

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Evaluación del método de reducción del cloruro de
yodonitrotetrazolio (INT) a formazán para estimar la
respiración de bacterias en comunidades marinas**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Manet Estefanía Peña Salinas

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Manet Estefanía Peña Salinas

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Director de tesis

Dr. Ernesto García Mendoza

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Ramón Cajal Medrano



Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Coordinadora del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Manet Estefanía Peña Salinas © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Manet Estefanía Peña Salinas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Evaluación del método de reducción del cloruro de yodonitrotetrazolio (INT) a formazán para estimar la respiración de bacterias en comunidades marinas

Resumen aprobado por:

Dr. Helmut Maske Rubach
Director de tesis

Los microbios marinos son el grupo de organismos más abundantes en nuestro planeta y se estima que la respiración microbiana en los ecosistemas marinos corresponde aproximadamente a la mitad de la respiración de la comunidad planctónica. La cuantificación de la respiración procariota es técnicamente difícil por las bajas tasas volumétricas y existen pocos datos sobre este proceso en el océano abierto; el método convencional consiste en el monitoreo del consumo de oxígeno en muestras bacterianas durante varios días. El tiempo largo de incubación promueve el cambio en la estructura de la comunidad microbiana y además el cambio mínimo en la concentración de O_2 implica una baja señal sobre el ruido en las mediciones de las tasas de respiración en el océano. En este trabajo se presenta la evaluación del método ETS_{vivo} (sistema de transporte de electrones por sus siglas en inglés) como aproximación a la cuantificación de la respiración procariota del ecosistema marino; el método corresponde al análisis de la actividad enzimática de las células que interviene en el mecanismo de transporte de electrones asociado a la pared celular de los procariotas, sitio en donde se utiliza al oxígeno como aceptor final de electrones y ocurre una consecuente producción de energía. Las pruebas experimentales se realizaron con muestras de una comunidad de plancton colectadas en el pacífico mexicano a diferente profundidad y disponibilidad de oxígeno, las cuales fueron incubadas con el cloruro de yodonitrotetrazolio (INT) y se cuantificó su reducción con la producción de formazán [F , $\mu\text{mol L}^{-1}$] por medio de la medición de absorbancia con un espectrofotómetro y un sistema de fibra óptica Ocean Optics. Se encontraron aspectos técnicos y factores ambientales que intervienen en la aplicabilidad del método *in situ* para estimar las tasas de respiración [R , $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$]. Se redujo la fuente de los blancos altos que disminuían la intensidad de la señal de formazán en muestras oceánicas y en cultivos de procariontes mediante el aumento de la concentración de formol de 2 a 4%. Se determinó la forma espectral y el coeficiente de absorptividad molar del formazán para el espectrofotómetro y para el sistema de fibra óptica Ocean Optics para la interpretación de la señal de formazán a 485 nm. Se optimizó el protocolo en términos de realizar la filtración pre-incubación de los procariontes antes de someter las muestras con INT, reemplazar el filtro de policarbonato de 0.2 μm por filtro de membrana y no realizar la extracción de formazán mediante el agitador de tipo vórtex o *Beadbeater* para evitar la sobreestimación de la señal por las partículas suspendidas. Sin embargo, a pesar de las diferentes mejoras no se encontró una buena relación entre F y R en muestras naturales de plancton.

Palabras clave: Procariontes marinos, respiración, reducción INT, formazán

Abstract of the thesis presented by **Manet Estefanía Peña Salinas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

Evaluation of the method of reduction of iodonitrotetrazolium chloride (INT) to formazan to estimate the respiration of bacteria in marine communities

Abstract approved by:

Dr. Helmut Maske Rubach
Thesis Director

Marine microbes are the group of organisms most abundant on our planet and it is estimated that microbial respiration in marine ecosystems corresponds to approximately half of the planktonic community respiration. The quantification of prokaryotic respiration is technically difficult due to the low volumetric rates and because there is little data about this process in the open ocean; the conventional method consists in monitoring oxygen consumption in bacterial samples for several days. The long incubation time promotes a change in the microbial community structure and the minimal change in O₂ concentration implies a low signal to noise in the measurements of the respiration rates in the ocean. Here we evaluate the ETS_{vivo} (electron transport system) method as an approximation of the prokaryotic respiration in marine samples. The ETS_{vivo} method is based on the analysis of the enzymatic activity of respiratory electron transport located in the cell wall of prokaryotes where the oxygen is used as a final electron acceptor. The experimental tests were carried out with plankton samples collected in the Mexican Pacific at different depth; the samples were incubated with INT and the formazan [F , $\mu\text{mol L}^{-1}$] production was quantified by absorbance measured with a spectrophotometer and an Ocean Optics fiber optic system. We found problems with the applicability of the method to estimate respiration rates [R , $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$], and we tried to improve the method. The source of high blanks that decreased the intensity of formazan signal in oceanic samples and in prokaryote cultures was reduced by increasing the formalin concentration from 2 to 4%. The spectral form and the molar absorptivity coefficient of formazan for the spectrophotometer and for the Ocean Optics fiber optic system were determined to minimize the future use of standards. The interpretation of the simple formazan spectrum was improved by baseline correction. The protocol was optimized in terms of the pre-incubation size filtration of prokaryotes before incubating the samples with INT, replacing the 0.2 μm polycarbonate filter with membrane filter and performing the formazan extraction by the vortex type stirrer instead of the Beadbeater to avoid overestimation of the signal by the suspended particles. Still, after these different improvements we found no good relationship between F and R in natural plankton samples.

Keywords: Marine prokaryotes, respiration, INT reduction, formazan

Dedicatoria

A mis padres **Fede** y **Caro**

A mi hermano **Yair**

A **Mamaús** y **Papaús**

Con mucho cariño por su paciencia, amor
y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por brindarme la oportunidad de integrarme a su comunidad científica y por hacer de ésta una estancia verdaderamente placentera. Al CONACYT por otorgarme una beca para la realización de este posgrado y permitirme continuar con mi preparación académica.

A mi director de tesis Dr. Helmut Maske por todas sus enseñanzas, por el tiempo dedicado y por compartir conmigo su gusto por la ciencia. A mis sinodales Dr. Ramón Cajal, Dr. Ernesto García y Dr. Eugenio Méndez por sus atinados comentarios, por el enriquecimiento de este trabajo y por el apoyo recibido durante el transcurso de este proyecto.

A todos los integrantes del Laboratorio de Microbios Marinos porque su ayuda fue fundamental para la elaboración de esta tesis. Gracias a César, Cristian, Josué, Ricardo, Ernesto, Marycarmen, Karina, Eisenia, Norma, Adolfo y Paola por haber sido un gran equipo de trabajo.

A los *VIPS*: Anahí, Laura, Miguel, Moni y Lubi por ser el mejor y más grande regalo que me ha dado Ensenada. Gracias por todo el apoyo, la confianza, la inigualable amistad, las incontables horas de risa y diversión y por todas las experiencias que hemos vivido juntos. Gracias por ser mi bonita familia disfuncional ensenadense.

A Julia, Nayeli, Anny y Lore por la maravillosa amistad que hemos cultivado y por la bonita época que nos tocó compartir juntas. Gracias también por haber sido el mejor y más divertido grupo de estudio y apoyo para la realización de nuestras tesis; esas tardes de café y trabajo nunca serán olvidadas.

A mis amigas de la maestría Abby, Karina, Zuri y Marianne por el gran compañerismo y por la solidaridad mostrada en este camino para convertirnos en ecólogas marinas. A mis buenos amigos Aldo, Gonzalo y Rodri por su carisma y por los buenos momentos que hemos compartido. A Gina y Angélica por sus valiosos consejos y su amistad.

Al Dr. Roberto Vázquez y a la Dra. Patricia Núñez por abrirme las puertas a su grupo de trabajo, gracias infinitas por su comprensión, disposición y por todo el apoyo brindado durante esta etapa. Gracias por creer en mí y ayudarme a construir mis sueños. Gracias por compartir conmigo su entusiasmo y pasión por la astrobiología. Gracias por ser mi ejemplo a seguir.

A todas las personas que no mencioné pero que desde cerca o lejos siempre estuvieron al pendiente de mí y me dieron ánimos para cumplir esta meta.

¡Gracias!

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	II
Resumen en inglés	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos.....	V
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tablas.....	XII

Capítulo 1. Introducción

1.1 Ecología de microbios marinos.....	1
1.1.1 La respiración a nivel celular	3
1.1.2 La respiración en la zona pelágica	7
1.1.3 Espectroscopia de Absorción Molecular Visible (Ley de Lambert – Beer)	8
1.2 Antecedentes.....	10
1.3 Justificación	12
1.4 Hipótesis	12
1.5 Objetivos.....	13
1.5.1 Objetivo general	13
1.5.2 Objetivos específicos.....	13

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestras	14
2.2 Zona de estudio	14
2.3 Método ETS _{vivo} de referencia:.....	15

Capítulo 3. Resultados

3.1	Procesamiento de muestras marinas con el método ETS _{vivo}	18
3.1.1	Comparación de filtros para la separación de procariontes heterótrofos.....	18
3.1.2	La cinética de reducción de INT a diferentes periodos de incubación.....	19
3.1.3	Comparación de filtros para la colecta de bacterias con formazán	20
3.1.4	Extracción de formazán.....	24
3.2	Cuantificación de formazán (F , $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	25
3.2.1	Medición de la señal de formazán con espectrofotómetro y sistema óptico.....	26
i.	Ruido de instrumentos	26
ii.	Comparación de la medición de absorbancia de formazán entre instrumentos....	29
iii.	Constancia del coeficiente de absortividad molar (ϵ)	32
3.2.2	Procesamiento de datos e interpretación de espectros	34
i.	Corrección de la línea base.....	34
ii.	Traslape óptico de espectros	35
3.3	Bioensayos F vs. R	45
3.3.1	Generación de las muestras de tipo blanco.	45
i.	Efectos del formol sobre las muestras	45
ii.	Comparación entre blancos y muestras.....	47
3.3.2	Comparación de formazán con tasas de respiración de oxígeno.....	50
3.3.3	Perfil de reducción de INT en el Pacífico.....	53

Capítulo 4. Discusión

4.1	Importancia del método y su potencial para la ecología marina	54
4.2	Avances del método con la tesis	55
4.3	Problemas no resueltos	56

Capítulo 5. Conclusiones

Literatura citada	60
-------------------------	----

Lista de figuras

Figura		Página
1	Espectro del tamaño de partículas y moléculas en el ecosistema marino (Tomado de Nagata, 2008).....	2
2	Sistema de transporte de electrones (Modificado de Madigan et al., 2004).....	4
3	Reducción de INT a formazán.....	6
4	Diferencia del sitio donde ocurre la reducción de INT entre células procariotas y eucariotas (Tomado de Villegas-Mendoza, 2015).....	7
5	Localización de las estaciones de muestreo en la región de la Bahía de Todos Santos.....	14
6	Evaluación del Método ETS _{vivo} de referencia.....	17
7	Cinética de reducción de INT en cultivo de <i>V. harveyi</i> (cuadros rojos) y en muestra oceánica con comunidad procariota (triángulos azules). Las muestras blanco o control (círculos) se realizaron con formol al 4% por una hora y una adición posterior de INT e incubación por otra hora.....	20
8	Espectros promedio de absorbancia de formazán disuelto en propanol y colectado con filtros de policarbonato (verde) y membrana (azul) de 0.2 μm y 47 mm de diámetro después de incubar una muestra de bacterias oceánicas con INT, n=3.....	22
9	A) Comparación de la colecta de bacterias con formazán entre filtros de membrana <i>Durapore</i> con tamaño de poro de 0.2 μm (rombos rojos) y 0.4 μm (círculos azules) durante la incubación de la muestra oceánica con INT. B) Comparación entre los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] de la figura A ($y=0.58x + 0.16$, $r^2=0.97$).....	23
10	A) Comparación de los espectros de absorbancia de muestras oceánicas superficiales incubadas con INT y procesadas con <i>Beadbeater</i> (rojo) y agitador vórtex (negro) para la extracción de formazán. B) Comparación de los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] calculados para ambos homogeneizadores, n=5.....	25
11	Límite de detección del espectrofotómetro: espectro del ruido del instrumento (morado) y señal de absorbancia significativa de formazán esperada en la muestra (naranja, n=5).....	26
12	Espectros de propanol sin muestra para determinar el límite de detección del sistema Ocean Optics con dos diferentes lámparas y su equivalencia en F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]: A) Lámpara LS-1 B) Lámpara DH-2000-BAL. En rojo se muestra la señal significativa que se espera detectar (n=5) y en azul se muestra el espectro medido del ruido del instrumento.....	28

13	Comparación de absorbancia [1/cm] de los estándares de formazán (cuadros rojos, $y=0.84x-0.0025$, $r^2=0.99$, $n=5$) y en muestras oceánicas incubadas con INT (círculos azules, $y=0.24x-0.0012$, $r^2=0.87$, $n=50$) entre ambos instrumentos. Los valores atípicos (círculos negros) forman parte del juego de datos de las muestras marinas.	29
14	Medición de la señal de irradiancia de propanol obtenida con el sistema Ocean Optics.....	30
15	Medición espectral de absorbancia de soluciones estándar de formazán diluidas 93.75 μM (verde), 46.87 μM (rojo) y 23.43 μM (azul) con lámparas de distinta intensidad acopladas al Sistema Ocean Optics. A) Lámpara LS-1. B) Lámpara DH-2000-BAL.....	31
16	Forma espectral del coeficiente de absorción molar (ϵ) de formazán para las mediciones realizadas con estándares en A) espectrofotómetro ($n=28$) y B) Ocean Optics con lámpara LS-1 ($n=23$). En gris se muestran los datos utilizados para calcular el espectro promedio de formazán (negro) y en rojo los espectros no considerados.....	33
17	Comparación de los valores de absorbancia [1/cm] y F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] calculados mediante estándares de formazán sin corrección (rombos azules, $y=1300.4x+13.39$, $r^2=0.9975$) con corrección de la línea base por Matlab (cuadros rojos, $y=1730x+11.71$, $r^2=0.9977$), con promedio de 600 a 700 nm (triángulos verdes, $1427.9x+5.04$, $r^2=0.9971$) y con pendiente (círculos morados, $y=1816.2x+0.24$, $r^2=0.9977$), $n=6$	35
18	Espectros de absorbancia del blanco de propanol (azul, $n=2$), los filtros de policarbonato (rojo, $n=3$) y membrana (verde, $n=2$) sin muestra marina sumergidos en 1.5 mL de propanol y el promedio de los espectros (morado, $n=7$). Medición en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40.....	36
19	Espectros promedio de absorbancias de dos diferentes tipos de filtro de 0.2 μm sin muestra marina y procesados con propanol antes (filtro policarbonato, naranja; filtro membrana, azul claro) y después de homogeneizar con <i>Beadbeater</i> (filtro policarbonato, rojo; filtro membrana, azul marino) medidos en espectrofotómetro, $n=2$	37
20	Comparación de los espectros de absorción del INT disuelto en propanol (verde), disuelto en agua destilada con cloruro de sodio (rosa) y posterior a enjuague (morado) con el espectro de bacterias marinas incubadas con INT (café) y el propanol (azul) como referencia.....	38

- 21 Espectros promedio de muestras de agua de mar de la bahía de 0 m (naranja, n=21), 2 m (rojo, n=10), 8 m (verde, n=2) y de 500 a 800 m (morado, n=6) de profundidad procesadas con propanol de acuerdo al método ETS_{vivo}. La 2ª ordenada muestra el equivalente aproximado en unidades de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. En negro se muestra el espectro promedio calculado para todas las muestras, n=39..... 40
- 22 Comparación entre la concentración de clorofila y la absorbancia de las muestras marinas sin incubación de INT provenientes de diferentes profundidades, no se encontró una correlación entre las muestras ($r^2=0.35$, n=4)..... 41
- 23 Comparación entre el volumen de agua marino filtrado por 0.8 μm y procesado con propanol con la absorbancia registrada para cada una de las muestras marinas, no se encontró una correlación entre las variables ($r^2=0.12$, n=6)..... 42
- 24 Comparación de la reducción de INT entre la materia orgánica extracelular y muestras de bacterias marinas provenientes de la bahía, n=38. La línea gris corresponde a una pendiente teórica 1/1..... 43
- 25 Serie de tiempo de la reducción de INT por la materia orgánica disuelta (azul) y una comunidad de bacterias marinas (verde) colectadas en la bahía..... 44
- 26 Duplicados de diferentes muestras de bacterias de la bahía incubados con INT y procesados para obtener F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] con el método ETS_{vivo}. En azul muestras incubadas primero con INT y después de una hora se agregó formol. En turquesa muestras incubadas únicamente con INT..... 46
- 27 Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] estimado para muestras y blancos con datos de campo (triángulos), de laboratorio (cuadrados) y de crucero (círculos). A) Los blancos fueron incubados con formol al 2% con/sin borato de sodio, n=61. B) Los blancos se generaron con una concentración de formol al 4%, n=20. La línea gris corresponde a una correlación 1 a 1 entre variables..... 49
- 28 Comparación entre F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] y R [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] por célula calculados para los sub-cultivos procariontas en períodos de 4 horas (n=74). El óvalo color rojo agrupa a los datos fuera de la tendencia positiva entre F y R . La muestra de bacterias con monitoreo de O_2 e incubadas con INT provienen de: sub-cultivos de primera incubación de *Thalassiosira sp.* (cuadros y cruces), segunda incubación de *Thalassiosira sp.* (guiones) primera incubación de *Chaetoceros sp.* (triángulos), segunda incubación de *Chaetoceros sp.* (equis), primera incubación de bacterias de la bahía (asteriscos) y segunda incubación de bacterias de la bahía (círculos)..... 51

- 29 Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] entre la extracción de formazán antes y después de la incubación para la medición de oxígeno de tres sub-cultivos de bacterias (asociadas a *Chaetoceros sp.*, círculos verdes, $-3.95x+60.74$, $r^2=0.74$; provenientes de la bahía, cuadros naranjas, no hay cambio significativo en y , $r^2=0.05$; asociadas a *Thalassiosira sp.*, triángulos azules, $1.03x+6.78$, $r^2=0.79$). La línea gris corresponde a la pendiente teórica 1/1, $n=58$ 52
- 30 Relación entre F y R calculada a partir de muestras de bacterias marinas de diferentes profundidades incubadas con INT y comparadas con la respiración de acuerdo al método ETS_{vivo} (Formazán neto, cuadros rojos, $-3.32x+6.83$, $r^2=0.98$; formazán muestra, rombos azules, $-2.47x+6.80$, $r^2=0.68$). La línea negra corresponde a la relación esperada entre R y F encontrada por Villegas-Mendoza (2015) 53

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en las muestras marinas filtradas con filtros de policarbonato de diferentes tamaños de poro, $n=2$	19
2	Comparación de F entre filtros de membrana <i>Isopore</i> , calcinado GF/F y policarbonato de $0.2 \mu\text{m}$ para la colecta de bacterias marinas con formazán, $n=5$	21
3	Efecto del formol en F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] producido en las muestras de materia orgánica disuelta, blancos y procariontes marinos, $n=2$	47
4	Factores que intervienen en la medición de absorbancia de formazán en la muestra de bacterias marinas. Ejemplo de la importancia de los factores en relación a muestra en unidades de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] Los factores parcialmente se traslapan y no son aditivos.....	56

Capítulo 1. Introducción

1.1 Ecología de microbios marinos

Los microbios marinos son el grupo de organismos más abundantes en el planeta (Kirchman, 2008). En el océano existe una gran diversidad de grupos biológicos microscópicos como eucariontes, cianobacterias, bacterias heterótrofas y arqueobacterias que de manera general son organismos de talla menor a 100 μm (Kirchman, 2008). Desde un punto de vista ecológico, los microbios marinos impactan al balance biogeoquímico global de manera importante (Kirchman, 2008).

