitamina B₁₂ intracelular presente en el fitoplancton de esta zona costera.

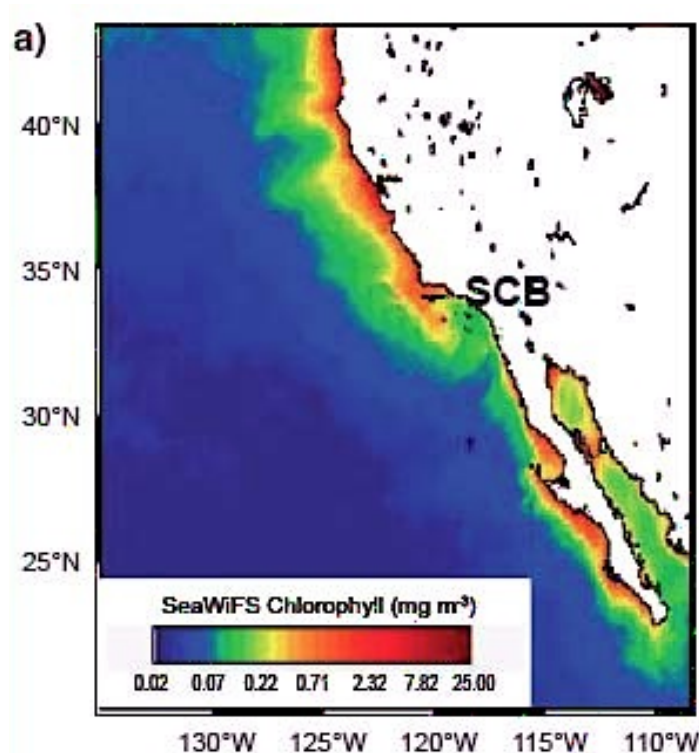


Figura 18. Promedio de seis años (1997-2003) de las concentraciones de clorofila (Chl-a) en la superficie de la Corriente de California (CC) de SeaWiFS para los meses de Junio- Agosto. Recuperado y modificado del reporte IMECOCAL, Baumgartner *et al.*, 2008, *Global ocean ecosystem dynamics*, 14(2), pp. 43-54

Para evaluar la dinámica de vitamina B₁₂ en aguas costeras, por una parte suponemos que las células de fitoplancton la bahía tienen el mismo volumen celular de la diatomea *T. pseudonana* (78 μm^3) y que las bacterias poseen un volumen de 0.51 μm^3 calculado del tamaño promedio de las bacterias oceánicas (0.8 μm) (Posch *et al.*, 1999). Utilizamos los valores de vitamina B₁₂ intracelular presente en las diatomeas y las bacterias de nuestros cultivos (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de volumen, tasa específica de crecimiento máxima (μ_{max}) y vitamina B₁₂ intracelular para: der. *T. pseudonana*, izq. bacterias heterótrofas del cultivo experimental sin vitaminas y sin glucosa.

Vol celular <i>T.pseudonana</i>	μ	B ₁₂	Vol celular <i>B.heterótrofa</i>	μ	B ₁₂
μm^3	dia^{-1}	$\text{g B}_{12} \text{ cel}^{-1}$	μm^3	dia^{-1}	$\text{g B}_{12} \text{ cel}^{-1}$
78	0.5	7×10^{-16}	0.51	0.5	3×10^{-16}

Basándonos en la publicación de Montagnes *et al.* (1994) para la estimación de cuota celular de clorofila, estimamos cuantas células de fitoplancton habría en un litro de agua costera de acuerdo a Montagnes *et al.* (1994)

$$y = ax^b \quad (4)$$

Donde $a = 0.00428$, $b = 0.917$ y x es el volumen celular, asumiendo que todas las células tienen el volumen celular de *T. pseudonana* ($78 \mu\text{m}^3$). Si todo el fitoplancton tiene el volumen de *T. pseudonana* con una concentración intracelular de $7 \times 10^{-16} \text{ g B}_{12} \text{ cel}^{-1}$ (sin considerar el cálculo de tabla 7) y estimando que solo la mitad del fitoplancton es auxótrofo, tendríamos una abundancia fitoplanctónica de $1 \times 10^6 \text{ células L}^{-1}$. Considerando una duplicación de células cada dos días ($\mu = 0.5 \text{ d}^{-1}$) la cantidad de vitamina B_{12} que estaría incorporando el fitoplancton por litro sería de $0.2 \text{ ng L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Tabla 9).

Tabla 9. Estimación de abundancia celular e incorporación de B_{12} con fitoplancton auxótrofo de volumen celular aproximado para aguas costeras. La abundancia celular se calculó en base a los $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Chl-a y el volumen celular de *T. pseudonana*.

Abundancia Chl-a (auxótrofo)	μ .	Incorporación B_{12} fitoplancton	B_{12} por célula
cel L^{-1}	día^{-1}	$\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	$\text{g B}_{12} \text{ cel}^{-1}$
1×10^6	0.5	2×10^{-10}	3×10^{-16}

Las concentraciones de vitamina B_{12} disuelta reportadas para zonas costeras de la corriente de California (Sañudo-Wilhelmy, 2006, 2012) se encuentran en valores cercanos a los 20 pM, lo que equivale a $0.03 \mu\text{g}$ por litro ¿De dónde viene esta vitamina B_{12} ? Realizamos una estimación similar con las posibles bacterias productoras de vitamina B_{12} . La abundancia bacteriana para ambientes costeros se encuentra en 1×10^9 células por litro (Azam y Mafatti 2007), del cual un aproximado del 50% son productoras de vitaminas, tendríamos entonces que 5×10^8 bacterias con una tasa de duplicación de 0.5 (μ) estarían produciendo $0.04 \mu\text{g}$ de vitamina B_{12} por litro al día (Tabla 10).

Tabla 10. Estimación de abundancia y producción bacteriana de vitamina B₁₂ para aguas costeras. B.h. hace referencia a Bacterias heterótrofas.

Abundancia B.h. productora vit-B ₁₂ (50%)	μ.	B ₁₂ disuelta costera	Producción B ₁₂ B.h.	B ₁₂ por célula
cel L ⁻¹	día ⁻¹	g L ⁻¹	g L día ⁻¹	g B ₁₂ cel ⁻¹
5x10 ⁸	0.5	3x10 ⁻⁰⁸	4x10 ⁻⁰⁸	6x10 ⁻¹⁶

La producción bacteriana estaría aportando la vitamina B₁₂ disuelta en el medio, en una estimación donde parece no haber limitante para la incorporación por el fitoplancton. Esta estimación no considera el tiempo de residencia de la B₁₂ en el agua o el posible aporte por liberación viral. Con dos órdenes de magnitud de diferencia, los valores reportados para la concentración de vitamina B₁₂ en aguas costeras (3x10⁻⁰⁸) indicarían que no hay limitación para el crecimiento del fitoplancton estimado, aun sin conocer las vías de adquisición de vitamina B₁₂ por el fitoplancton, ni el consumo de B₁₂ por bacterias. Debe cuidarse la interpretación de estas estimaciones. Los valores de abundancia usados son números a grosso modo, tanto para bacterias como para fitoplancton, este último, con un volumen hipotético de una especie modelo para la determinación de vitamina intracelular. En el océano, el fitoplancton auxótrofo de vitaminas incluye una variedad de especies y una fracción de dinoflagelados que superan el volumen de *T. pseudonana* con diferentes tasas de incorporación. Existe además un intercambio constante de nutrientes, de los cuales varios son producto de la regeneración por la actividad bacteriana, muerte celular y lisis. De modo que, lo que realmente está determinando la limitación de B₁₂ al fitoplancton es la cinética de producción y consumo. Esta cinética se vuelve difícil de analizar por varias razones que incluyen la producción y liberación de B₁₂, su disponibilidad en el medio acuático, el método de transporte de esta vitamina y la incorporación por el fitoplancton consumidor. Desconocemos además los mecanismos y las tasas de liberación de vitamina B₁₂ de las bacterias productoras bajo diversas condiciones fisiológicas, por ejemplo, la lisis viral y lo que sucede con esta vitamina liberada al medio. Su disponibilidad depende de factores como el mismo consumo bacteriano, el control de la composición taxonómica que determine la fracción de procariotas productoras y

las condiciones que controlan la liberación del *binding factor*. El fitoplancton auxótrofo podía adquirir la vitamina B₁₂ de forma directa por simbiosis con las bacterias productoras. Las moléculas hidrofóbicas como la B₁₂ pasarían por difusión en la ficosfera fitoplanctónica, ya sea porque la bacterias productoras se encuentren “adheridas” a la membrana celular o simplemente cercanas a la superficie. Es posible que las concentraciones reportadas para zonas costeras no se refieran sólo a la vitamina B₁₂ libre en el medio, quizá incluya parte de la vitamina B₁₂ presente en las bacterias, liberada por células al momento de procesar las muestras. La liberación de vitamina B₁₂ intracelular por muerte celular o lisis viral, representa en el océano un aporte constante de nutrientes como las vitaminas. Realizamos una estimación para calcular cuanta vitamina B₁₂ estaría siendo liberada por lisis viral en las bacterias productoras de nuestra estimación, como lo sugerido en la hipótesis inicial. Si consideramos las bacterias productoras, con una μ de 0.5 (día⁻¹) y el 25% de la población está siendo lisado por virus al día (Jiang y Paul, 1994; Guixa-Boixereu *et al.*, 1999), en un litro tendríamos una tasa de liberación de 8×10^{-9} g vit-B₁₂ L⁻¹ día⁻¹ (Tabla 11).

Tabla 11. Estimación aproximada de la liberación de vitamina B₁₂ por lisis viral en abundancia bacteriana para zonas costeras.

Abundancia B.h. productora vit-B ₁₂ (50%)	μ .	Producción B ₁₂ B.h.	Tasa de lisis	Liberación de B ₁₂ lisis
cel L ⁻¹	día ⁻¹	g L día ⁻¹	día ⁻¹	g B ₁₂ L día ⁻¹
5×10^8	0.5	4×10^{-08}	0.25	8×10^{-09}