El amplio grupo de diversidad biológica en el ecosistema marino está dominado numéricamente por bacterias organótrofas y gram-negativas. El bacterioplancton organótrofo crece gracias a la oxidación de sustratos orgánicos a través de la respiración aeróbica (Sherr y Sherr, 2000), por lo que dentro del ciclo de carbono las bacterias heterótrofas son responsables en gran parte del reciclaje de nutrientes para los productores primarios (Azam et al., 1983). Además, tienen el papel importante de convertir el carbono orgánico disuelto (DOC por sus siglas en inglés) a partículas orgánicas que alimentan la red trófica.

El océano al ser el hábitat natural de los microbios marinos alberga un amplio espectro de materia orgánica que sirve como sustrato para los procariontes. La materia orgánica se clasifica en materia orgánica disuelta (DOM por sus siglas en inglés) y particulada (POM por sus siglas en inglés). El principal componente corresponde a la materia orgánica disuelta en el agua de mar la cual es una mezcla compleja de compuestos orgánicos con diversas composiciones químicas, estructuras físicas y reactividad (Nagata, 2008). Una fracción de materia orgánica reactiva es lábil o semilábil con vida media de horas a días y semanas a meses, respectivamente. Esta fracción constituye <10% del total del DOC e incluye a aminoácidos y carbohidratos. En contraste, la materia refractaria, que constituye >90%, tiene una vida media de más de 1000 años y su composición química es desconocida; esta fracción no es degradada por los microbios (Nagata, 2008).

Aunque la DOM tiene concentraciones de alrededor de 50 $\mu\text{moles/L}$ en el interior del océano y el doble en superficie, la gran variedad de las diferentes moléculas resulta en una muy baja concentración de cada tipo de molécula. La clasificación del DOM se basa en su disponibilidad para alimentar a los procariontes. El 90% del carbono orgánico disuelto lábil (DOC) producido por los productores primarios está disponible para los procariontes y clasificado como DOM lábil (DOM_l). La parte de DOM en las capas

superficiales de la columna de agua que no es respirado y remineralizado por las bacterias heterótrofas se exporta hacia aguas profundas por mezcla vertical (Kirchman, 2008).

Para las bacterias heterótrofas la materia orgánica disuelta no sólo sirve como una fuente de carbono y nutrientes, sino que las partículas orgánicas también proporcionan una superficie para adherirse (Nagata, 2008). Se han identificado diversas clases de partículas de detritos marinos en cuestión de tamaño y propiedades (Figura 1) que albergan comunidades densas de bacterias (Nagata, 2008). Sin embargo, las bacterias adheridas a la materia orgánica particulada, POM por sus siglas en inglés, representan una pequeña fracción (<10%) de la abundancia total de bacterias y de la producción orgánica en ambientes pelágicos; la gran mayoría de bacterias en aguas pelágicas son células suspendidas (Nagata, 2008). Aunque las bacterias adheridas parecen ser más activas fisiológicamente.

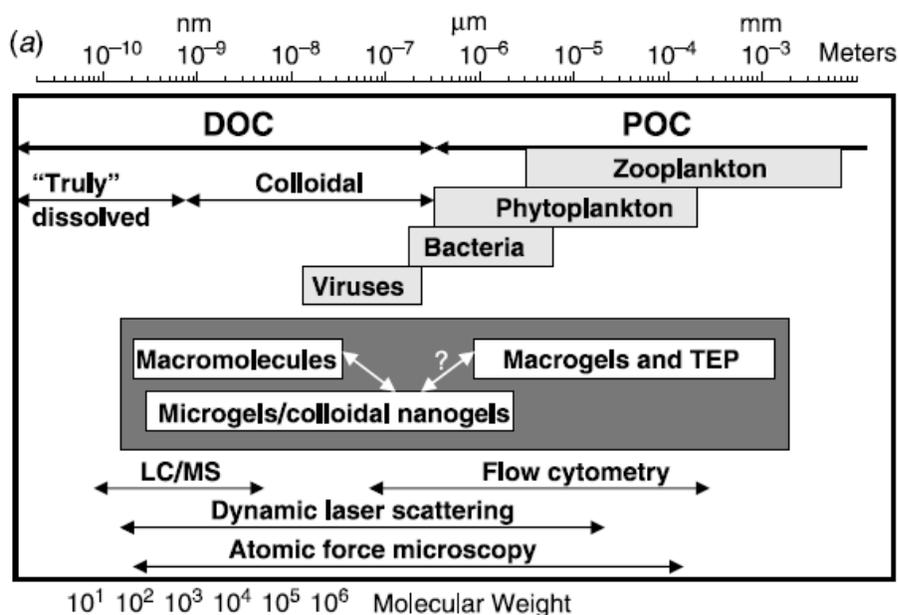


Figura 1. Espectro del tamaño de partículas y moléculas en el ecosistema marino (Tomado de Nagata, 2008).

La degradación bacteriana y la transformación de POM y DOM es un componente importante de los ciclos biogeoquímicos en los océanos. Estos procesos están dominados por la respiración aeróbica de las bacterias que oxidan el carbono orgánico y producen moléculas inorgánicas de C, N y P (Kirchman, 2008).

1.1.1 La respiración a nivel celular

La membrana plasmática de las células procariotas gram-negativas está rodeada por una pared celular compuesta por una delgada capa de peptidoglicano y por una membrana externa de lipopolisacáridos en donde residen proteínas (porinas) que actúan como poros para transportar moléculas específicas, por ejemplo moléculas orgánicas, hacia el interior de la célula (Nagata, 2008). Las bacterias marinas asimilan diferentes compuestos orgánicos, en general los de bajo peso molecular son transportados directamente a través de la membrana celular (sustratos lábiles) y por lo general están presentes en concentraciones bajas en el agua de mar (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). En contraste, los compuestos orgánicos de alto peso molecular tales como polisacáridos y proteínas pueden ser utilizados por las bacterias sólo después de haber sido hidrolizados extracelularmente por exo-enzimas resultando en moléculas pequeñas que son transportados hacia el interior de la célula (Nagata, 2008; Sherr y Sherr, 2000).

La oxidación de sustratos orgánicos para la obtención de energía para la célula y la síntesis de biomasa ocurre mediante el proceso fisiológico de la respiración; de manera muy general implica una transferencia de protones y electrones desde un donador hasta un receptor por medio de reacciones de óxido-reducción en un sistema enzimático asociado a la membrana plasmática donde el oxígeno sirve como aceptor de electrones y la materia orgánica sirve como donador de electrones.

En el proceso de respiración aeróbica de materia orgánica la producción de ATP está dada por tres etapas: la fosforilación oxidativa (durante la glucólisis y ciclo de Krebs) y en mayor parte por el producto del transporte de electrones que resulta en un gradiente de protones que representa un potencial de energía celular para producir entre otros compuestos ATP (Madigan, Martinko, y Parker, 2004).

La parte central del sistema de respiración aeróbica es el sistema de transporte de electrones (ETS por sus siglas en inglés) que contiene una serie de transportadores asociados a la membrana para trasladar protones del lado interior de la membrana al lado exterior (Figura 2); las enzimas deshidrogenasas y las proteínas portadoras de electrones del citocromo intervienen en la transferencia de electrones. Los principales componentes del sistema de transporte de electrones son:

Sustrato orgánico --> NADH --> Flavoproteínas --> Quinonas --> Citocromos --> O_2

Los átomos de hidrógeno procedentes de los transportadores se desdoblan en protones y electrones. Las deshidrogenasas del NADH aceptan átomos de hidrógeno procedentes de NADH y los transfieren a las

flavoproteínas. Enseguida intervienen las quinonas que actúan como aceptores de átomos de hidrógeno y como donadores de electrones hacia los citocromos (Madigan et al., 2004).

Los citocromos son proteínas que contienen como grupo prostético y un anillo porfirínico que contiene hierro; éstos sufren oxidaciones y reducciones mediante la pérdida o ganancia de electrones. Los complejos de citocromos intervienen en la transferencia de electrones y en la translocación de protones fuera de la célula hacia el periplasma (Madigan et al., 2004).

Al final de la cadena de transporte, los electrones reaccionan con el O_2 que cuando se reduce a H_2O necesita H^+ para completar la reacción y estos protones derivan de la disociación del agua en H^+ y OH^- (Madigan et al., 2004).

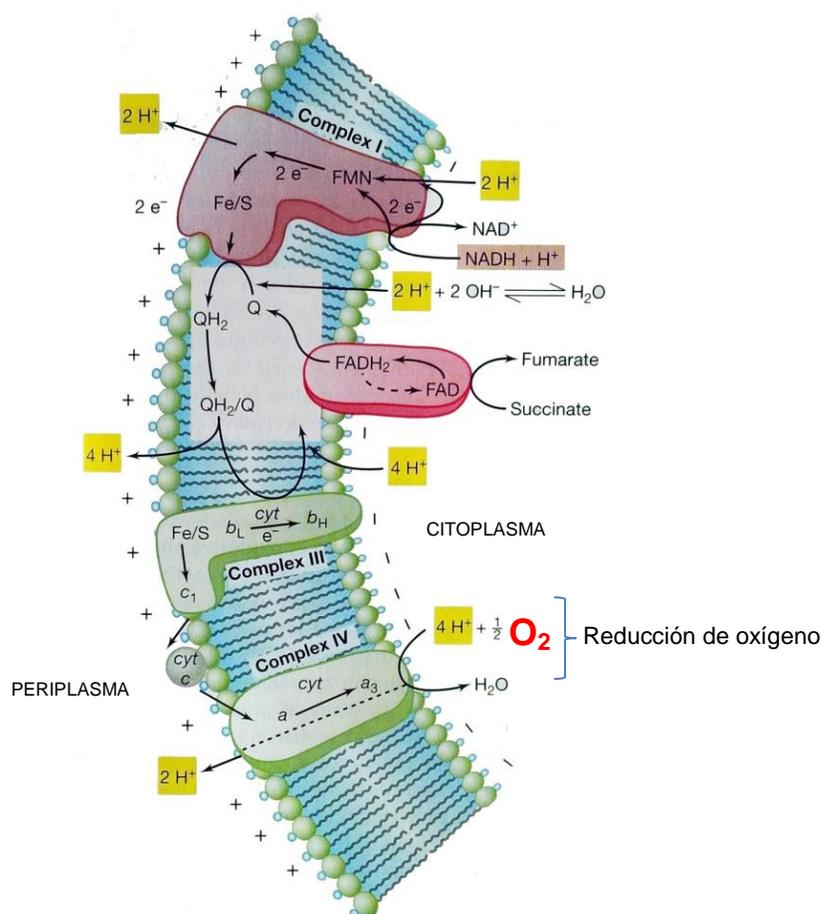


Figura 2. Sistema de transporte de electrones (Modificado de Madigan et al., 2004).

Como resultado se genera un potencial electroquímico (o gradiente de pH) a través de la membrana con la porción interna citoplásmática de carga negativa y alcalina y la parte externa cargada electrónicamente positiva y ácida. El transporte de electrones en la membrana plasmática es solo una parte de la respiración celular. Adicionalmente en cuanto al flujo de carbono, el piruvato (proveniente de la glucólisis y ciclo de Krebs) se oxida por completo a CO_2 (Madigan et al., 2004). De esta forma la actividad electroquímica del sistema de transporte de electrones es una estimación del proceso de respiración.

En ambientes marinos la actividad de las enzimas respiratorias de bacterias aerobias puede ser detectada a través de la reducción de sales de tetrazolio, como el INT (cloruro de yodonitrotetrazolio); estos compuestos compiten en la célula como aceptores de electrones con el oxígeno (del Giorgio y Gasol, 2008). La reducción de sales de tetrazolio se ha utilizado para cuantificar el potencial de respiración en poblaciones procariontas por medio de una extracción con solvente orgánico y una cuantificación colorimétrica de la producción de formazán (Packard, 1971; Smith y McFeters, 1997).

Las propiedades químicas y biológicas de las sales de tetrazolio están asociadas a su anillo central con carga positiva que contiene átomos de nitrógeno (Berridge, Herst, y Tan, 2005) (Figura 3). Después de la reducción de INT, las estructuras de tetrazolio se transforman a partir de sales incoloras o débilmente coloreadas en productos de formazán de colores brillantes por la ruptura del anillo de tetrazol (Berridge et al., 2005). Con varias sales de tetrazolio, incluso con INT, la transferencia de electrones puede ocurrir en ausencia de enzimas (Berridge et al., 2005; Maldonado, Packard, y Gómez, 2012) con moléculas altamente reductoras. Las diferentes sales de tetrazolio producen formazanes específicos, aquí se refiere al formazán de INT cuando se menciona formazán.

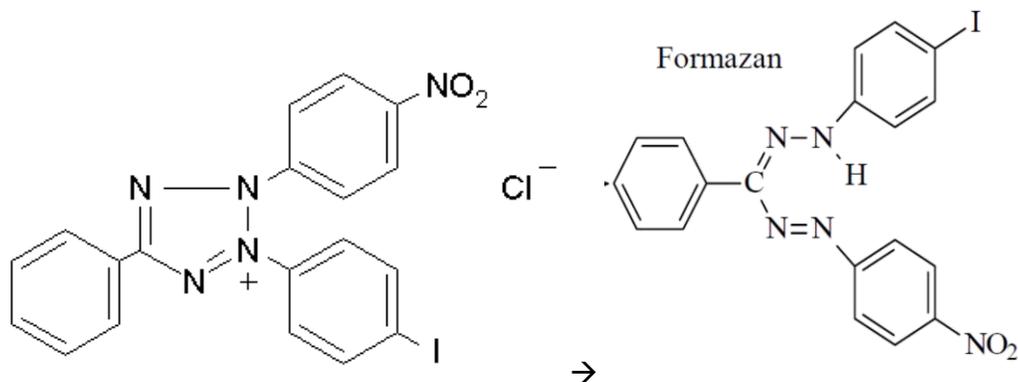


Figura 3. Reducción de INT a formazán.

Se han propuesto distintos mecanismos de reducción del tetrazolio a formazán en células eucariotas; el INT en las mitocondrias de los eucariotas es reducido por el succinato (Smith y McFeters, 1997). Sin embargo, los mecanismos en procariontes permanecen aún sin definirse (Smith y McFeters, 1997). El INT puede cruzar la pared celular pero se desconoce si el formazán puede (Figura 4). Aunque se supone que la reducción de sales de tetrazolio ocurre intracelularmente, gran parte de la reducción también ocurre de forma extracelular (Berridge et al., 2005). La reducción de colorantes de tetrazolio por microorganismos dependerá del organismo en cuestión y de sus condiciones fisiológicas, como su fase de crecimiento y su metabolismo, así como las condiciones de disponibilidad de nutrientes en el medio (Berridge et al., 2005).

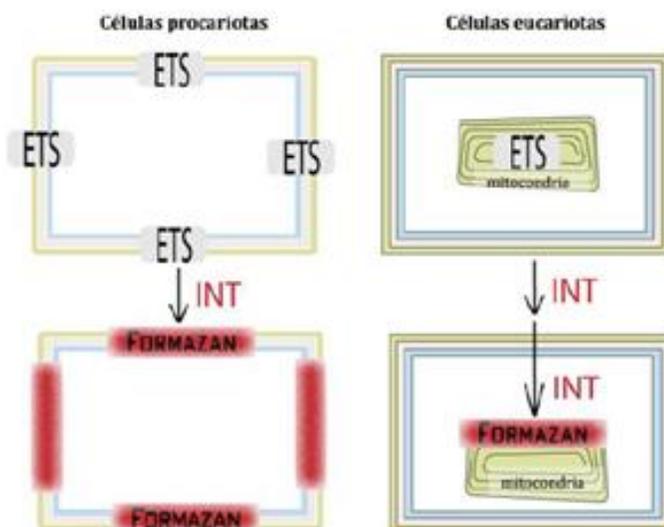


Figura 4. Diferencia del sitio donde ocurre la reducción de INT entre células procariotas y eucariotas (Tomado de Villegas-Mendoza, 2015).

1.1.2 La respiración en la zona pelágica

Los océanos en su gran mayoría son ambientes óxicos y las partes anóxicas generalmente están restringidas al fondo del mar o a las regiones denominadas como zonas de mínimo de oxígeno. La presencia de oxígeno en una masa de agua depende de diversos factores físico-biológicos como el intercambio de gases que existe entre la atmósfera y el océano, la circulación de corrientes marinas y la tasa de consumo biológico del oxígeno (Seibel, 2011). Además, la solubilidad del oxígeno disminuye con las altas temperaturas y salinidad (Morris y Schmidt, 2013). El 8% del volumen del océano contiene menos de $20 \mu\text{mol kg}^{-1}$ de oxígeno (Seibel, 2011). Esta concentración no es limitante para la mayoría de los microbios marinos. En niveles bajos de oxígeno el metabolismo aeróbico debe extraer de manera efectiva el O_2 del agua (Childress y Seibel, 1998). Existe una fuerte selección por los organismos capaces de regular su tasa de consumo de oxígeno a los niveles de oxígeno encontrados en esos ambientes (Seibel, 2011).

El mecanismo de las especies microbianas para regular sus tasas de consumo de O_2 es facilitado por la baja demanda de oxígeno. Los organismos no consumen O_2 y producen ATP que no necesitan; sin una demanda específica de energía, el alto consumo es desperdiciado y éste no es favorecido por la selección natural (Seibel, 2011).

Existe actividad respiratoria microbiana significativa en todo el volumen del océano, incluso en el océano oscuro a profundidades mayores a 1000 metros (del Giorgio y Williams, 2005). En general, las mediciones de las tasas de respiración de microbios en el océano son muy limitadas debido a las dificultades técnicas para realizarlas y existen relativamente pocos datos sobre este proceso en el océano abierto (Robinson, 2015).

Los datos publicados presentan un sesgo temporal y espacial debido a que se han obtenido de manera experimental *in vivo* y no a partir de incubaciones *in situ* (del Giorgio y Williams, 2005). Los principales contribuyentes a la respiración total de la mayoría de los ecosistemas marinos son las bacterias heterótrofas (del Giorgio y Williams, 2005), se estima que contribuyen con alrededor de un 50% del total de la comunidad (Robinson y Williams, 2005). En su gran mayoría la respiración bacteriana en el océano es aeróbica de microbios organotróficos; es decir, que depende principalmente de la materia orgánica derivada directa o indirectamente de la producción primaria (del Giorgio y Williams, 2005).

En el análisis de los procesos biogeoquímicos en el océano, la respiración bacteriana permite estimar flujos de materia orgánica disuelta (Warkentin, Freese, Karsten, y Schumann, 2007) aunque todavía con gran dificultad (Burd et al., 2010) debido a la carencia de una técnica adecuada para medirla. Cabe destacar que en la respiración a nivel de individuos, los organismos son capaces de regular el proceso (dentro de ciertos límites) mientras que las tasas de respiración a nivel de ecosistema están limitadas por las condiciones físicas y químicas del medio (del Giorgio y Williams, 2005). De forma experimental con cultivos mono-específicos de bacterias se ha establecido una relación entre el mecanismo de transporte de electrones y el proceso de respiración. De acuerdo a Reinthaler et al. (2006) en profundidades de 1000 metros se han estimado tasas de respiración de $60 - 300 \mu\text{mol C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

1.1.3 Espectroscopia de Absorción Molecular Visible (Ley de Lambert – Beer)

La cuantificación colorimétrica de la producción de formazán en las bacterias se realiza mediante un espectrofotómetro. La espectrofotometría mide a longitudes de onda definidas la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función del haz de luz que atraviesa la celda (paso óptico) y la concentración de la molécula. Mediante la espectrofotometría se busca cuantificar las concentraciones de las sustancias en solución con base en la absorción específica de la sustancia, que es una propiedad del material en condiciones definidas por el tipo de solvente, la temperatura y la presión.

La ley de Lambert-Beer-Bouger es una relación entre la absorción de luz con las propiedades del material atravesado:

$$\frac{I_m}{I_{100}} = e^{-A} \quad (1)$$

Introduce el concepto de absorbancia [A] de una muestra como:

$$A = -\log_{10} \frac{I_m}{I_{100}} \quad (2)$$

Donde I_{100} representa la intensidad de la luz incidente e I_m la intensidad de la luz que atraviesa la celda. En términos prácticos I_{100} corresponde a la irradiancia recibida por el detector a concentración cero de muestra. La absorbancia también se puede expresar matemáticamente en función del coeficiente de absorptividad molar a una longitud de onda determinada, la longitud de la celda y de la concentración del soluto:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c \quad (3)$$

Donde ε corresponde a la absorptividad molar del material de interés a cierta longitud de onda (λ), l es la longitud de la celda y c es la concentración del material. La transmitancia [%T] se refiere a la fracción de luz incidente que a una determinada longitud de onda pasa a través de la muestra.

$$\%T = \frac{I_m}{I_{100}} \cdot 100 \quad (4)$$

Solo en condiciones ideales las mediciones únicamente son resultado de la absorción molecular de la sustancia, en la práctica las mediciones resultan de la suma de absorbancia y esparcimiento. El esparcimiento, específicamente el esparcimiento elástico, refiere al desvío de fotones en su traslado por la muestra. La suma de absorbancia y esparcimiento da la extinción lo que es que se mide experimentalmente. Para cuantificar la absorbancia se busca a minimizar el esparcimiento de luz por partículas y por corrección numérica.

1.2 Antecedentes

La respiración en términos de consumo de oxígeno ofrece una aproximación a la actividad metabólica de las bacterias heterótrofas marinas. Debido a que está directamente relacionada con la degradación y oxidación de la materia orgánica es posible estimar el flujo total de carbono orgánico en las comunidades bióticas marinas. Sin embargo, existe poco conocimiento de las tasas de respiración *in situ* de los procariontes por la falta de un método cuantitativo lo suficientemente robusto. Desde la década de los años 60, se reconoció que para elaborar modelos de los ecosistemas acuáticos era necesario estimar las tasas de respiración del bacterioplancton; sin embargo, estas tasas son muy difíciles de determinar por medición directa y se calculan a partir de otros parámetros físico-biológicos (Christensen y Packard, 1979).

Los métodos para cuantificar la respiración se basan en procesos celulares como el consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono y la evaluación de la actividad *in vitro* del sistema de transporte de electrones (Kirchman, 2008). El método Winkler permite cuantificar el consumo de O₂ en organismos marinos a partir de la estimación de O₂ disuelto en el medio acuático. En años más recientes se han estimado las tasas de respiración a través de la medición de la concentración de oxígeno con el uso de sensores (Biddanda, Opsahl, y Benner, 1994; Kragh, Sondergaard, y Tranvik, 2008; Marchand, Prairie, y del Giorgio, 2009). Sin embargo, las mediciones directas de la respiración microbiana del total de la comunidad planctónica son escasas (Williams, 1981). Para el procesamiento de las muestras naturales es necesario separar los procariontes heterótrofos mediante un fraccionamiento de organismos por tamaño antes de la incubación experimental: la filtración pre-incubación. El método más común en oceanografía es la filtración pre-incubación antes de la subsecuente medición de consumo de oxígeno en condiciones de oscuridad para minimizar la generación de oxígeno por organismos fotótrofos que resultaría en una subestimación de la tasa de respiración. Sin embargo; los procedimientos de filtración antes de la medición y los periodos largos de incubación pueden ocasionar cambios en la estructura de la comunidad y la dinámica trófica de la comunidad microbiana (Robinson y Williams, 2005).

Packard (1969) destacó la importancia del rol ecológico que tiene la respiración de bacterias en el océano y propuso el método de ETS *in vitro* para estimar tasas de respiración. En 1981, Packard y Williams demostraron que la actividad del ETS está correlacionada con el consumo de oxígeno. Hasta el momento se han utilizado distintos reactivos que funcionan como aceptores competitivos de electrones con mayor afinidad que el oxígeno que pueden ser detectados en su estado reducido al cambiarse en un fluorocromo o formando formazanes con propiedades ópticas distintas (Berridge et al., 2005). El uso del

cloruro de yodonitrotetrazolio (INT) *in vitro* (ETS_{vitro}) para estimar la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) en plancton marino fue descrito primeramente por Packard (1971). El método se basa en la reducción del INT una sal soluble en agua y permeable a la membrana; ha sido generalmente medido *in vitro* con el uso de las sales de tetrazolio como aceptor artificial de electrones y con la adición de donadores de electrones como NADH (Packard, 1971). Al contrario, el método *in vivo* (ETS_{vivo}) consiste en agregar a la muestra aceptor de electrones en exceso y medir la tasa de reducción que representa una estimación de la actividad de las deshidrogenasas presentes en el ETS (Martínez-García, Fernández, Aranguren-Gassis, y Teira, 2009). El sistema de ETS en la pared celular de procariontes o en la mitocondria de eucariontes, genera cristales de formazán (INT-F) que pueden ser observados por medio de microscopia fuera de las células (Martínez-García et al., 2009). Villegas-Mendoza, Cajal-Medrano, y Maske (2015) evaluaron el efecto tóxico del INT en las comunidades naturales de bacterioplancton marino y en eucariontes por lo que determinaron que la toxicidad persistente en ambos invalida el uso del método *in vivo* (Martínez-García et al., 2009) como un estimador para las tasas de respiración.

Para minimizar el efecto de la toxicidad se ha modificado recientemente la técnica del ETS_{vivo} para la estimación de la tasa de respiración *in vivo*. En este procedimiento propuesto se toma la concentración total de formazán producido durante una hora de incubación como el potencial de reducción indicador de la tasa de respiración (Villegas-Mendoza, 2015); este es un concepto distinto porque no usa la de la tasa de reducción del INT obtenida durante un periodo de incubación variable pero mayor a una hora de incubación.

Se estima que este potencial de reducción (*PotRed*) al que se refiere la modificación al ETS_{vivo} está definido por la cantidad de sitios de donadores de electrones existentes y su estado redox en las paredes celulares de procariontes en el momento de la incubación. El uso del *PotRed* evita los problemas de toxicidad del INT que provoca la caída de la tasa de producción de nuevos sitios de reducción después de agregar INT. Hasta el momento, se ha evaluado el nuevo método de *PotRed* de manera básica pero no de forma exhaustiva. Uno de los problemas identificados reside en que las muestras de tipo blanco que no tienen actividad biológica producen valores de formazán similares al resto de las muestras vivas; esto limita la sensibilidad de la técnica porque el valor numérico de la señal es disminuido con los blancos altos (Valdés-Villaverde, 2105).

La necesidad de un nuevo método para estimar la respiración en bacterias surge por estas razones:

- El método convencional es poco sensible para aguas oligotróficas superficiales o aguas profundas.
- Los tiempos de incubación largos; para la medición de tasas de consumo de oxígeno muy bajas se requieren tiempos muy largos de incubación (aproximadamente un día) mientras que para el método de INT solo se necesita de una hora.
- Las incubaciones de larga duración implican tener un control de temperatura que sea similar a la temperatura del origen de la muestra.

1.3 Justificación

A nivel celular el proceso de respiración de procariontes marinos es fundamental para obtener energía para llevar a cabo los procesos fisiológicos básicos de la célula. A nivel global en el ecosistema marino interviene a gran escala en el ciclo del carbono, nitrógeno y azufre; así como en la transferencia de energía dentro de la cadena trófica en el ecosistema marino. La respiración en la ecología microbiana del océano ha sido poco estudiada debido a la falta de metodología apropiada. Recientemente, se descubrió que el método *in vivo* propuesto por Martínez-García et al. (2009) y ya aplicado en publicaciones recientes que utiliza INT no funciona (Villegas-Mendoza et al., 2015). Villegas-Mendoza (2015) propone un protocolo distinto que permite utilizar INT para realizar las mediciones de respiración de procariontes. Se espera que la evaluación crítica de este nuevo método en el presente proyecto sugiera mejoras en la sensibilidad y practicidad del protocolo para estimar las tasas de respiración de bacterias en comunidades marinas.

1.4 Hipótesis

Aumentar la sensibilidad del método *in vivo* de potencial de reducción permitirá una mejor estimación de las tasas de respiración microbiana en volúmenes menores a 100 mL y con baja actividad metabólica de las bacterias oceánicas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar y mejorar la sensibilidad del método de estimación de la actividad respiratoria *in vivo* de bacterias marinas mediante la reducción de sales de tetrazolio (cloruro de yodonitrotetrazolio-INT) asociado a la actividad de la cadena de transporte de electrones.

1.5.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar la fuente de altos blancos en muestras oceánicas y en cultivos de procariontes e intentar reducirlos.
- ✓ Aumentar la sensibilidad del método a través del uso de celdas espectrofotométricas largas con haz de luz.
- ✓ Corregir los espectros de absorbancia con la línea base espectral y minimizar la interferencia de la medición de absorbancia de formazán por componentes extracelulares extraídos en la muestra.
- ✓ Optimizar el protocolo de medición en términos de concentraciones de reactivos, tiempos de incubación y fraccionamiento de procariontes de la comunidad planctónica.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestras

Las pruebas experimentales se realizaron con muestras de una comunidad de plancton colectadas entre octubre 2015 y agosto 2016 en la región de la Bahía de Todos Santos y con cultivos mono-específicos de *Vibrio harveyi*.

2.2 Zona de estudio

El área de estudio es la región de la Bahía de Todos Santos en donde se establecieron cuatro estaciones de muestro ubicadas al norte (estación costera 31° 51'N, 116°40'W), sur (estaciones Flucar (31°40.043' N, 116°41.545' W) y Micmar (31°36.005' N, 116°52.022' W) y sur-oeste estación Antares (31°44.929' N, 116°57.140' W) de la Bahía de Todos Santos (Figura 5).

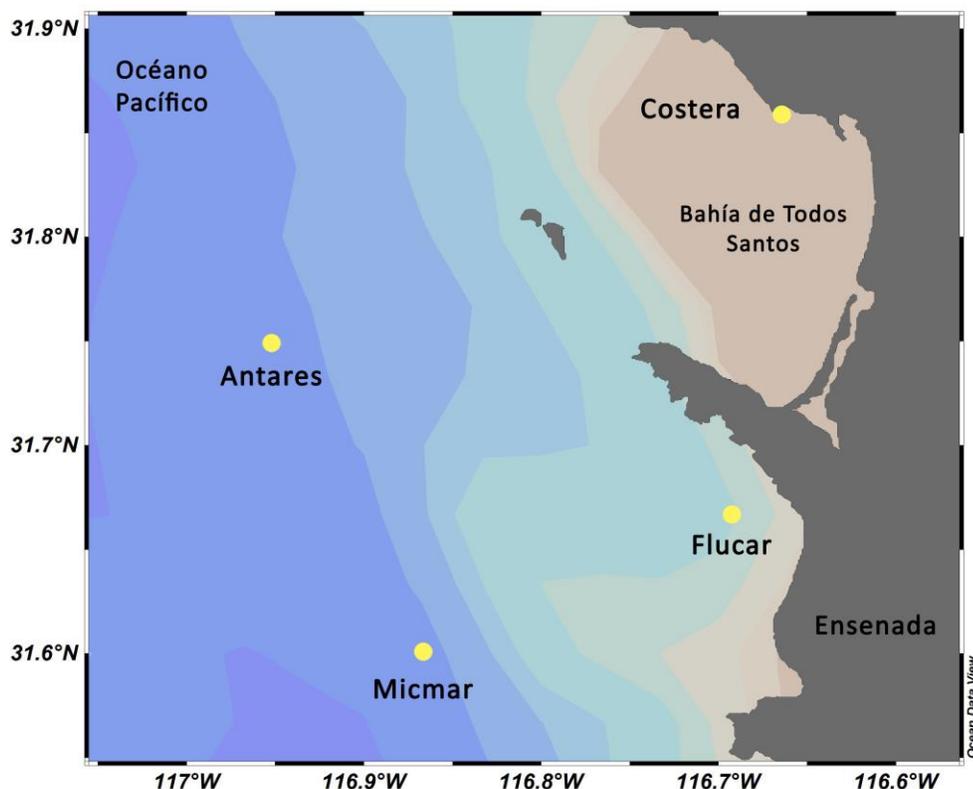


Figura 5. Localización de las estaciones de muestreo en la región de la Bahía de Todos Santos.

2.3 Método ETS_{vivo} de referencia:

La serie de pasos que estipula el método ETS_{vivo} comprende de tres etapas para su aplicabilidad: el procesamiento de muestras marinas, la cuantificación de formazán y la comparación con las tasas de respiración (Figura 6).

A continuación, se describe el protocolo de referencia:

1. Colectar muestra de agua de mar (1 L) de diferentes profundidades.
2. Filtrar con filtros de policarbonato de 0.8 μm para separar la fracción de bacterias heterótrofas.
3. Incubar las muestras marinas con INT (0.5 mM) por 60 minutos.
4. Filtrar con filtros de policarbonato de 0.8 μm para separar la fracción de bacterias heterótrofas, en caso de no haber realizado el segundo paso.
5. Filtrar con filtros de policarbonato de 0.2 μm y 47 mm de diámetro para concentrar a las bacterias con formazán.
6. Extraer el formazán concentrado sobre el filtro con 1.5 mL de propanol mediante un homogeneizador *Beadbeater* (30 segundos a 5000 rpm) con perlas de zirconio. Centrifugar la muestra a 10000 rpm por 5 minutos para la eliminación de partículas.
7. Medir la absorbancia del formazán disuelto a 485 nm en:
 - a) Espectrofotómetro convencional de 2 haces de luz (Perkin Elmer Lambda 40) y
 - b) en celdas de flujo continuo de 10 cm con un sistema de fibra óptica (OceanOptics).
8. Realizar la interpretación espectral de la medición de las muestras.
9. Comparar con mediciones del consumo de oxígeno de las muestras para calibrar el método.

La evaluación del método ETS_{vivo} consistió en el análisis puntual de algunos de los aspectos técnicos que constituyen el protocolo de referencia; como se muestra en la Figura 6 se comparó el uso de filtros de 0.8 μm de policarbonato, GF/F y membrana para la separación por tamaño de las bacterias heterótrofas, se estudió la cinética de reducción del INT durante la incubación de muestras marinas, se comparó el uso de filtros de policarbonato y membrana de 0.2 μm de tamaño de poro para la colecta de formazán, se comparó el uso del homogeneizador *Beadbeater* y el agitador de tipo vórtex para la extracción de formazán en propanol, se midieron las muestras con dos tipos de radiómetros (espectrofotómetro y sistema óptico Ocean Optics) para la interpretación espectral de las muestras y se realizaron bio-ensayos para comparar la producción de formazán de los procariontes con sus tasas de respiración.

La medición de las tasas de consumo de oxígeno de las bacterias se realizó mediante la incubación de duplicados de 70 mL de cada muestra procariota en botellas de vidrio con parches sensibles a la concentración de oxígeno (SP-Pst3-NAU-YOP) que fueron leídos con el sistema Fibox 4 (PreSens, Regensburg, Germany). La incubación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 20°C. El monitoreo de la concentración de oxígeno disponible en cada muestra se realizó cada 4 horas durante tres días y a partir de este registro se calculó la tasa de consumo de oxígeno por hora.

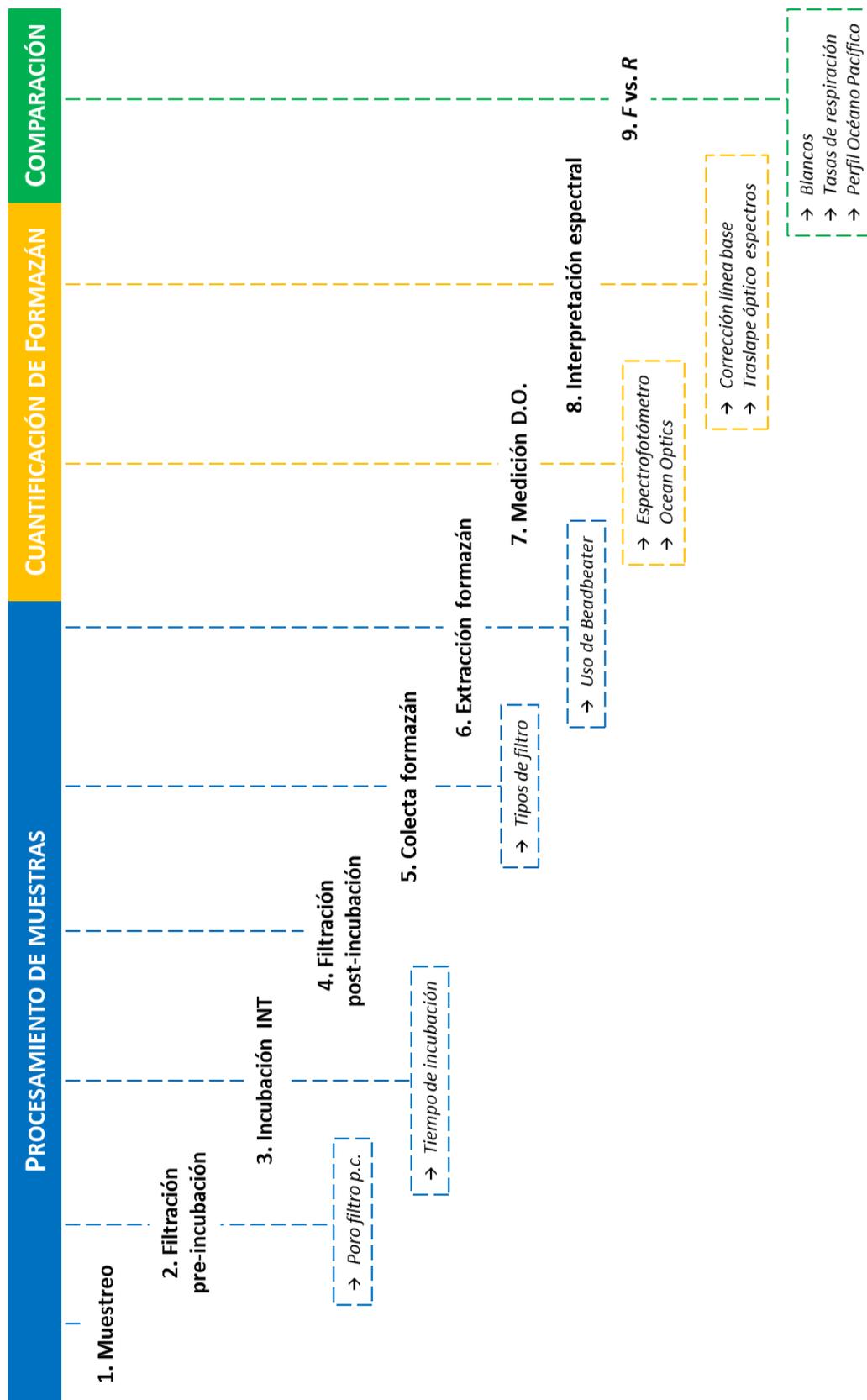


Figura 6. Evaluación del Método ETS_{vivo} de referencia.