La tasa de liberación resulta superior a los requerimientos de incorporación del fitoplancton, indicando que la lisis viral aportaría un porcentaje considerable de vitaminas al océano. En este caso, toda la B₁₂ producida tendría que estar biodisponible para el fitoplancton consumidor (sin biodegradación, fotodestrucción o secuestro por *binding factor*) y éste adquirirla de forma eficiente por alguna de las vías sugeridas: directa o indirecta. El equilibrio entre la producción y el consumo de vitaminas considera también la fagocitosis o pastoreo de las procariotas productoras por protozoas y zooplancton,

incorporando las vitaminas hacia niveles tróficos superiores. La incorporación de vitaminas como la B₁₂ ya sea de forma directa o indirecta por el fitoplancton, dependerá a su vez de las condiciones ambientales. Por ejemplo, el pastoreo podría ser predominante en verano, mientras que en otoño e invierno podrían predominar los eventos de lisis viral, lo que a su vez impulsaría la regeneración de otros nutrientes que marquen la pauta de la sucesión fitoplanctónica. Las demandas de incorporación de vitaminas varían además en tiempo, dependiendo del ciclo celular y el estado fisiológico del fitoplancton. La disponibilidad de vitaminas podría también influir en la sucesión de las comunidades fitoplanctónicas, encontrándose mayores a 5 µm (p. ej. dinoflagelados) cuando las vitaminas son abundantes y menores a 5 µm (como las diatomeas) cuando hay limitación (Gobler *et al.*, 2007).

La reserva intracelular de vitaminas en el fitoplancton podría funcionar como estrategia evolutiva para mantenerse en condiciones limitadas de nutrientes, lo que nos lleva al círculo dinámico, donde eventos como la lisis viral, son fuentes temporales de vitaminas que parecen incorporarse eficazmente. La asociación entre bacterias y fitoplancton data desde hace 200 millones de años a escalas de tiempo evolutivo, es probable que el fitoplancton haya perdido el gen para la producción de vitamina B₁₂ (METHe) debido a que resulta costoso para el mantenimiento energético. Por esta razón esta capacidad estaría confinándola a la fracción procariota, pero ¿Qué beneficios obtienen las bacterias con la producción de vitaminas? El estudio de vitaminas presenta aún retos en la investigación de las interacciones microbianas y su contribución al crecimiento fitoplanctónico en un sistema tan dinámico como es el océano. Las vitaminas, catalizadoras de reacciones enzimáticas, esenciales en los procesos metabólicos, son biológicamente producidas por grupos bacterianos por razones que aún no se explican del todo. Las técnicas de determinación taxonómica y observación por microscopia para determinar los tipos de bacterias presentes, así como las asociaciones evolutivas por metagenómica y otras herramientas moleculares para observar la selección y competencia entre los grupos bacterianos forman parte de futuras investigaciones de vitaminas en microambientes marinos. El grupo de investigación del laboratorio de ecología microbiana en CICESE, trabaja para determinar estas posibles asociaciones así como la producción de vitamina B₁₂ en cultivos bacterianos.

Conclusiones

- El fitoplancton auxótrofo necesita la presencia de bacterias productoras para su crecimiento cuando hay limitación de vitaminas en el medio.
- Bacterias productoras tienen una alta concentración intracelular de vitamina B₁₂, suficiente para el aporte en aguas costeras.
- El fitoplancton consumidor bajo condiciones de disponibilidad, posee una reserva intracelular de vitamina B₁₂ suficiente para mantener su crecimiento en condiciones limitadas de vitaminas, como ya había sido considerado por Droop (1968, 1974).
- La cinética de producción y consumo determina la limitación de B₁₂ por el fitoplancton auxótrofo. Esta cinética es difícil de analizar por diferentes razones: a) Desconocemos el proceso de liberación de B₁₂ por bacterias. b) Se estima una posible simbiosis entre fitoplancton y bacterias productoras de B₁₂. c) El posible secuestro de vitaminas por factores de unión. d) El consumo de B₁₂ por bacterias y e) La disponibilidad de cobalto para la síntesis.
- Extrapolando los datos fue posible observar que la lisis viral podría liberar gran parte de la vitamina B₁₂ disuelta para el consumo por el fitoplancton auxótrofo.

Referencias bibliográficas

- Allen, A. E., Dupont, C. L., Obornik, M., Horák, A., Nunes-Nesi, J. P., Zheng, H., Johnson, D. A., Hu Hanhua, Fernie, A. R., Bowler, C. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473(7346), 203–207. doi:10.1038/nature10074
- Amin, S. A., Parker, M. S., Armbrust, E. V. (2012). Interaction between Diatoms and Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 667-684.
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, C. J., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W. Y., Lane, W. T., Larimer, W. F., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Rynearson, A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P., Rokhsar, D. S. (2004). The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science*, 306(79), 79-85. doi: 10.1126/1101156.
- Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, 459, 185-192. doi:10.1038/nature08057
- Azam, F., Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Review Microbiology*, 5, 782-791. doi:10.1038/nrmicro1747
- Baumgartner, T., Durazo, R., Lavaniegos, B., Gaxiola, G., Gómez, J. y García, J. (2008). Ten years of change from IMECOCAL observations in the southern region of the California Current Ecosystem. *Global ocean ecosystem dynamics*, 14(2), 43-54.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall B. J., Koblizek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Döbler, W. (2005). *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 1089-1096. doi: 10.1099/ijs.0.63511-0
- Bertrand, E. M., Allen, A. E., Dupont, C. L., Norden-Krichmar, T. M., Bai, J., Valas, R. E. Saito, M. A. (2012). Influence of cobalamin scarcity on diatom molecular physiology and identification of a cobalamin acquisition protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 1762-1761. doi: 10.1073/pnas.1201731109
- Blain, S., Guieu, C., Claustre, H., Leblanc, K., Moutin, T., Quéguiner, B., Ras, J. and Sarthou, G. (2004). Availability of iron and major nutrients for phytoplankton