Capítulo 3. Resultados

A continuación se presenta la evaluación de los diferentes aspectos metodológicos en la serie de pasos que conforma el procesamiento de muestras y cuantificación de formazán [F , $\mu\text{mol L}^{-1}$] del método ETS_{vivo} de referencia para su comparación con las tasas de consumo de oxígeno [R , $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] de los microbios marinos.

3.1 Procesamiento de muestras marinas con el método ETS_{vivo}

3.1.1 Comparación de filtros para la separación de procariontes heterótrofos

El método de referencia utiliza la filtración post-incubación con INT (paso 4) para separar la fracción de bacterias heterótrofas. En el presente trabajo se utilizó principalmente la filtración pre-incubación (paso 2) para la separación de los procariontes de muestras de agua de mar colectadas directamente de la bahía en superficie y con botellas Niskin a diferentes profundidades. Se compararon los resultados utilizando la filtración pre-incubación de los procariontes heterótrofos con dos diferentes tamaños de poro (0.8 μm y 1 μm) de filtros de policarbonato de 47 mm. Las muestras fueron incubadas con INT y procesadas de acuerdo al método de referencia. Se realizó la corrección de la línea base espectral para calcular F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

La comparación entre las muestras costeras y de 20 m de profundidad que fueron filtradas con filtros de policarbonato de diferente tamaño de poro resultó en que las muestras superficiales filtradas por el filtro de 0.8 μm presentaron los mismos valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] y en las muestras de 20 m ligeramente una mayor cantidad de formazán que el filtro de policarbonato de 1 μm (Tabla 1). Esta diferencia sugiere que hubo una degradación de la muestra previa a la filtración al momento de coleccionar la muestra ya que se espera que al realizar una filtración con un tamaño de poro mayor se permitiera el paso de más organismos y por lo tanto una mayor producción de F .

Tabla 1. Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en las muestras marinas filtradas con filtros de policarbonato de diferentes tamaños de poro, $n=2$.

\emptyset	Colecta de muestra marina	Formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	
		0.8 μm	1 μm
47 mm	Costera (0 m)	1.38 \pm 0.23	1.37 \pm 0.14
	Niskin (20 m)	1.37 \pm 0.48	0.69 \pm 0.17

3.1.2 La cinética de reducción de INT a diferentes periodos de incubación

El método ETS_{vivo} en el paso 3 establece incubar la muestra de bacterias heterótrofas marinas separadas con un filtro de policarbonato de 0.8 μm con INT durante 60 minutos. Se evaluó la velocidad de la reducción de INT para determinar el tiempo de eficiencia de la conversión a formazán. La prueba se realizó con muestras de un cultivo de *Vibrio harveyi* (3.5 L) y de una muestra oceánica (700 mL) filtrada por 0.8 μm . Se agregó INT a ambas muestras, se realizó la colecta y extracción de formazán a diferentes periodos (minutos) desde el inicio de la incubación hasta cuatro horas y se llevó a cabo la cuantificación de formazán como el método de referencia indica (pasos 5 a 7). Los blancos fueron generados simultáneamente con la muestra tratada con formol al 4% por una hora y posteriormente adiconada con INT. Se realizó la corrección de la línea base espectral para calcular F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

En la

Figura 7 se muestra cómo la cinética de reducción de INT define el tiempo de incubación de la muestra con la sal de tetrazolio. Para ambos casos, se observó una pronta reducción de INT a formazán en los primeros dos minutos de la incubación de la muestra, en los siguientes 40 minutos la producción de F tiende a aumentar hasta llegar a un punto de saturación con una concentración máxima de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a los 60 minutos en *Vibrio harveyi* y a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ después de los 100 minutos en la comunidad de bacterias heterótrofas oceánicas. También se observa una mayor producción en la concentración de formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$] por parte de la población de *Vibrio harveyi*. La Figura 7 demuestra que realizar la incubación de la muestra con INT por 60 minutos como el método ETS_{vivo} establece (paso 3) es suficiente para proceder con los pasos consecuentes del método; un anticipo en efectuar la colecta y extracción de formazán subestimaría el valor de F como se indica en la Figura 7.

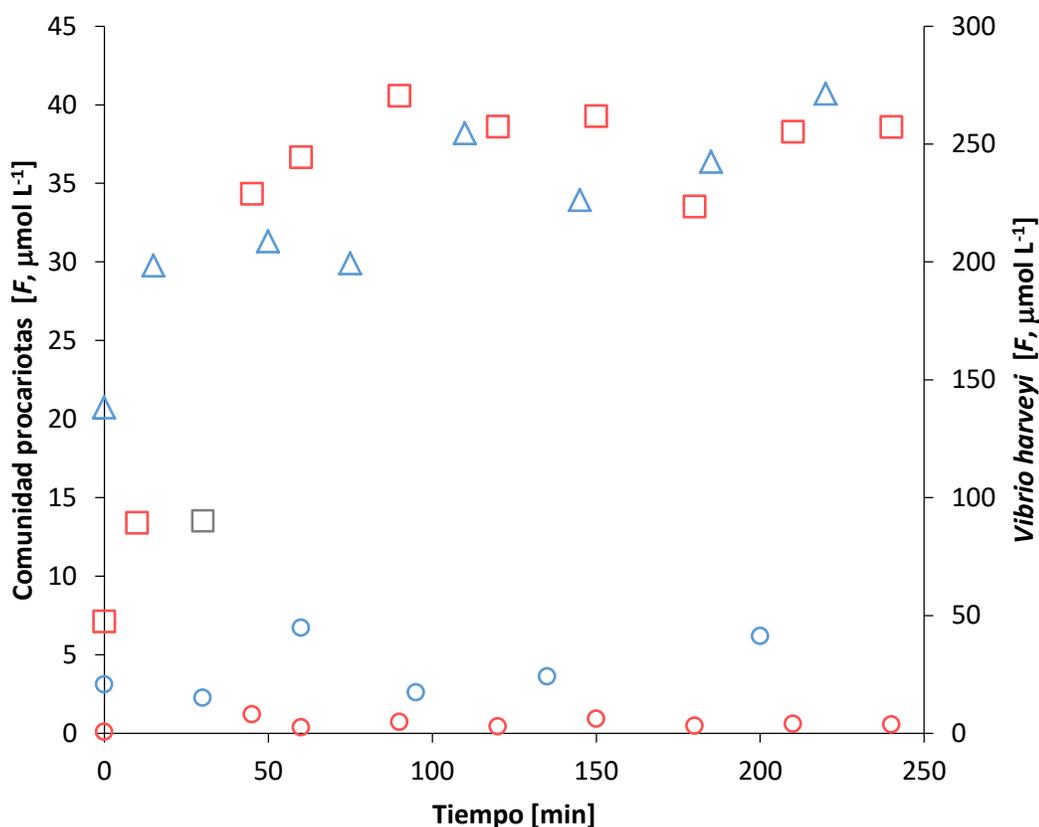


Figura 7. Cinética de reducción de INT en cultivo de *V. harveyi* (cuadros rojos) y en muestra oceánica con comunidad procariota (triángulos azules). Las muestras blanco o control (círculos) se realizaron con formol al 4% por una hora y una adición posterior de INT e incubación por otra hora.

3.1.3 Comparación de filtros para la colecta de bacterias con formazán

De acuerdo al método de referencia en su paso 5, la colecta de los cristales de formazán en bacterias marinas se realiza con filtros de policarbonato de 47 mm de diámetro y con tamaño de poro de $0.2 \mu\text{m}$. Bajo este rubro se comparó el método de filtración para la colecta de bacterias con formazán con tres diferentes tipos de filtro/tamaño de poro: membrana de policarbonato *Isopore*/ $0.2 \mu\text{m}$, fibra de vidrio calcinado/ $\sim 0.4 \mu\text{m}$ y policarbonato/ $0.2 \mu\text{m}$ de 25 mm de diámetro. Se utilizaron muestras de agua de mar colectadas con botellas Niskin a diferentes profundidades entre los 10 y 70 m que fueron filtradas por $0.8 \mu\text{m}$ e incubadas con INT por una hora y finalmente filtradas por $0.2 \mu\text{m}$ para la extracción y medición del formazán. Se realizó la corrección de la línea base espectral para calcular F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

En la Tabla 2 se muestra la concentración de formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$] promedio para cada tipo de filtro. La prueba demostró poca reproducibilidad entre los filtros con tendencia a obtener mayores valores de F con el filtro de membrana *Isopore*. En el procedimiento experimental se descartó el uso del filtro tipo calcinado GF/F, a pesar de haber obtenido una buena eficiencia en la colecta de F , dado que presentó problemas técnicos con el extracto de propanol por contaminación por fibras de vidrio después de homogeneizar las muestras.

Tabla 2. Comparación de F entre filtros de membrana *Isopore*, calcinado GF/F y policarbonato de $0.2 \mu\text{m}$ para la colecta de bacterias marinas con formazán, $n=5$.

Formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$]		
Membrana <i>Isopore</i>	GF/F	Policarbonato
2.30 ± 1.12	2.14 ± 1.03	1.53 ± 0.58

Adicionalmente se compararon los espectros de absorbancia de formazán extraído en propanol y colectado con filtros de membrana y policarbonato de $0.2 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro para un total de seis muestras con un volumen promedio de 50 mL de agua marina filtrada por $0.8 \mu\text{m}$ e incubada con INT por una hora. Los espectros de absorbancia fueron medidos en espectrofotómetro y corregidos por la línea base para identificar el pico de absorción del formazán. De acuerdo a la Figura 8 existe una aparente tendencia a obtener mayores valores de F con los filtros de policarbonato que con los filtros de membrana *Isopore*. El filtro de policarbonato presenta una absorbancia de 0.030 ± 0.013 a 485 nm mientras que en el filtro de membrana *Isopore* la absorbancia fue menor: 0.010 ± 0.012 .

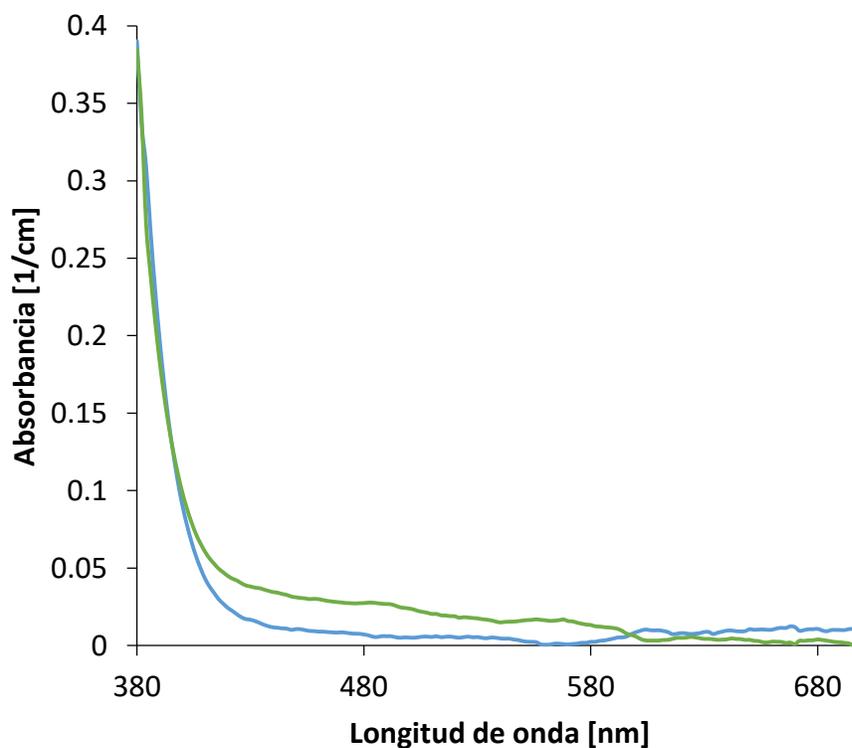


Figura 8. Espectros promedio de absorbancia de formazán disuelto en propanol y colectado con filtros de policarbonato (verde) y membrana (azul) de 0.2 μm y 47 mm de diámetro después de incubar una muestra de bacterias oceánicas con INT, $n=3$.

Finalmente se realizó una comparación de la eficiencia de colecta de *F* entre dos filtros de membrana *Durapore* con luz de malla de 0.2 y 0.4 μm a diferentes períodos de tiempo durante la incubación de muestras oceánicas (colectadas en la costa y filtradas previamente por 1 μm) con INT. Los espectros de absorbancia fueron medidos en espectrofotómetro y corregidos por la línea base. En la Figura 9 se muestra un aumento en la concentración de formazán en el tiempo (hasta 80 min) para ambos tipos de filtro; se observa que el filtro de 0.2 μm tiene una mayor eficiencia en la colecta de bacterias con formazán que el filtro de 0.4 μm . Sin embargo, el análisis de correlación para el conjunto de datos muestreados obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.98 que indica que no hay diferencia en la eficiencia de colecta de formazán entre los diferentes filtros.

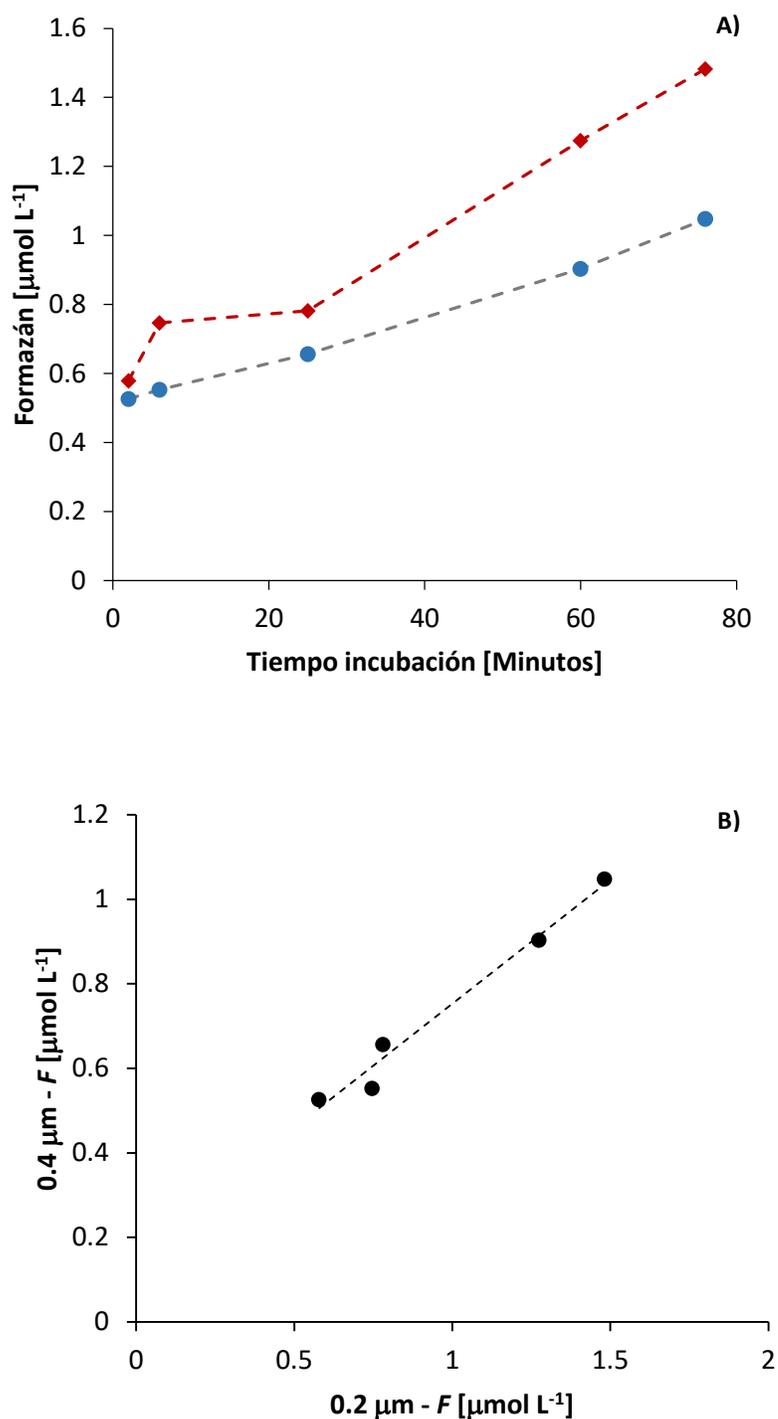


Figura 9. A) Comparación de la colecta de bacterias con formazán entre filtros de membrana *Durapore* con tamaño de poro de 0.2 μm (rombos rojos) y 0.4 μm (círculos azules) durante la incubación de la muestra oceánica con INT. B) Comparación entre los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] de la figura A ($y=0.58x + 0.16$, $r^2=0.97$).

3.1.4 Extracción de formazán

El paso 6 del método ETS_{vivo} corresponde a la extracción de los cristales de formazán de las muestras marinas incubadas con INT mediante su disolución en 1.5 mL de isopropanol. Posteriormente las muestras se someten a una agitación por medio de un *Beadbeater* por 5 minutos a 2500 rpm. Bajo este rubro se comparó la eficiencia del homogeneizador *Beadbeater* y del agitador tipo vórtex (por 10 segundos) para la extracción de formazán en muestras oceánicas superficiales (60 mL) que fueron procesadas de acuerdo a los pasos 1 a 5 del método ETS_{vivo}. Se realizó la corrección de la línea base espectral para calcular F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

En la Figura 10 se muestra la comparación de los espectros de absorbancia medidos en espectrofotómetro después de utilizar ambos homogeneizadores y corregidos por la línea base espectral; para las muestras procesadas con *Beadbeater* se obtuvo una absorbancia promedio de 0.029 ± 0.006 mientras que para las muestras procesadas con vórtex se obtuvo una absorbancia promedio de 0.039 ± 0.006 a una longitud de onda de 485 nm.

Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *Mann-Whitney* para la comparación de los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] calculados con ambas absorbancias para ambos homogeneizadores; se demostró que sí existe diferencia significativa ($P=0.0159$, 0.05) al utilizar los homogeneizadores para llevar a cabo la extracción de formazán. La utilización del agitador tipo vórtex produjo una mayor concentración de formazán ($2.44 \pm 0.35 \mu\text{mol L}^{-1}$) que el homogeneizador *Beadbeater* ($1.72 \pm 0.40 \mu\text{mol L}^{-1}$) como se muestra en la Figura 10. Sin embargo, esta diferencia es atribuida a un alto esparcimiento de la luz producido por las partículas suspendidas generadas al utilizar el agitador tipo vórtex.

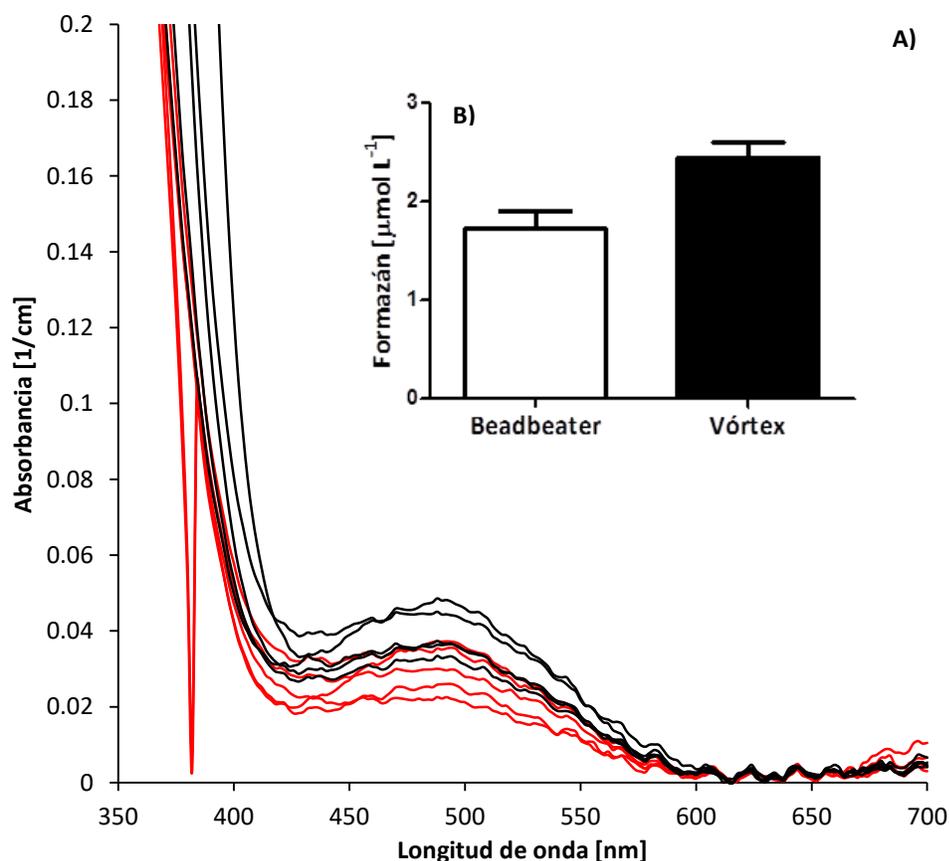


Figura 10. A) Comparación de los espectros de absorbancia de muestras oceánicas superficiales incubadas con INT y procesadas con *Beadbeater* (rojo) y agitador vórtex (negro) para la extracción de formazán. B) Comparación de los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] calculados para ambos homogeneizadores, $n=5$.

3.2 Cuantificación de formazán (F , $\mu\text{mol L}^{-1}$)

El paso 7 del método ETS_{vivo} de referencia establece la medición de la absorbancia del formazán disuelto a 485 nm por medio de un espectrofotómetro convencional de 2 haces de luz (Perkin Elmer Lambda 40) con celda de 1 cm y/o con un sistema de celdas de flujo continuo y fibra óptica (OceanOptics) con celda de 10 cm. A continuación para la cuantificación de formazán en el paso 8, se prosigue a realizar la interpretación espectral del formazán y de los componentes presentes en la medición de las muestras de procariontes marinos que fueron procesadas con el método estipulado.

3.2.1 Medición de la señal de formazán con espectrofotómetro y sistema óptico

i. Ruido de instrumentos

Con el fin de determinar el límite de detección de los instrumentos empleados en la medición de absorbancia de formazán a 485 nm se realizaron una serie de mediciones con el espectrofotómetro en primer lugar. Se registraron en las longitudes de onda de 350 a 700 nm múltiples espectros de absorbancia sin muestra, sin celda de 1 cm (vacío) y se utilizó la celda con propanol como blanco. Con los espectros registrados se calculó la desviación estándar de las muestras (3.21×10^{-4} para 485 nm). Con este valor se estableció que la señal significativa de formazán que es posible distinguir del ruido del aparato (cinco veces la desviación estándar) refiere a un valor de absorbancia de 1.60×10^{-3} para 485 nm que equivale a una concentración de formazán de $0.12 \mu\text{mol L}^{-1}$ para una muestra de 80 mL (Figura 11).

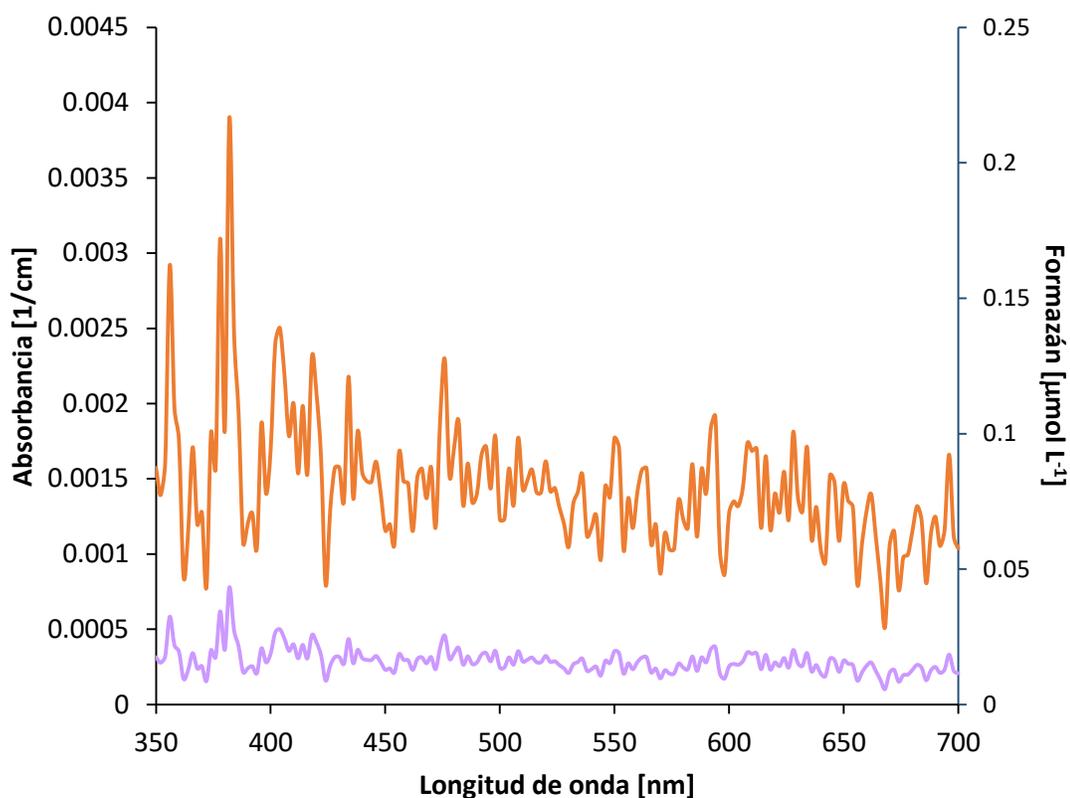


Figura 11. Límite de detección del espectrofotómetro: espectro del ruido del instrumento (morado) y señal de absorbancia significativa de formazán esperada en la muestra (naranja, $n=5$).

De la misma forma, se realizó una serie de mediciones de transmitancia con el sistema de fibra óptica Ocean Optics con dos diferentes lámparas: Ocean Optics LS-1 (lámpara halógeno) y Ocean Optics DH-2000-BAL (combinación de lámparas de halógeno con deuterio) para obtener el espectro de absorbancia del blanco de propanol sin muestra marina en las longitudes de onda de 350 a 700 nm. Los valores de absorbancia se calcularon mediante la ley de Lambert-Beer-Bouger (ecuación 2) y fueron divididos entre 10 cm para llegar a las unidades de 1/cm.

Con los espectros muestra obtenidos se calculó la desviación estándar de las muestras (Figura 12) donde se obtuvo un valor de 4.54×10^{-4} para la lámpara LS-1 y una desviación estándar de 1.22×10^{-3} para lámpara DH-2000-BAL en la longitud de onda de 485 nm. En la Figura 12 se observa que la dispersión de los datos espectrales es menor con la lámpara DH-2000-BAL que con la lámpara LS-1 entre los 450 y 550 nm, además con estas lámparas combinadas con deuterio es posible detectar un mayor rango de absorbancia. Se estimó que el límite de detección del sistema Ocean Optics con la lámpara LS-1 debe ser una absorbancia de por lo menos de un valor de 2.27×10^{-3} que equivale a $0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de formazán mientras que para la lámpara DH-2000-BAL corresponde a un valor de absorbancia de 6.08×10^{-3} y a una concentración de $1.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de formazán; lo que equivale a cinco veces la desviación estándar como la señal significativa de la muestra que es posible distinguir en el sistema óptico.

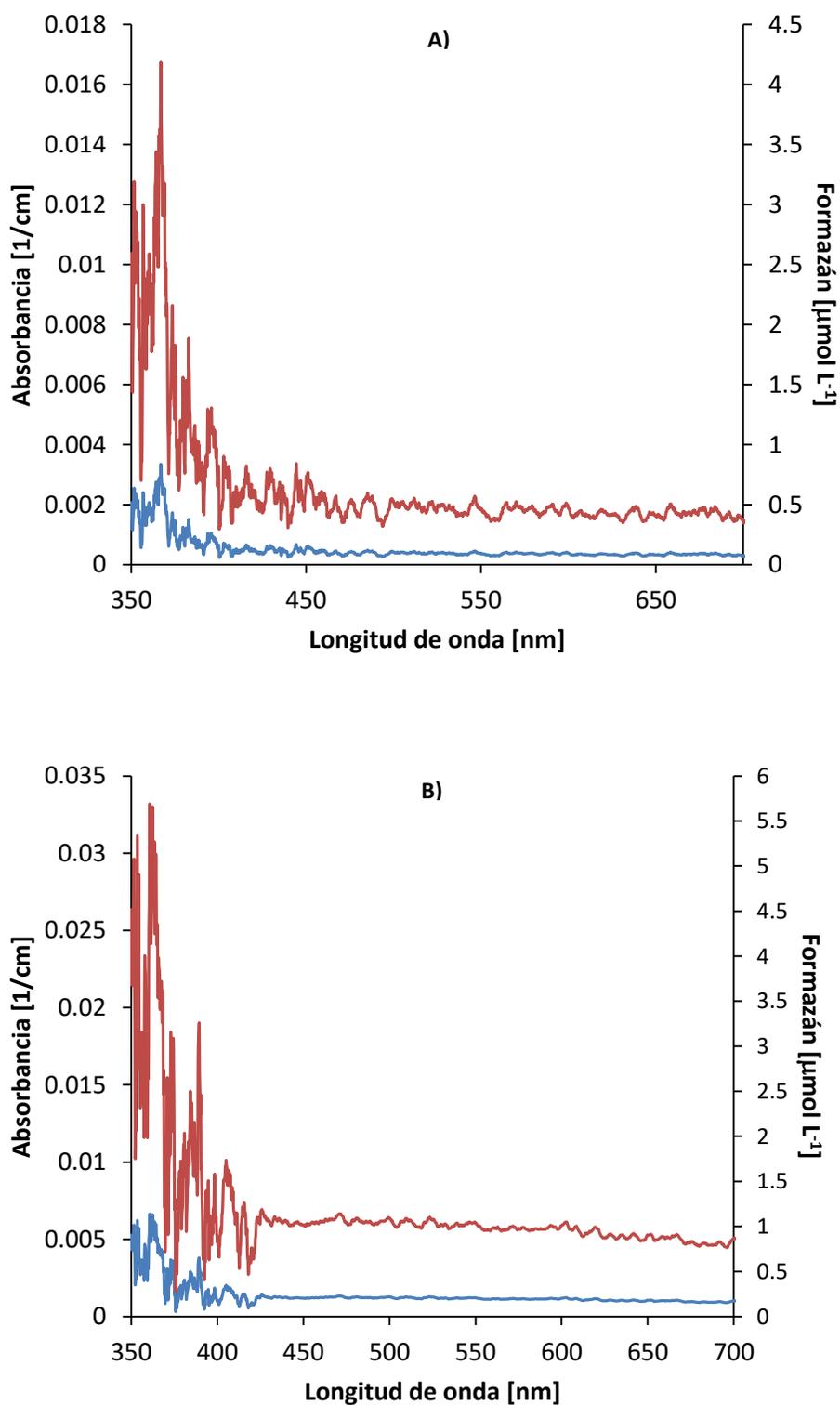


Figura 12. Espectros de propanol sin muestra para determinar el límite de detección del sistema Ocean Optics con dos diferentes lámparas y su equivalencia en F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]: A) Lámpara LS-1 B) Lámpara DH-2000-BAL. En rojo se muestra la señal significativa que se espera detectar ($n=5$) y en azul se muestra el espectro medido del ruido del instrumento.

ii. Comparación de la medición de absorbancia de formazán entre instrumentos.

Las muestras de los experimentos descritos en el presente proyecto fueron medidas por ambos radiómetros con el fin de comparar los valores de absorbancia de formazán registrados. Se realizó una correlación entre las mediciones de absorbancia efectuadas con el espectrofotómetro y con el sistema Ocean Optics (Figura 13). Después de corregir por los diferentes largos de las celdas ópticas y por la línea base, las pendientes entre ambas mediciones con duplicados de muestras no resultaron con pendiente de 1.0 como se espera por la ley de Lambert-Beer.

Se encontró una buena relación en las mediciones de absorbancia para los estándares de formazán con $r^2=0.99$ y para las muestras de bacterias marinas incubadas con INT $r^2=0.87$ (sin tomar en cuenta los valores atípicos). Sin embargo, existe una subestimación de la absorbancia por parte del sistema Ocean Optics en relación al espectrofotómetro como se muestra en la Figura 13. La relación de los valores de absorbancia de las muestras no son cercanos a lo esperado (0.24x) como la relación de los estándares (0.84x) debido a que se realizó una dilución 1:20 en los estándares y 1:5 en las muestras procariotas para evitar la saturación de la celda de 10 cm con formazán durante la medición con el sistema de fibra óptica.

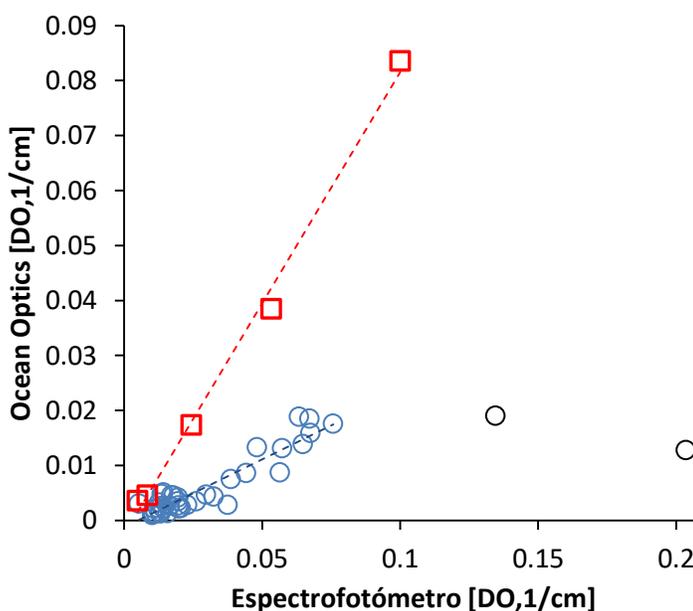


Figura 13. Comparación de absorbancia [1/cm] de los estándares de formazán (cuadros rojos, $y=0.84x-0.0025$, $r^2=0.99$, $n=5$) y en muestras oceánicas incubadas con INT (círculos azules, $y=0.24x-0.0012$, $r^2=0.87$, $n=50$) entre ambos instrumentos. Los valores atípicos (círculos negros) forman parte del juego de datos de las muestras marinas.

Durante las mediciones con el sistema de fibra óptica se detectaron cambios con tiempo en la transmitancia de la celda. Las mediciones de propanol como referencia de 100% de transmitancia, durante un periodo de 6 horas, tenían un valor promedio de 4037.7 con 82.61 de desviación estándar. Después como se observa en la Figura 14 los valores disminuyeron, probablemente como resultado de una contaminación de la celda de acero inoxidable de 10 cm o de sus ventanas al inyectar la muestra que no se logró eliminar posteriormente con múltiples enjuagues de la celda. (Figura 14). Para los cálculos de absorbancia de las muestras se utilizaron los valores de propanol más cercanos a la medición de cada muestra. Después se cambió la celda de 10cm a una celda de plástico (PEEK, *PolyEther Ether Ketone*).

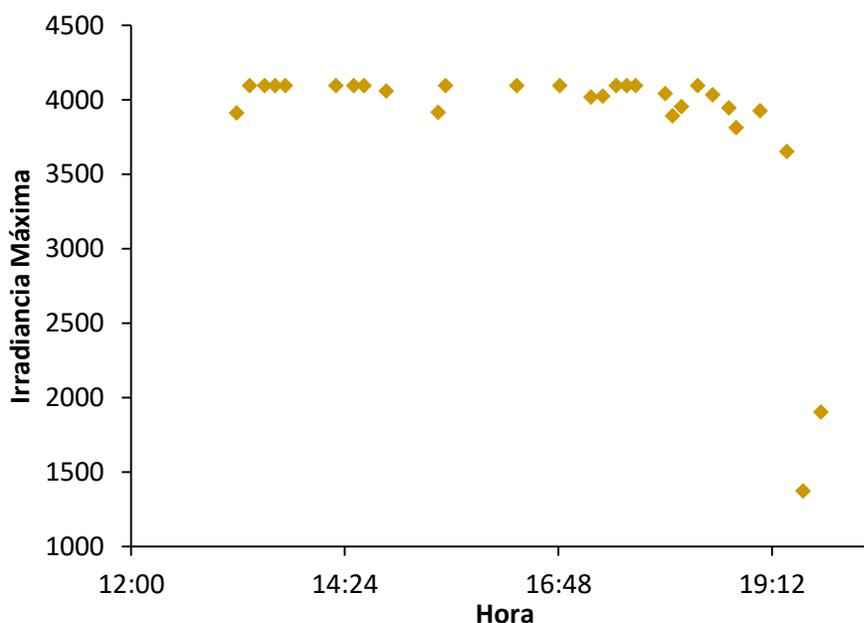


Figura 14. Medición de la señal de irradiancia de propanol obtenida con el sistema Ocean Optics.

Finalmente, otra de las pruebas que se realizó con el radiómetro Ocean Optics fue la comparación de los espectros de los estándares de formazán diluídos 1:20 y medidos con las dos lámparas de distinta intensidad: Ocean Optics LS-1 (lámpara halógeno) y Ocean Optics DH-2000-BAL (combinación de lámparas de halógeno con deuterio). De acuerdo al espectro de absorbancia calculado, en la Figura 15 se observa que existe mayor ruido en el espectro de 350 a 400 nm con la lámpara de mayor intensidad y con la lámpara de menor intensidad de luz el espectro de formazán está mejor definido en dichas longitudes de onda.