- in the northeast Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2095-2104.
- Blackman, F.F. (1905). Optimal and limiting factors. *Annals of Botany*, 19(2), 281-296.
- Carlucci, A. F., Silbernagel, S. B. (1969). Effect of vitamin concentration on growth and development of vitamin-requiring algae. *Journal of Phycology*, 5(1), 64-67.
- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 291-314. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.001451
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(3), 90-93, doi:10.1038/nature04056
- Croft, M. T., Warren, M. J., Smith, A. G. (2006). Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 175-1183.
- Davies, A. G. and Leftley, J. W. (1985). Vitamin B₁₂ binding by microalgal ectocrines: dissociation constant of the vitamin-binder complex determined using an ultrafiltration technique. *Marine ecology progress series*, 21, 267-273.
- Droop, M. R. (1968). Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis luterii*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(3), 689-733.
- Droop, M. R. (1970). Vitamin B₁₂ and marine ecology. V. Continuous culture as an approach to nutritional kinetics. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. 20(1), 629-636.
- Droop, M. R. (1974). The nutrient status of algal cells in continuous culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 54(4), 825-855.
- Droop, M. R. (2007). Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of Plankton Research*, 29(2), 107-113.
- Flujos de carbono (FLUCAR). Fuentes y sumideros de los márgenes del pacífico Mexicano. CICESE. Recuperado de: <http://www.flucar.cicese.mx>.
- González, M. S., Perales, V. H., Salcedo, A. M. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de algas y plantas. *Revista de educación Bioquímica*, 27(4), 119-129. Universidad Nacional Autónoma de México.

Giovannoni, S. J. (2012). Vitamins in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 13888-13889. doi/10.1073/pnas.1211722109.

Gobler, C. J., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G., Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2007). Effect of B-vitamins (B1, B12) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 49(2), 181-194. doi:10.3354/ame01132

Gröger, C., Sumper, M., Brunner, E. (2008). Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*: Solid-state ^{29}Si NMR and fluorescence microscopic studies. *Journal of Structural Biology*, 161(1), 55–63.

Gruber, K., Kratky C. (2001). Methylmalonyl CoA mutase. In: Messerschmidt, A., Huber R., Poulos T. and Wieghardt K. (ed.), *Handbook of Metalloproteins*. (pp. 995-1009). Chichester. Wiley.

Guixa-Boixereu, N., Lysnes, K. and Pedrós-Alió, C. (1999). Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1949-1958.

Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein R. E. and Smith A. G. (2011). Insights into the evolution of vitamin B₁₂ auxotrophy from sequenced algal genomes. *Molecular Biology Evolution*, 28(10), 2921-2933. doi:10.1093/molbev/msr124

Jacquet, S., Miki, T., Noble, R., Peduzzi, P. and Wilhelm, S. (2010). Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. *Advances in Oceanography and Limnology*, 1(1), 97-141. doi: 10.1080/19475721003743843

Jiang, C. and Paul, J. H. (1994). Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny / bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, 104, 163-172.

Kazamia, E., Czesnick H., Van Nguyen T. T., Croft T., Sherwood E., Sasso S., Hodson S. J., Warren, M. and Smith, A. (2012). Mutualistic interaction between vitamin B₁₂ dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology*, 10(4), 1-21. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02733

Kahl, A. L. Vardi, A., Schofield, O. (2008). Effects of phytoplankton physiology on export flux. *Marine Ecology Progress Series*, 354, 3-19. doi: 10.3354/meps07333

Ludwig, M.L., Drennan, C. L. and Matthews, R. (1996). The reactivity of B₁₂ cofactors, the proteins make a difference. *Structure*, 4(5), 505-512.

Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., Janh, D. (2002). Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 275-285. doi:10.1007/s00253-001-0902-7

Montagnes, J. S. and Berges, J. A. (1994). Estimation carbon, nitrogen, protein and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. 39(5), 1044-1066.

Noble, R. and Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbiology Ecology*, 14(2), 113-118. doi:10.3354/ame014113

Okbamichael, M., Sañudo-Wilhelmy, S.A. (2004). A new method for the determination of Vitamin B₁₂ in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 517(2), 33-38. doi:10.1016/j.aca.2004.05.020

Panzeca, C., Tovar-Sanchez, A., Agustí, S., Reche, I., Duarte, C. M., Taylor, G. T., Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2006). B vitamins as regulator of phytoplankton dynamics. *EOS, Transactions American Geophysical Union*, 87(52), 593-600. doi:10.1029/2006EO520001

Panzeca, C., Beck, A.J., Leblanc, K., Taylor, G.T., Hutchins, D.A., Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2008). Potential cobalt limitation of vitamin B₁₂ synthesis in the North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 22(2), 1-7. doi:10.1029/2007GB003124

Passow, U. (2002). Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 236, 1-12. doi:10.3354/meps236001

Patel, A., Noble R. T., Steele J. A., Schwalbach M. S., Hewson I. and Fuhrman J. A. (2007). Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nature Protocols*, 2(2)269-276. doi:10.1038/nprot.2007.6

Paul, H.J. and Weinbauer, M. (2010). Detection of lysogeny in marine environments. In: Wilhelm, W., Weinbauer M.G. and Suttle C.A. (eds.), *Manual of Aquatic Viral Ecology*. (pp.30-33). Association for the Sciences of Limnology and Oceanography. doi:10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7

Pintner, I. J. and Altmeyer, V. L. (1979). Vitamin B₁₂ binder and other algal inhibitors. *Journal of Phycology*, 15(4), 391-398. doi:10.1111/j.1529-8817.1979.tb00710.x

Porter, K. and Feig, Y. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 943-948.

doi:10.4319/lo.1980.25.5.0943

Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Nedoma, J., Sattler, B., Sonntag, B., and Psenner, R. (1999). Predator-induced changes of bacterial size structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquatic Microbial ecology*, 18(3), 235-246.