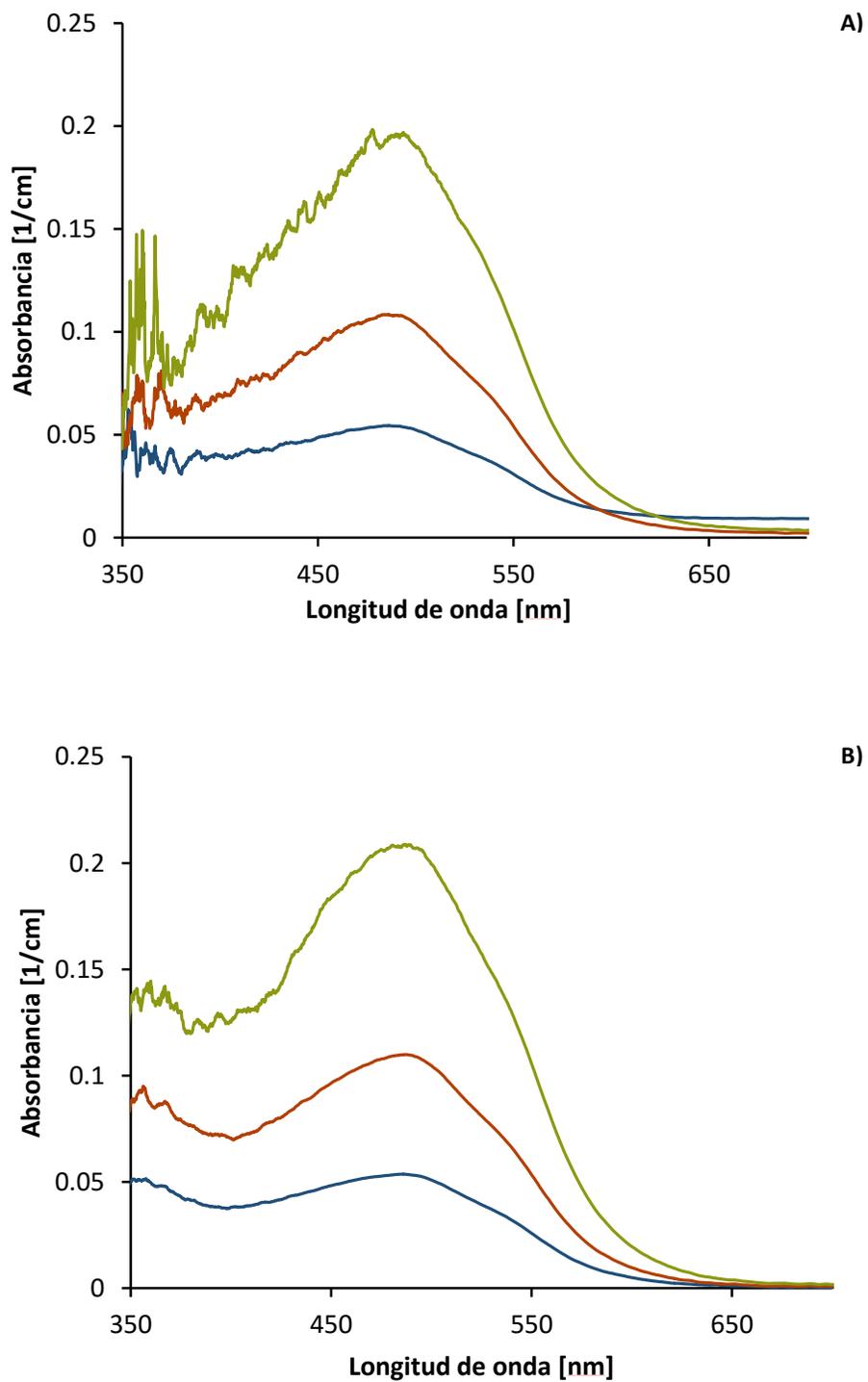


Figura 15. Medición espectral de absorbancia de soluciones estándar de formazán diluidas $93.75 \mu\text{M}$ (verde), $46.87 \mu\text{M}$ (rojo) y $23.43 \mu\text{M}$ (azul) con lámparas de distinta intensidad acopladas al Sistema Ocean Optics. A) Lámpara LS-1. B) Lámpara DH-2000-BAL.

iii. Constancia del coeficiente de absortividad molar (ϵ)

Las determinaciones cuantitativas de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] se realizaron mediante curvas de calibración con soluciones de formazán con concentraciones conocidas medidas en espectrofotómetro y sistema Ocean Optics y con la corrección de la línea base. Se analizó la constancia de la forma espectral del coeficiente de absortividad molar (ϵ) del formazán al realizar un promedio de todos los espectros de los estándares del mismo medidos en el presente proyecto. El máximo de absorbancia del formazán se detectó entre 480 y 485 nm de longitud de onda y una cresta de menor altura a los 350 nm (en espectrofotómetro y Ocean Optics) como se observa en la Figura 16. Además, se observa que el espectro de formazán presenta mayor ruido hacia la longitud de 350 nm con el sistema de fibra óptica Ocean Optics con lámpara LS-1.

Debido a que no se encontró literatura existente, el cálculo correspondiente a la ϵ del formazán disuelto en isopropanol resultó en $530 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para las mediciones con espectrofotómetro mientras que para las mediciones con sistema Ocean Optics el coeficiente fue $488 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ de acuerdo a la Figura 16. Sin embargo Green y Narahara en 1980 reportaron un coeficiente de absortividad molar igual a 20 en 95% de alcohol; la diferencia entre las estimaciones de ϵ realizadas podrían estar relacionadas con el potencial de reducción del agua que afecta en la medición de la absorbancia del formazán.

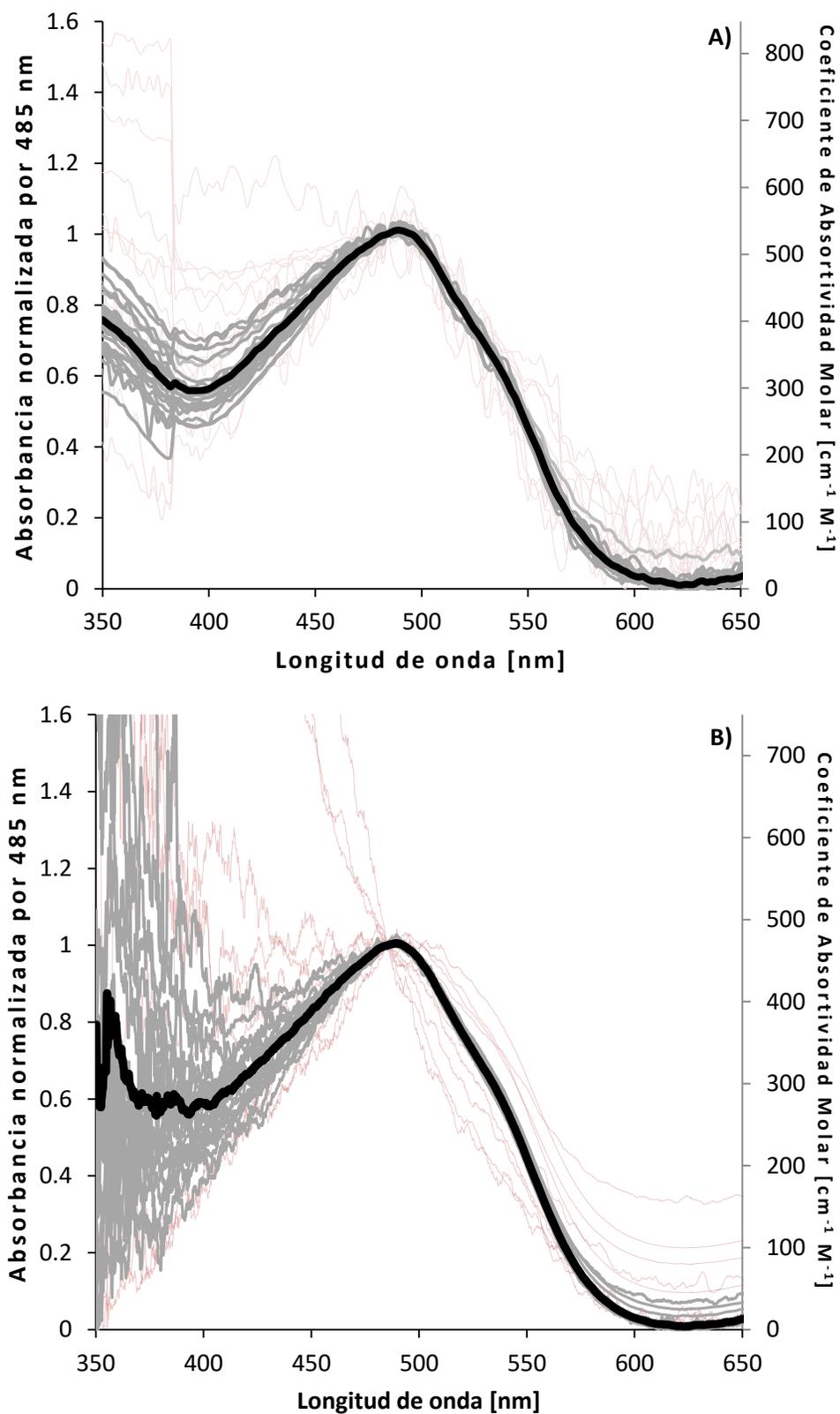


Figura 16. Forma espectral del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de formazán para las mediciones realizadas con estándares en A) espectrofotómetro (n=28) y B) Ocean Optics con lámpara LS-1 (n=23). En gris se muestran los datos utilizados para calcular el espectro promedio de formazán (negro) y en rojo los espectros no considerados.

3.2.2 Procesamiento de datos e interpretación de espectros

i. Corrección de la línea base

Con respecto al procesamiento de datos para las mediciones de absorbancia efectuadas en los experimentos descritos se implementó un algoritmo para corregir el pico de absorción del formazán donde se resta una línea base estimada de forma individual para el espectro de cada muestra (390nm – 700nm). Se compararon tres formas diferentes de corrección espectral contra los datos obtenidos directamente de la medición con espectrofotómetro (Originales) con estándares de formazán:

- a) Corrección MATLAB: Se recalcula el valor máximo de absorción a 485 nm de formazán y se calcula F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. Se seleccionan los datos de absorbancia de la región cercana a los 400 nm y 600 nm del espectro medido y se calcula la línea base como la suma de una pendiente lineal decreciente y una función exponencial negativa como se indica en la ecuación 5. Donde a corresponde al intercepto lineal a 380 nm, b es el intercepto a 380 nm de la función exponencial decreciente y c es el exponente negativo. El valor de absorbancia de formazán a 485 nm se obtiene de la diferencia entre los datos de absorbancia medidos y la línea base calculada.

$$y = a + \frac{a(374-x)}{(700-374)} + b^{-c(x-374)} \quad (5)$$

- b) Corrección 600 – 700 nm: Se realiza un promedio con los valores de absorbancia entre los 600 a 700 nm y se resta el valor calculado a todo el espectro medido. Prácticamente, se resta esta línea base del valor experimental de absorbancia a 485 nm y se calcula F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].
- c) Corrección Pendiente: Se realiza una regresión lineal con los valores de absorbancia entre los 600 a 650 nm y se resta el valor calculado de la pendiente (línea base) a todo el espectro medido. Se utiliza el nuevo valor de absorbancia a 485 nm y se calcula F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

En la Figura 17 se presentan los datos de absorbancia (cm^{-1}) y F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] sin y con la corrección basada en la línea base espectral individual de los estándares de formazán que se utilizan para establecer la curva de calibración. De acuerdo a la Figura 17, los picos máximos de absorbancia a 485 nm corregidos por la línea base espectral con la resta de la pendiente ($r^2=0.9977$) mejoran la correlación entre los duplicados de las muestras medidas con el espectrofotómetro. La pendiente en las regresiones debe tener relación con la absorbancia molar específica antes calculada.

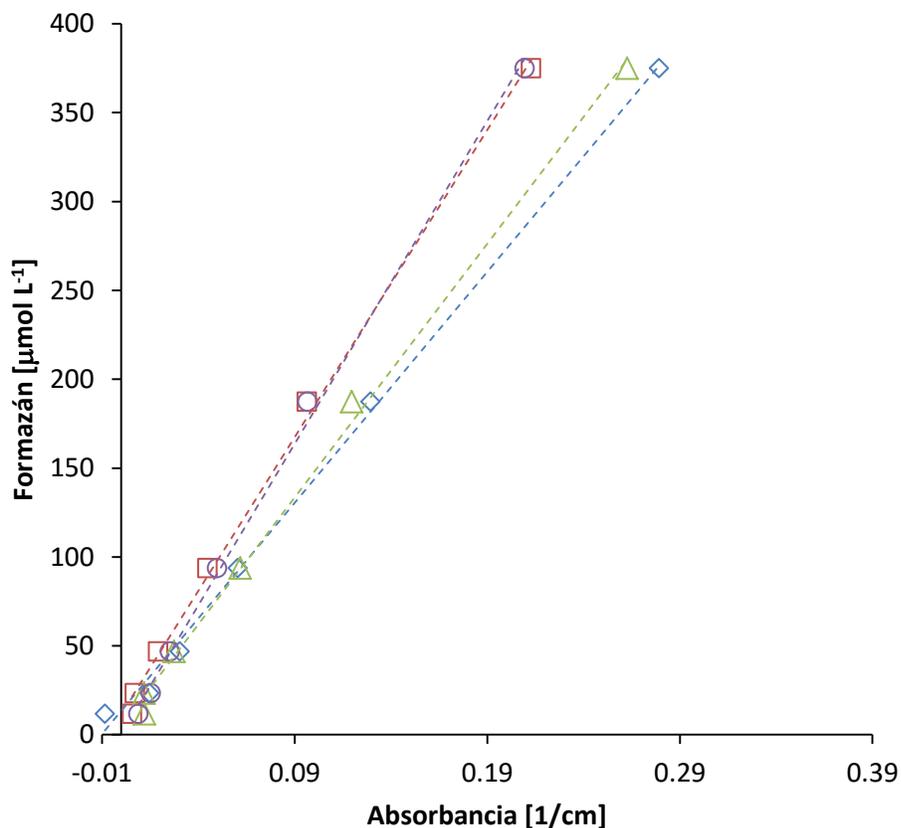


Figura 17. Comparación de los valores de absorbancia [1/cm] y F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] calculados mediante estándares de formazán sin corrección (rombos azules, $y=1300.4x+13.39$, $r^2=0.9975$) con corrección de la línea base por Matlab (cuadros rojos, $y=1730x+11.71$, $r^2=0.9977$), con promedio de 600 a 700 nm (triángulos verdes, $1427.9x+5.04$, $r^2=0.9971$) y con pendiente (círculos morados, $y=1816.2x+0.24$, $r^2=0.9977$), $n=6$.

ii. Traslape óptico de espectros

El análisis espectral de las muestras consistió en identificar los factores sistemáticos del método ETS_{vivo} que proporcionan un aumento a la señal de absorbancia de formazán a los 485 nm. Se evaluó el espectro de absorbancia del uso de materiales y reactivos del método (tipo de filtros, *Beadbeater*, isopropanol e INT), así como algunos factores abióticos de la muestra marina (sustancia X y materia orgánica disuelta).

a) Espectros de materiales y reactivos del método

Se comparó el espectro de absorbancia que se produce al sumergir los filtros de 0.2 μm de policarbonato y membrana *Durapore* en 1.5 mL de propanol sin muestra marina. De acuerdo a los espectros

mostrados en la Figura 18 se encontró una absorbancia promedio de $8.72 \times 10^{-4} \pm 2.16 \times 10^{-3}$ para el filtro de policarbonato, una absorbancia promedio de $3.49 \times 10^{-4} \pm 1.3 \times 10^{-3}$ para el filtro de membrana *Durapore* que son valores comparables con la absorbancia promedio del propanol ($-3.74 \times 10^{-4} \pm 1.24 \times 10^{-3}$). Por lo tanto, no se encontró ningún aporte significativo a la señal de absorbancia a los 485 nm por parte de ambos filtros. Se calculó la desviación estándar de los promedios de 475 a 485 nm de todos los datos de absorbancia de la muestra blanco de propanol, filtro de policarbonato y el filtro de membrana para obtener el error de absorbancia que siempre va existir en la medición: 1.57×10^{-3} .

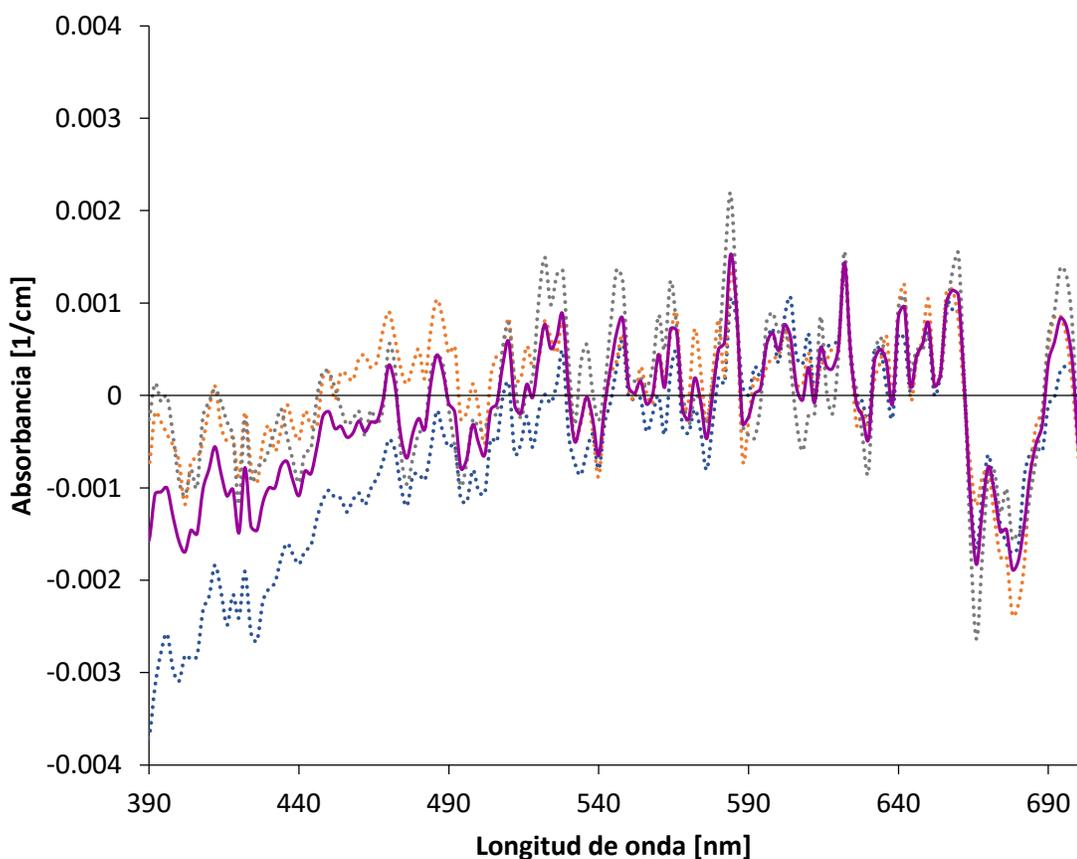


Figura 18. Espectros de absorbancia del blanco de propanol (azul, $n=2$), los filtros de policarbonato (rojo, $n=3$) y membrana (*Durapore*, verde, $n=2$) sin muestra marina sumergidos en 1.5 mL de propanol y el promedio de los espectros (morado, $n=7$). Medición en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40.

Posteriormente, se midió y corrigió por la línea base el espectro de absorbancia que se genera al utilizar el homogeneizador *Beadbeater* con filtros de $0.2 \mu\text{m}$ de policarbonato y membrana *Durapore* en tubos con perlas de zirconio y 1.5 mL de propanol sin muestra de bacterias marinas. El filtro de policarbonato

después del uso del homogeneizador *Beadbeater* aumentó su absorbancia (1/cm) de $6.7 \times 10^{-3} \pm 7.85 \times 10^{-3}$ a $1.57 \times 10^{-2} \pm 2.08 \times 10^{-3}$; mientras que la absorbancia del filtro de membrana cambió de $5.55 \times 10^{-3} \pm 3.98 \times 10^{-3}$ a $5.17 \times 10^{-3} \pm 1.13 \times 10^{-3}$ al contrario de cómo ocurrió con el filtro de policarbonato de acuerdo a la Figura 19.

El uso del homogeneizador *Beadbeater* con los filtros de policarbonato que el método ETS_{vivo} utiliza, promueve la liberación de partículas por desintegración de las perlas de zirconio y estos fragmentos aumentan el esparcimiento de luz en la región azul y aumentan potencialmente el pico de absorbancia del formazán como se observa en la Figura 19 y una sobreestimación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$].

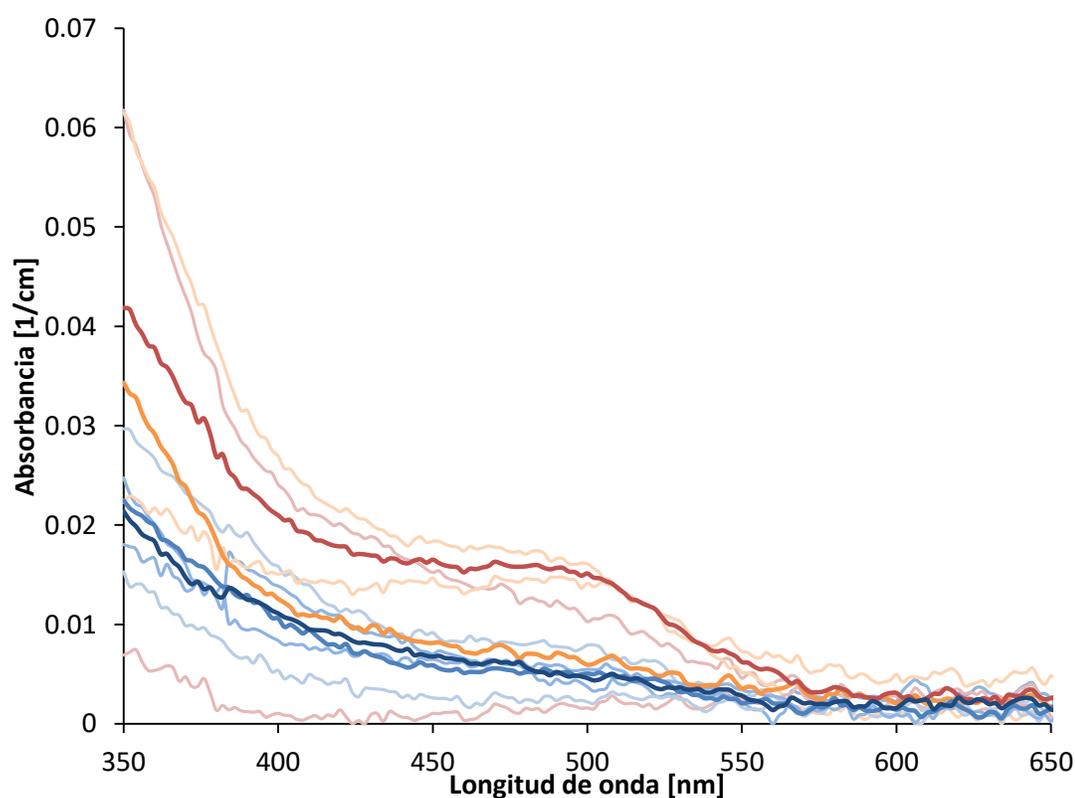


Figura 19. Espectros promedio de absorbancias de dos diferentes tipos de filtro de $0.2 \mu\text{m}$ sin muestra marina y procesados con propanol antes (filtro policarbonato, naranja; filtro membrana, azul claro) y después de homogeneizar con *Beadbeater* (filtro policarbonato, rojo; filtro membrana, azul marino) medidos en espectrofotómetro, $n=2$.

Finalmente, se observó que los espectros de absorbancia de las muestras incubadas con INT presentan una forma espectral de ϵ más alta a la esperada en la región azul del espectro electromagnético para el

formazán (Figura 20). En consecuencia se evaluó el espectro de absorción del INT tanto disuelto en agua destilada con cloruro de sodio ($H_2O + NaCl$), disuelto en propanol como posterior a un enjuague con agua destilada. En la Figura 20 se observa que el espectro de absorbancia para ambos casos es muy alto en la absorbancia azul; esto implica que si el INT no es reducido por completo en la muestra, existe un aumento en la absorbancia de esta región y por lo tanto una sobreestimación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. Sin embargo, la absorbancia en el espectro azul disminuye de 0.05 a 0.03 al realizar un enjuague con agua destilada de la muestra marina incubada con INT como se observa en la Figura 20.

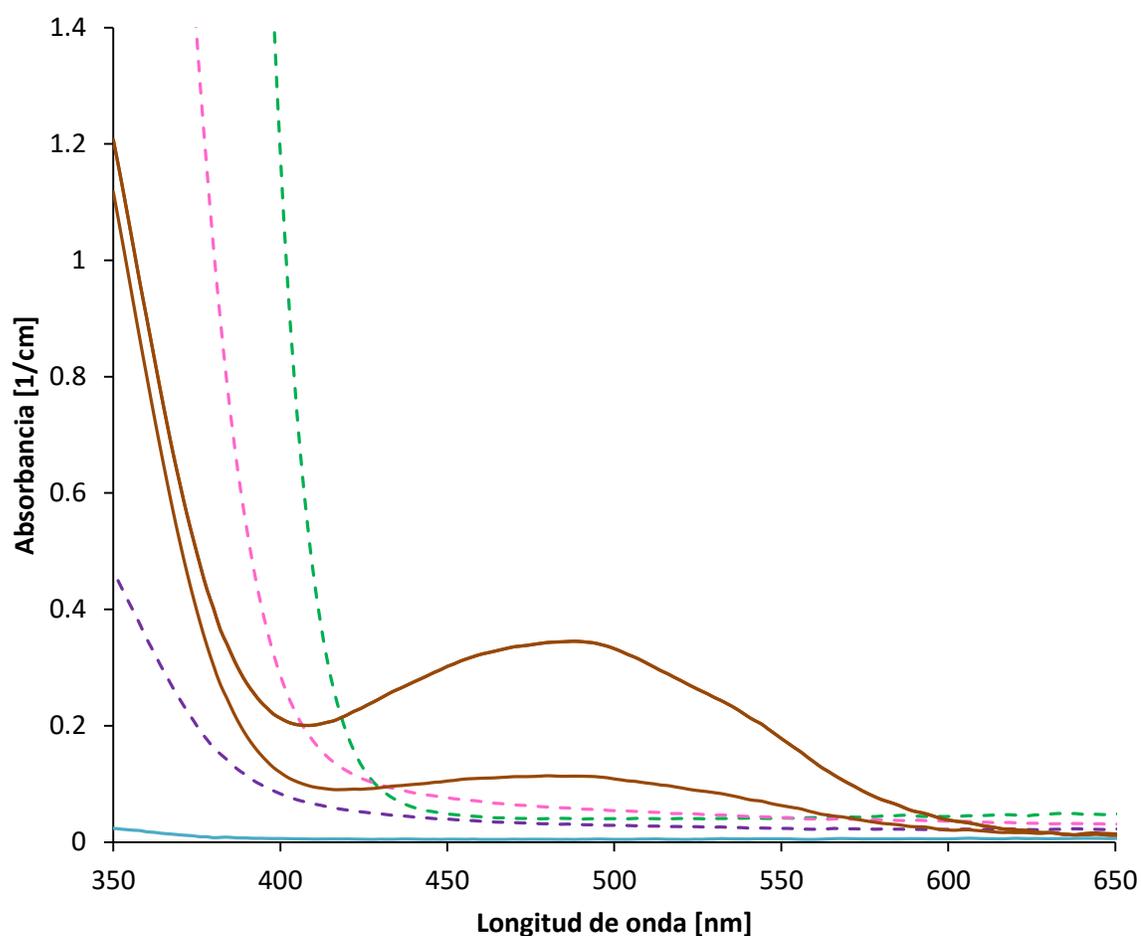


Figura 20. Comparación de los espectros de absorción del INT disuelto en propanol (verde), disuelto en agua destilada con cloruro de sodio (rosa) y posterior a enjuague (morado) con el espectro de bacterias marinas incubadas con INT (café) y el propanol (azul) como referencia.

b) Espectros de absorción de factores abióticos de la muestra

Se decidió evaluar la señal espectral de 100 mL de muestras de bacterias marinas colectada directamente de la bahía a diferentes profundidades (0 – 800 m) procesadas de acuerdo a los pasos 1 a 7 del método ETS_{vivo} pero sin la adición de INT (paso 3). En la Figura 21 se muestra la serie de espectros medidos y corregidos por la línea base de muestras de agua de mar procesadas directamente con 1.5 mL de propanol, se observa que en promedio en el espectro hay un incremento en la absorbancia de los 350 a 500 nm donde la muestra superficial de cero metros registró la absorbancia máxima pero no se observa una tendencia clara de absorbancia conforme aumenta la profundidad; en la longitud de onda de interés (485 nm) se registró una absorbancia promedio de $1.29 \times 10^{-2} \pm 2.17 \times 10^{-3}$.

El espectro registrado corresponde a sustancias presentes en el agua de mar de entre 0.8 y 0.2 μm de tamaño y disueltas en propanol, que absorben coincidentemente en el mismo rango espectral que el formazán a 485 nm. En el presente trabajo se les denominó como “sustancia x”. Esto representa al momento de la cuantificación de formazán de las muestras de campo un aumento de la señal y una sobrestimación del valor de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] de $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 21). Por lo tanto, este resultado demuestra que existe una contribución a la señal de reducción de INT por componentes marinos que debe ser considerado en la interpretación adecuada del método ETS_{vivo}.

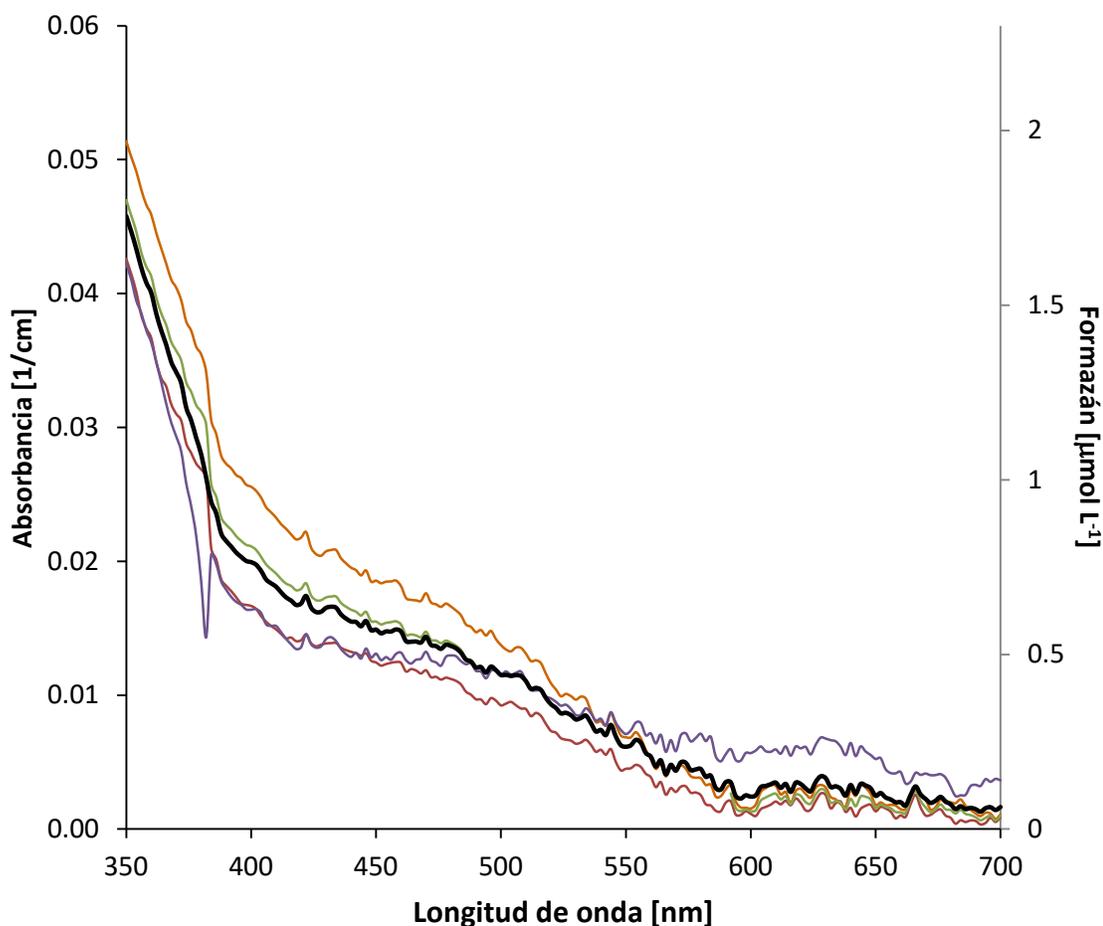


Figura 21. Espectros promedio de muestras de agua de mar de la bahía de 0 m (naranja, n=21), 2 m (rojo, n=10), 8 m (verde, n=2) y de 500 a 800 m (morado, n=6) de profundidad procesadas con propanol de acuerdo al método ETS_{vivo}. La 2ª ordenada muestra el equivalente aproximado en unidades de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. En negro se muestra el espectro promedio calculado para todas las muestras, n=39.

Las muestras de la Figura 21 también presentan diferentes concentraciones de clorofila. De acuerdo a la Figura 22, no se encontró una correlación ($r^2=0.35$) con las concentraciones de clorofila medidas para cada profundidad. No se observa clorofila a en el espectro y hay señal en las muestras profundas donde se espera la ausencia de organismo autotróficos. Las muestras medidas corresponden a pico y nanoplancton.

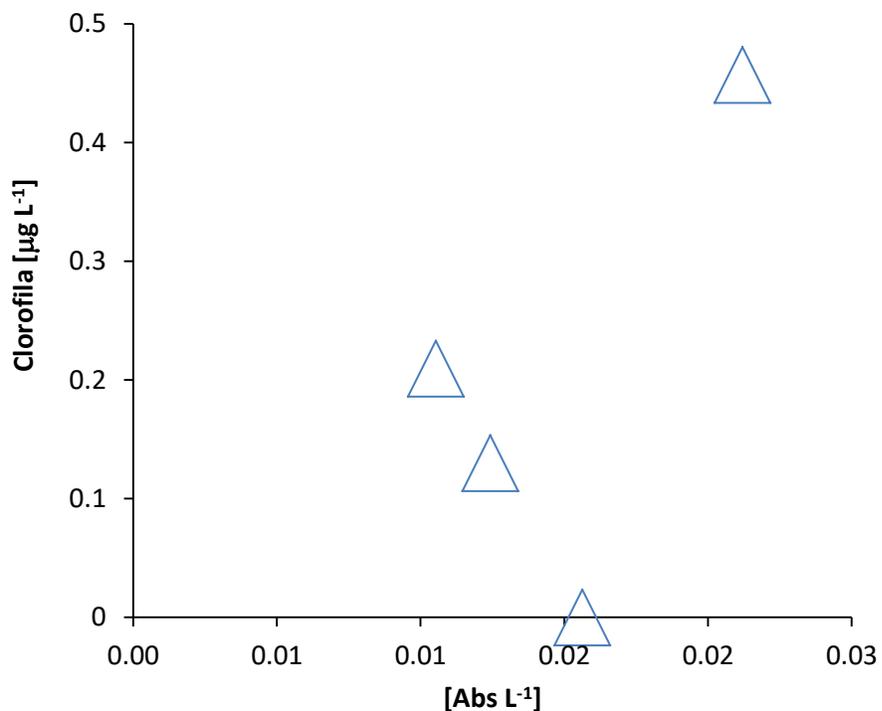


Figura 22. Comparación entre la concentración de clorofila y la absorbancia de las muestras marinas sin incubación de INT provenientes de diferentes profundidades, no se encontró una correlación entre las muestras ($r^2=0.35$, $n=4$).

Otra prueba que se realizó fue comparar si el volumen de muestra marina sin incubación de INT tiene un efecto en la lectura de absorbancia de formazán en los 485 nm. Se compararon 40, 80 y 120 mL de muestra de agua marina superficial sin incubación con INT y pre-filtrada por 0.8 µm como el método indica. De acuerdo a la Figura 23, no existe una correlación ($r^2=0.12$) entre el volumen de agua marina filtrado y procesada con propanol con la absorbancia medida.

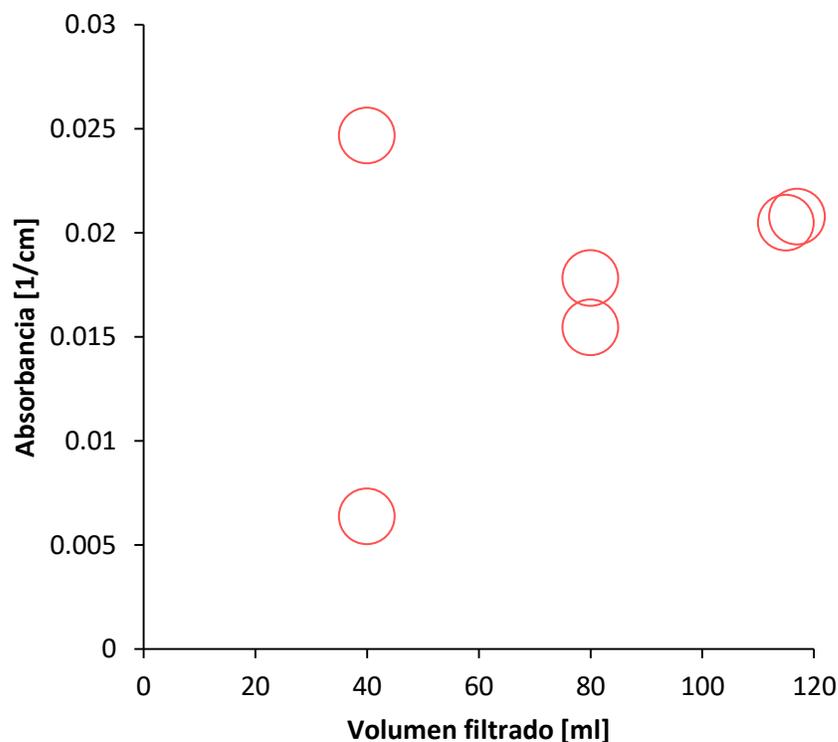


Figura 23. Comparación entre el volumen de agua marino filtrado por 0.8 μm y procesado con propanol con la absorbancia registrada para cada una de las muestras marinas, no se encontró una correlación entre las variables ($r^2=0.12$, $n=6$).

La reducción del compuesto de INT no es específica, por lo tanto se evaluó la reducción de la sal de tetrazolio por DOM presente en el agua de la muestra. La prueba consistió en filtrar la fracción procariota proveniente de la bahía por un filtro de 0.22 μm para dejar pasar únicamente material disuelto e incubarlas con INT por una hora. Las muestras se procesaron posteriormente de acuerdo al método ETS_{vivo}: se extrajo el formazán en 1.5 mL de propanol, se realizó la medición de la absorción de formazán a 485 nm en espectrofotómetro y la corrección de la línea base. La concentración de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en ambos tipos de muestra (bacterias y DOM) se calculó mediante una curva de calibración con estándares de formazán.