Provasoli, L. (1963). Organic regulation of phytoplankton fertility. In: Hill M.N. (ed.) *The sea*, 2 (pp. 165-173). Hoboken, N.Y, Wiley-Interscience.

Provasoli, L. and Carlucci A.F. (1974). Vitamins and growth regulators. In: Stuart W.D.P. (ed.) *Algal Physiology and Biochemistry*, 10 (pp. 741-787). N.Y, Wiley-Interscience.

Rodionov, D.A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., Gelfand, M.S. (2003). Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41148-41159.

Sañudo-Wilhelmy S.A., Cutter L., Durazo R., Smail E.A., Gómez-Consarnau L., Webb E.A., Prokopenko M.G., Berelson W.M. y Karl D.M. (2012). Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 109, 14041-14045.

Sarhan, F., Houde M., Cheneval, J.P. (1980). The role of vitamin B₁₂ binding in the uptake of the vitamin by *Euglena gracilis*. *Journal in protozoology*, 27(2), 235-238.

Shibata, A., Y. Goto, H. Saito, T. Kikuchi, T. Toda, and S. Taguchi. (2006). Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy. *Aquatic Microbiology Ecology*, 43, 223-231.

Suttle, C.A. (2007). Marine viruses, major players in the global ecosystem. *Nature Review Microbiology*, 5, 801–812. doi:10.1038/nrmicro1750

Suttle, C. A., Fuhrman J. A. (2010). Enumeration of virus particles in aquatic or sediments samples by epifluorescence microscopy. In: Wilhelm, W., Weinbauer M.G. and Suttle C.A. (eds.), *Manual of Aquatic Viral Ecology* (pp.145-153). Association for the Sciences of Limnology and Oceanography.

Swift, D.G. and Taylor W.R. (1974). Growth of vitamin B₁₂ - limited cultures: *Thalassiosira pseudonana*, *Monochrysis lutheri*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Phycology*, 10(4), 385-391. doi: 10.1111/j.1529-8817.1974.tb02730.

Thingstad, T.F., Heldal M., Bratbak, G., and Dundas, I. (1993). Are viruses important partners in pelagic food webs?, *Trends in Ecology Evolution* 8(6) 209–213.

Tomasz, M., Palom, Y. (1997). The Mitomycin Bio-reductive Antitumor Agents: Cross-linking and Alkylation of ADN as the Molecular Basis of Their Activity. *Pharmacology and Therapeutics*, 76(1-3), 73-87.

Wagner-Döbler I., Ballhausen B., Berger M., Brinkhoff T., Buchholz I., Bunk B., Cypionka H., Daniel R., Drepper T., Gerdt G., Hahnke S., Han C., Janh D., Kalhoefer D., Kiss H., Hans-Peter K., Kyrpides N., Liebl W., Liesegang H., Meincke L., Pati A., Petersen J., Piekarski T., Pommerenke C., Pradella S., Pukall R., Rabus R., Stackebrandt, E., Thole S., Thompson, L., Tielen, P., Tomasch, J., Von Jan M., Wanphrut N., Wichels, A., Zech H y Simon, M. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *The International Society for Microbial Ecology*, 4, 61-77.doi:10.1038/ismej.2009.94

Warren, M.J., Raux, E., Schubert, H.L., Escalante-Semerena, J.C. (2002). The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Natural Products Report*, 19(4), 390-412.

Watanabe, F. (2007). Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), 1266-1274. doi: 10.3181/0703-MR-67

Weinbauer, M.G. and Suttle, C. (1999). Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, 18(3), 217-225. Doi:10.3354/ame018217

Wood, A.M., Everroad R.G., Wingard L.M. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In: Andersen A. Robert. (ed.), *Algal culturing techniques*. (p. 269-297). Elsevier/Academic press.

Wyk, J.V., Britz, T.J. (2010). A rapid HPLC method for the extraction and quantification of vitamin B₁₂ in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichii*. *Dairy Science Technology*, 90, 509–520. doi: 10.1051/dst/2009055

Zhu, Q., R. C. Aller, and A. Kaushik. (2011). Analysis of vitamin B₁₂ in seawater and marine sediment porewater using ELISA. *Limnology and Oceanography Methods*, 9, 515-523. doi: 10.4319/lom.2011.9.515

Zwietering, M.H., Jongenbuerguer, I., Rombouts F.M. and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 5(6), 1875-188.

Anexos

1. Preparación del medio y cultivos algales.

1.1 Cultivos axénicos de *Thalassiosira pseudonana*.

Para obtener un cultivo axénico de *T. pseudonana*, los cultivos fueron tratados con una mezcla de antibióticos (Penicilina $\sim 5000 \text{ U ml}^{-1}$, Neomicina 10 mg ml^{-1} , Estreptomicina 5 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.3 mg por cada 10 ml de cultivo de *T. pseudonana* con la siguiente metodología:

1. 25 ml de cultivo de T.p. es centrifugado tres veces a 2000 rpm por 10 min y posteriormente re-suspendido en medio, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de bacterias y materia orgánica presente.
2. Una vez enjuagadas las diatomeas, el extracto se agrega en 10 ml de medio L1 al 10% de su concentración nominal.
3. La mezcla de antibióticos se agrega a 3 diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.3 ml en 10 ml de medio L1 al 10% de su concentración nominal), dando un total de 6 tubos con su réplica.
4. Los antibióticos se dejan actuar de 24 a 48 horas, incubados a 20°C en condiciones de 12/12 (luz/oscuridad).
5. Se enjuagan centrifugando tres veces y se re-suspenden en 10 ml de medio L1 al 10%.
6. Los cultivos se analizan con tinción DAPI y fluorescencia para verificar el estado fisiológico de las diatomeas, la presencia de bacterias y a su vez seleccionar la concentración óptima de antibióticos.

A las 72 horas de tratamiento, 1 ml de cada tratamiento se transfirió a 10 ml de nuevo medio L1 al 10% de su concentración nominal. Simultáneamente se tomó una muestra de cada tratamiento para ser observada por epifluorescencia, utilizando el colorante DAPI. A los 8 días de incubación, se tomó nueva muestra de los tratamientos no transferidos y de las nuevas diluciones, las cuales tenían 5 días de incubadas. Se realizó un análisis de imágenes obtenidas de la tinción DAPI de *T. pseudonana* (Figura 1).



Figura A1. *T. pseudonana* a las 72 horas de tratamiento. A las 72 horas aún presentaba escasa cantidad de bacterias disueltas. Imagen con fluorocromo en DAPI. Se puede observar las bacterias que aún permanecen adheridas a la diatomea. Tamaño de cada imagen 63 μm x 85 μm . 100x, tinción DAPI, dicróico canal azul (420 nm) excitado a ultravioleta 365 nm. Cultivo de *T. pseudonana* primordial.

Es posible que las bacterias presentes en la pared celular de *T. pseudonana* sean resistentes a los antibióticos al estar embebidas en la materia orgánica de la pared celular de la diatomea, la cual protege y sirve de alimento, o podrían estar muertas, adheridas en la matriz extracelular orgánica de *T. pseudonana*. Después de 8 días de incubación, el tratamiento ya no presentaba la adhesión de bacterias en la superficie de *T. pseudonana* (Fig. 2).

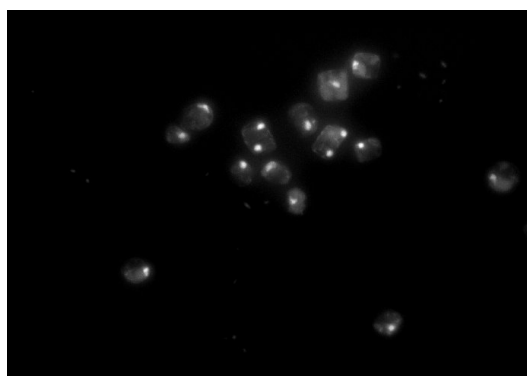


Figura A2. *T. pseudonana* con tratamiento de 8 días de incubación. La gran mayoría de las células se muestran libres de bacterias adheridas. Tinción DAPI, dicróico canal azul (420 nm) excitado a ultravioleta 365 nm. 100x. Tamaño de la imagen 63 μm x 85 μm .

1.2 Protocolo de preparación de agua de mar para medio de cultivo por tratamiento de carbón activado, ozonificación y autoclave. Laboratorio de microbios marinos (MICMAR) CICESE.

- La muestra de agua de mar es filtrada con GFF (1.0 μm luz de por y 45 mm diámetro), dejándose envejecer en garrafones de vidrio (de preferencia) o de plástico.
- Lavar los garrafones a utilizar con HCL al 10%.
- Enjuagar con H_2O destilada por 3 veces.
- Agregar 15 ml de carbón activado para un garrafón de 20 Lts.
- Burbujear por 30 min.
- Filtrar el carbón activado pasando el agua a otro garrafón limpio por GFF 1.0 μm luz de poro y 47mm diámetro. Posteriormente por filtro de membrana de 0.4 μm luz de poro y 47mm diámetro.
- Ozonificar a bajas velocidades para permitir que se desplace el O_2 por O_3 . Dejar el O_2 por más de 12 hrs.
- Burbujear 30 minutos con aire.
- Agregar 10 ml de agua de mar sin filtrar como inóculo de bacterias y que éstas utilicen la materia orgánica disuelta.
- Envejecer el agua en garrafón de vidrio con agua tratada una semana o más en condiciones de oscuridad.
- Filtrar agua por GFF 1.0 μm luz de poro y 47 mm diámetro.
- Agregar 10 gramos de carbón activado.
- Filtrar por filtro GFF 1.0 μm luz de poro y 47 mm diámetro y posterior por filtro de membrana de 0.4 μm poro, 47 mm diámetro.

El agua lista se esteriliza en autoclave y se coloca en equilibrio con el aire para estabilizar el pH.

1.3 Composición del medio de cultivo L1 de Guillard y Hargreaves (1993).

Componentes	Solución madre (<i>ingl. stock</i>)	Cantidad	Concentración Molar final
NaNO ₃	75.00 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 ml	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5.00 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 ml	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	30.00 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 ml	1.06 x 10 ⁻⁴ M

2. Resultados de las pruebas de HPLC. Tablas.

Resumen de resultados para la cuantificación de vitaminas con el HPLC en muestras costeras y cultivos. En la Tabla 1 se detallan las pruebas para la cuantificación de vitamina B₁₂ disuelta, empleando la pre-concentración por fase sólida y la concentración con temperatura. En la Tabla 2 se detallan las pruebas para la cuantificación de vitamina B₁₂ intracelular, con extracción por buffer de cianuro de sodio (NaCN) y con agua Milli Q.

Tabla A1. Resultados de la cuantificación de vitamina B₁₂ en la fracción disuelta de cultivos y muestras naturales.

Pruebas cuantificación vitamina B12 Fecha	Muestra	Volumen Filtrado (mL)	Volumen Fase sólida (mL)	Volumen Concentrado calor (mL)	Volumen Inyectado HPLC (mL)	Resultados
120920	Costera	4000	12	2	0.05	Pico de detección no corresponde a B12. No había B12 en muestra.
120924	Cultivo Bacterias mar	2000	12	2	0.05	Cultivo de agua de mar con una densidad celular de 2.27×10^7 cel ml ⁻¹ . Ninguna señal correspondía con el pico del estándar interno de B12. No se encontró vitamina B12 en el cultivo.
120927	Cultivo Bacterias mar con Glucosa	2000	4.8	2	0.05	Mucho ruido en señal de cromatogramas. Posiblemente el pico de vit-B12 quedó enmascarado.
121008	Vit-B12 estándar 0.033g L ⁻¹	-	-	-	0.05	El pico de vitamina es mayor cuando el estándar se encuentra diluido en agua de mar y menor cuando se encuentra diluido en MeOH.
121009	Cultivo viejo de L. poliedrum + estándar B12	1000	4	2	0.05	No se encontró ningún pico de B ₁₂ en el extracto de L. poliedrum. Solo apareció pico cuando este era acompañado con estándar.
121010	Cultivo viejo de L. poliedrum para probar Binding-Factor	1000	4	2	0.05	La muestra se dividió en dos, una se calentó a 100°C, la otra no se calentó. De existir binding factor, el calor libera la vit-B12. No se registró señal de vit-B12 en las dos muestras.
121018	Cultivo Monochrysis lutheri	850	4	2	0.05	La muestra se dividió en dos, una se calentó en autoclave 121°C, la otra no se calentó. De existir binding factor, el calor libera la B12. No se registró señal de vit-B12.
121018	Estándares B12 para el límite de detección del HPLC.	-	-	-	0.05	Estándares de vitamina B ₁₂ con las concentraciones de 0.033 gL ⁻¹ , 0.0033 gL ⁻¹ , 0.00165 g L ⁻¹ , 0.000825 g L ⁻¹ , 0.0004125 g L ⁻¹ , 0.0002063 g L ⁻¹ .
121029	Agua costera salada FLUCAR, 60 m	5000	12	2.5	0.05	La muestra de agua se dividió en dos partes, una parte fue tratada con calor (búsqueda de binding factor) y otra parte sin calor. No hubo señal de vitamina B12.
121029	Cultivos <i>Dinoroseobacter shibae</i> con Glucosa y con Levadura	4000	12	2.5	0.05	Se observaron algunos picos en ambos cultivos (con levadura, y con glucosa) sin embargo cuando se compararon con estándares internos no se encontró ningún pico que indicara la presencia de B ₁₂ .

Tabla A2. Resultados de la cuantificación de vitamina B₁₂ en la fracción particulada de cultivos de diatomeas, dinoflagelados y bacterias, así como de muestras naturales.

Pruebas vitamina B12 particulada Fecha	Muestra	Volumen Filtrado (mL)	Buffer NaCN	Buffer H2O Milli Q.	Tratamiento con Temperatura (°C)	Vol. Eluido Fase sólida (mL)	Volumen Concentrado a 65°C (mL)	Volumen Inyectado (mL)	Resultados
120918	Costera	3750	si	no	100	3.2	1.5	0.05	No se observó señal de vit-B12 en estas pruebas.
120920	Costera	4000	si	no	100	4.5	2	0.05	Se observó un pico en las muestras de agua de mar pero el pico no correspondía al de vit-B12.
120924	Cultivo Bacterias mar	2000	si	no	100	3.5		0.05	No se encontró señal de vit.B12.
120927	Cultivo Bacterias mar con Glucosa	2000	si	no	100	4.8	2	0.05	Ruido en señal de cromatogramas y posiblemente el pico de vit-B12 quedó enmascarado. No se encontró señal de vit. B12.
121029	Cultivo Dinoroseobacter shibae con Levadura	4000	si	si	100	4	1.3-1.5	0.05	Las gráficas muestran que no hay señal de vit-B12. La señal más cercana se presenta en NaCN sin Calentar.
121029	Cultivo Dinoroseobacter shibae con Glucosa	4000	si	si	100	4	2	0.06	No se observó señal de vit-B12 en estas pruebas.

Problemas metodológicos con el equipo de HPLC.

- *Presencia de ruido en señales cromatográficas.*

Se adaptaron dispositivos externos para regular la presión en la columna cromatográfica, temperatura y mezcla de solventes. Las pruebas realizadas con cobalamina (Sigma Aldrich) mostraron una señal a los 362 nm como se esperaba, sin embargo, el ruido en el cromatograma no fue erradicado del todo, siendo un factor a considerar. Nosotros esperamos bajas concentraciones de vitamina B₁₂ en las muestras naturales (<20 pM) por lo que la presencia de ruido podría enmascarar cualquier posible señal. Otro factor en la presencia de ruido fue la mezcla de los solventes. La mezcla de solventes utilizados para la fase móvil del HPLC, redujo el coeficiente de solubilidad creando sobresaturación y produciendo burbujas que afectaron principalmente el flujo por la columna C₁₈, aumentando la presión. Los cambios en la presión repercuten directamente en la señal del cromatograma. Para evitar la presencia de burbujas se aplicó degasificación de los solventes utilizando sonicación, nitrógeno y vacío, además de adaptarse una válvula mezcladora para homogenizar el paso de los solventes por el equipo, consiguiendo minorizar pero no eliminar el ruido.

- *Poca sensibilidad de detección del HPLC.*

La vitamina B₁₂ pudo haberse perdido en el proceso de pre-concentración por fase sólida. En las muestras de agua costera, la ausencia de señal podría explicarse biológicamente como una demanda de consumo por el fitoplancton y bacterias dependientes, limitando las concentraciones de vitamina B₁₂ disuelta, así como cuestiones físicas como la posible ausencia de cobalto disuelto que limite la síntesis de B₁₂ (Panzeca et al, 2008), la profundidad ya que dependiendo de la zona, se estima que las mayores concentraciones de vitamina B₁₂ se encuentren entre los 100 y 300 m de profundidad asociados al origen de las masas de agua (Sañudo-Wilhelmy et al, 2012) y todas nuestras muestras son superficiales, de 3-5 m, una zona de alta demanda fitoplanctónica de vitaminas. En todos los cultivos utilizados, de diatomeas *Monochrysis lutheri*, el dinoflagelado *Lingulodinium poliedrum* y las alfa proteobacterias *Dinoroseobacter shibae* donde se esperaban mayores concentraciones de

vitamina B₁₂ que en las muestras naturales tampoco se obtuvo señal, ni en la fracción disuelta aplicando el método de concentración de Okbamichael y Sañudo-Wilhelmy (2004) ni en la particulada extrayendo la vitamina B₁₂ de fitoplancton y bacterias de Wyk y Britz (2010). No hubo resultados en el HPLC.

3. Protocolo para la Inducción de lisis viral en procariotas utilizando Mitomicina-C. Laboratorio de Microbios Marinos (MICMAR) CICESE.

En el campo de la microbiología, el uso de fármacos como la Mitomicina- C (MTC) son empleados para inducir eventos de lisis en procariotas, motivo por el cual ésta técnica es también una herramienta para investigaciones del medio marino. La lisis viral en procariotas origina eventos entre los que se encuentran la liberación de nuevas entidades virales, la modificación en la abundancia de grupos taxonómicos de procariotas y la posible liberación de vitamina B₁₂. El mecanismo de acción de MTC es la formación de “cross-link” en hebras complementarias del ADN mediante una alquilación monofuncional, es decir, la unión de la molécula del fármaco a una sola hebra de ADN, inhibiendo la replicación (Tomaz y Palom, 1997). Todas las células bacterianas contienen virus específicos (fagos) los cuales pueden encontrarse en condiciones de lisogenia celular en el cual, un fago fija una asociación con un procariota huésped para posteriormente integrar su genoma en el genoma procariota, convirtiéndose en “profago”. El estado lisogénico puede continuar por muchas generaciones hasta que el profago es activado o inducido por agentes mutagénicos como la radiación U.V. o MTC, provocando una lisis del hospedero (Paul y Weinbauer, 2010). El objetivo de utilizar MTC en bacterias productoras de vitaminas es evaluar el efecto de Mitomicina-C en la concentración de vitamina B₁₂ y la abundancia de partículas virales, apoyados del uso de microscopia de epifluorescencia para cuantificar los cambios en las comunidades taxonómicas de procariotas (Patel *et al.*, 2007).

- *Filtrado de partículas fitoplanctónicas*

La muestra de mar colectada pasa por una malla de 8 micras, la cual ayuda a eliminar gran parte de Fitoplancton y detritus. La muestra se divide en tubos con el volumen de interés. Se agregan $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Mitomicina-C (stock de 1mg ml^{-1}) por cada 10 ml de muestra. Las muestras con Mitomicina-C se dejan actuar a diferentes tiempos de incubación en condiciones de oscuridad. Tomado el tiempo, se centrifuga a $7,500 \times g$ por 10 minutos. La fracción celular obtenida es entonces re-suspendida en agua de mar libre de virus. Posteriormente, los tratamientos con mitomicina son incubados por >24 hrs a temperatura ambiente, fijándose con formaldehído ($\text{H}_2\text{C}=\text{O}$) al 37 % para obtener una concentración final del 1% en sus respectivos tiempos de análisis.

El filtrado se realiza en una torre a una presión de vacío de 7 kPa para la fracción viral y procariota. La fracción líquida de la muestra será utilizada para cuantificar la concentración de vitamina B_{12} antes y después de la adición de Mitomocina C mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o ELISA.