En la Figura 24 se muestra la comparación del valor de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] producido por la reducción de INT en muestras de material extracelular y en muestras de bacterias marinas. Se obtuvo una reducción importante de la sal de tetrazolio en la muestra con material extracelular menor a 0.22 μm con valores

cercanos a 2 μM pero no se encontró una correlación entre el formazán formado por DOM y por los procariontes ($r^2=0.31$). Sin embargo, de acuerdo a la Figura 24 la resta del valor de formazán de las muestras de materia extracelular a las muestras bacterianas produciría valores negativos de F para el conjunto de datos que se encuentran por arriba de la pendiente 1 a 1.

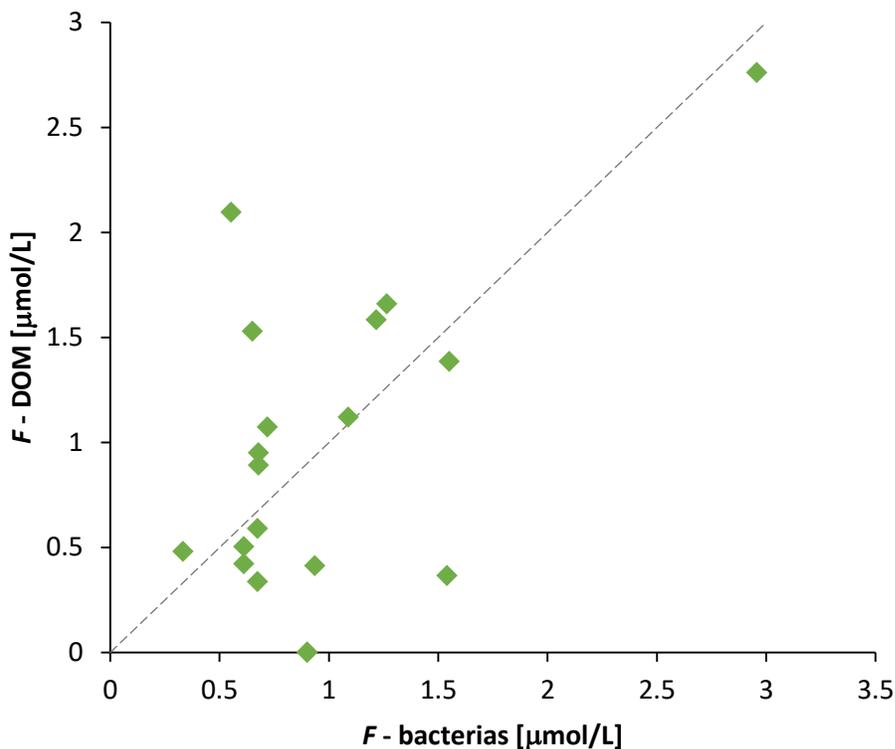


Figura 24. Comparación de la reducción de INT entre la materia orgánica extracelular y muestras de bacterias marinas provenientes de la bahía, $n=38$. La línea gris corresponde a una pendiente teórica 1/1.

De igual forma se realizó una serie de tiempo de la reducción de INT por DOM. La muestra de agua de mar costera fue pre-filtrada por filtro de policarbonato de 1 μm y posteriormente por 0.2 μm e incubado por INT. A distintos tiempos durante la incubación de la muestra por INT se filtró por filtros de policarbonato de 0.2 μm para coleccionar el formazán producido. Se midió la absorbancia y se realizó la corrección de la línea base para el cálculo de F . La prueba resultó en la reducción de INT desde el inicio de la incubación y tiende a aumentar la concentración de formazán en la muestra de material menor a 0.2 μm (Figura 25). Se observa que después de una hora de incubación con INT, la muestra de MOD tiene

un valor de F de $1.12 \mu\text{mol L}^{-1}$, cual resulta ligeramente mayor al valor de $1.08 \mu\text{mol L}^{-1}$ de las muestras procariotas.

Sin embargo, este resultado puede ser un artefacto porque al filtrar las muestras por $0.22 \mu\text{m}$ antes de la incubación con INT posiblemente se ha provocado un rompimiento de células y la liberación del material reductor celular que provoca la inmediata reducción de la sal de tetrazolio a formazán.

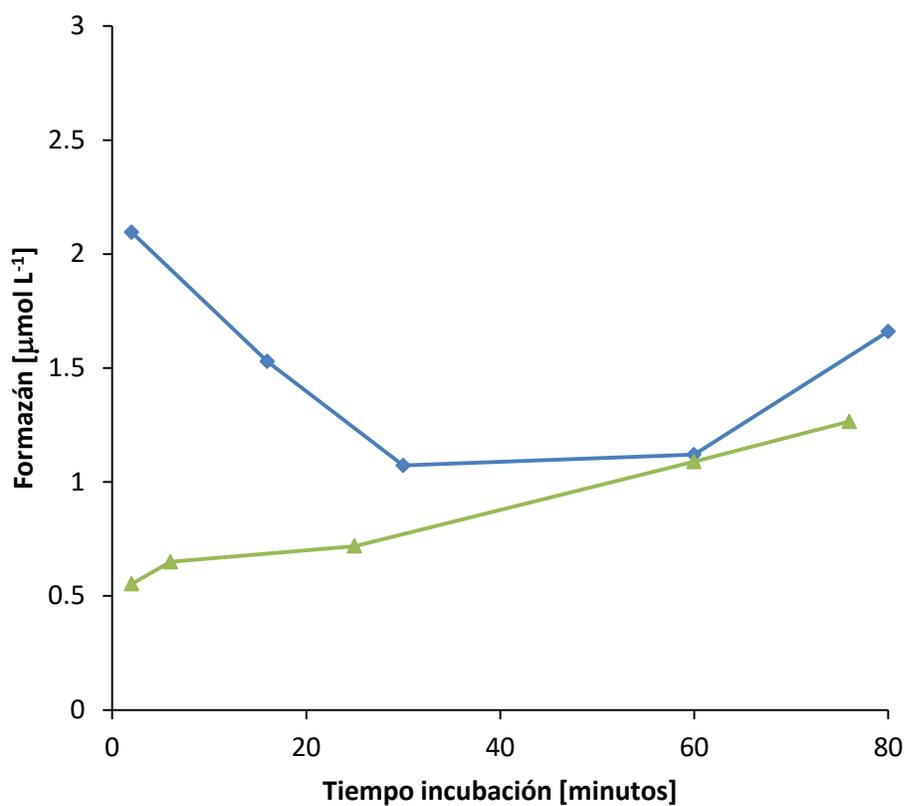


Figura 25. Serie de tiempo de la reducción de INT por la materia orgánica disuelta (azul) y una comunidad de bacterias marinas (verde) colectadas en la bahía.

3.3 Bioensayos *F* vs. *R*

3.3.1 Generación de las muestras de tipo blanco.

i. Efectos del formol sobre las muestras.

Una de las problemáticas que presenta el método ETS_{vivo} es el alto nivel de formazán en las muestras blanco en relación a las muestras de bacterias. Las mediciones de absorbancia de formazán en las muestras de agua de mar colectadas en los cruceros presentaron altos blancos del mismo orden de magnitud como las muestras. Como resultado la señal que es la diferencia entre muestra y blanco sale con valores ruidosos, cercanos a cero o negativos.

Se exploraron los posibles factores que promueven una mayor reducción de INT en las muestras de tipo blanco. En primer lugar se evaluó el efecto del formol sobre la medición de formazán en sub-cultivos de procariotas (S, B1, B2, R1, R2); se tomaron dos réplicas de 60 mL de muestra por cada tratamiento y fueron incubadas con INT y después de 60 minutos solo una de las réplicas fue incubada con formol por una hora. Finalmente, cada una de las réplicas fue procesada de acuerdo al protocolo evaluado en este proyecto para obtener la estimación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en 1.5 mL de isopropanol. Como resultado se obtuvo que las réplicas que no fueron incubadas con formol registraron el mayor valor de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] por lo que se infiere que el formol tiende a reducir la producción de formazán en las muestras secundariamente (Figura 26).

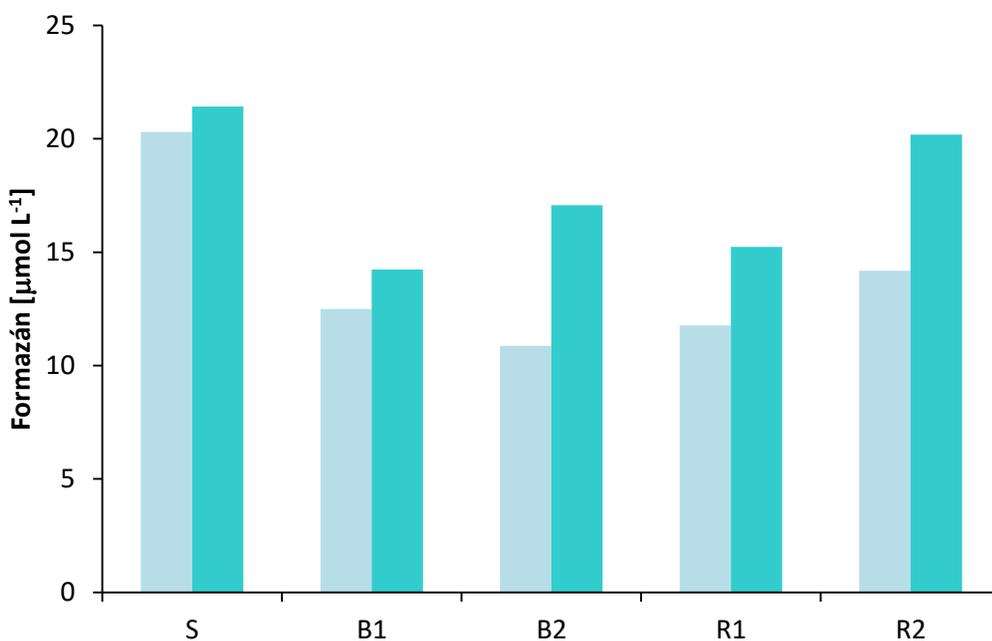


Figura 26. Duplicados de diferentes muestras de bacterias de la bahía incubados con INT y procesados para obtener F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] con el método ETS_{vivo} . En azul muestras incubadas primero con INT y después de una hora se agregó formol. En turquesa muestras incubadas únicamente con INT.

Adicionalmente, se efectuaron diferentes tratamientos con la adición de formol al 2% sin borato de sodio por una hora a la materia extracelular, a la muestra de tipo blanco y a la muestra de bacterias marinas. Se utilizaron 60 mL de agua de mar para cada tratamiento y todos fueron pre-filtrados con $0.8 \mu\text{m}$. Las muestras de materia orgánica disuelta (MOD) fueron filtradas por $0.2 \mu\text{m}$ e incubadas con INT por una hora y se les agregó formol en diferentes momentos, antes o después de la filtración por $0.2 \mu\text{m}$. La muestra de tipo blanco fue generada con la incubación de formol por 60 minutos y posteriormente procesada con INT como el método indica. De igual forma, la muestra de los procariontes fue incubada con INT y posteriormente con formol por una hora. Se realizó la corrección de la línea base del espectro registrado para la estimación de los valores de formazán.

En la Tabla 3 se presenta la comparación entre los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] obtenidos para los diferentes tratamientos de las muestras con formol al 2% sin borato de sodio. Se observa que la muestra blanco es la que tiene una mayor concentración de formazán que incluso supera la concentración en los procariontes marinos; se observa también que F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en la materia orgánica disuelta es mayor que

la muestra de procariontes cuando no es adicionada con formol. Por la tanto, el formol tiende disminuir F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en la materia orgánica disuelta.

Tabla 3. Efecto del formol en F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] producido en las muestras de materia orgánica disuelta, blancos y procariontes marinos, n=2.

Tipo de muestra	Tratamiento	Formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
MOD	Filtro 0.2 > INT	1.48 ± 0.14
MOD	Formol > Filtro 0.2 > INT	0.93 ± 0.08
MOD	Filtro 0.2>Formol>INT	1.11 ± 0.10
Blanco	Formol>INT	2.21 ± 1.34
Procariontes	INT > Formol	1.38 ± 0.23

ii. Comparación entre blancos y muestras.

Por lo anterior, se decidió evaluar el procedimiento para generar las muestras blanco. El método actual (Villegas-Mendoza, 2015) establece agregar una solución 2% final de formaldehído a la muestra y después de una hora procesar esta muestra blanco de igual forma a la propia muestra. Las pruebas se realizaron con muestras de la bahía filtradas con filtro de policarbonato de 0.8 μm y 47 mm de diámetro, adicionadas con formaldehído e incubadas posteriormente con INT por una hora como el protocolo establece. Por lo tanto, se aumentó la concentración final de formol 2% al 4% y comparar los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] entre los blancos y las muestras de bacterias marinas.

En la muestra blanco se utilizó formaldehído para matar a las bacterias e inactivar el sistema del transporte de electrones. El procesamiento consistió en agregar formol al 2% saturado con borato de sodio y después de una hora se trató esta muestra control como la propia muestra agregando INT. Se realizó la corrección de la línea base de los espectros medidos para el cálculo de F .

En general, como se muestra en la Figura 27, las muestras de campo procesadas como blancos al 2% presentan valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] prácticamente iguales a las muestras incubadas directamente con INT y posteriormente con formol lo que impide estimar de forma adecuada la señal neta de F en las muestras

marinas. Los datos de los sub-cultivos de bacterias en el laboratorio presentan una tendencia de valores mayores en las muestras que en las muestras de tipo blanco. Sin embargo, las diferencias relativas entre muestras y muestras de tipo blanco no son muy grandes: en promedio blanco/muestra ~ 0.6 .

Mientras que para las muestras blanco al 4% los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] son mayores a la concentración de formazán en todas las muestras provenientes de la costa, cultivadas en laboratorio y colectadas en la bahía como se observa en la Figura 27. El conjunto de datos de F por arriba de la pendiente son negativos al restar los blancos de las muestras.

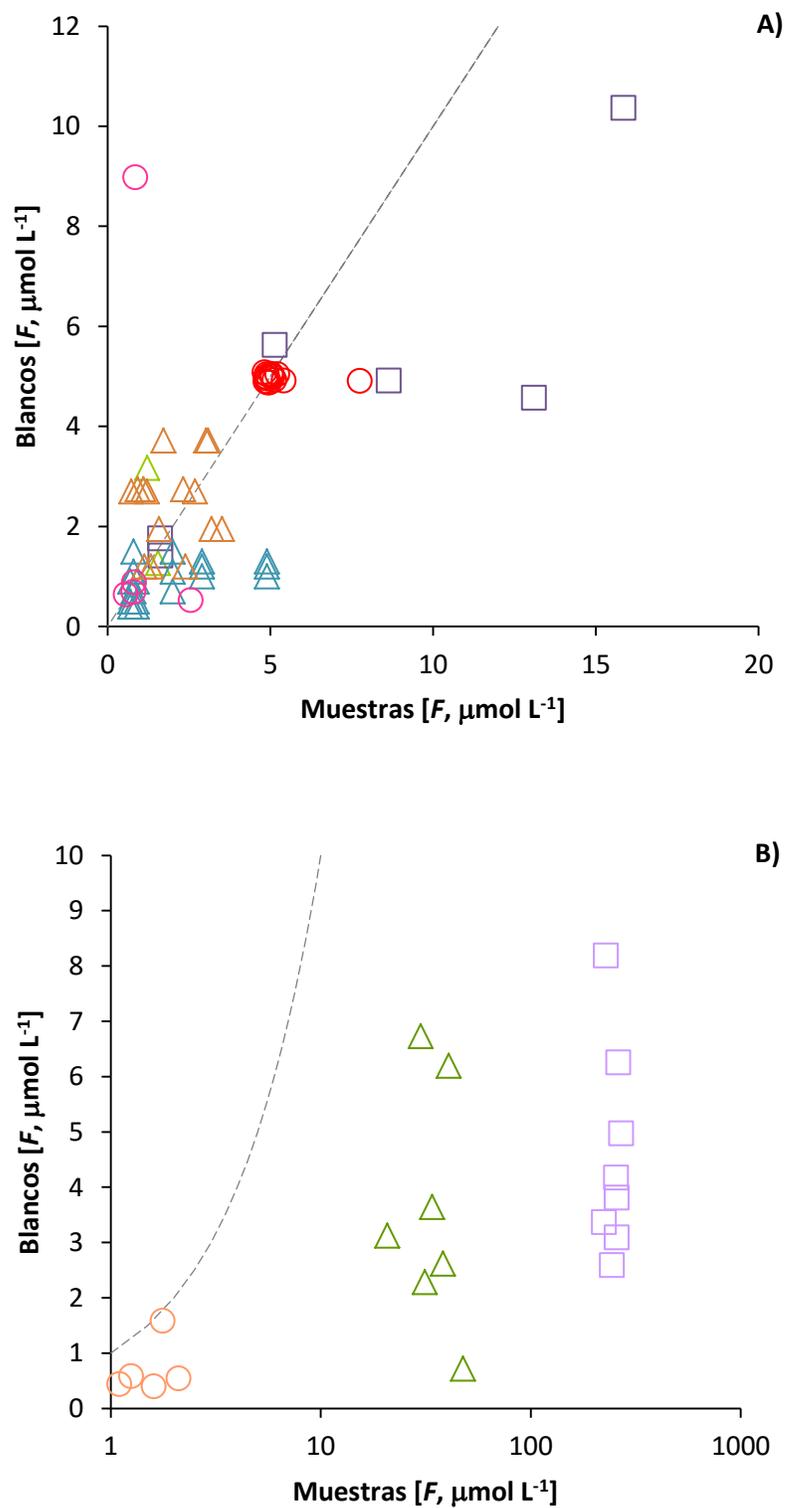


Figura 27. Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] estimado para muestras y blancos con datos de campo (triángulos), de laboratorio (cuadrados) y de crucero (círculos). A) Los blancos fueron incubados con formol al 2% con/sin borato de sodio, $n=61$. B) Los blancos se generaron con una concentración de formol al 4%, $n=20$. La línea gris corresponde a una correlación 1 a 1 entre variables.

3.3.2 Comparación de formazán con tasas de respiración de oxígeno.

La última etapa que estipula el método ETS_{vivo} (paso 9) refiere a la comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] con las tasas de consumo de oxígeno R [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] de los microbios. La evaluación consistió en llevar a cabo bioensayos que consistieron en medir la actividad respiratoria de procariontes marinos asociados a diferentes sub-cultivos de bacterias mediante incubaciones con INT como indica el método ETS_{vivo}.

Las muestras se tomaron de cultivos preparados para otro experimento y consistieron en tomar 60 – 80 mL de sub-cultivos con bacterias que previamente fueron inoculadas en cultivos asociados a fitoplancton e incubadas en un botellas que giran a 10 rpm para favorecer a la formación de polisacáridos transparentes extracelulares (TEPS) o en medio líquido sin agitación donde no se espera la formación de geles. Los experimentos consistieron en estimar F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] en cada tratamiento a través de mediciones espectrofotométricas. Simultáneamente, se utilizó un sensor tipo óptodo para medir la concentración de oxígeno disponible en el medio a través de reactivo que tiene eficiencia cuántica de fluorescencia sensible a la concentración de O_2 . Este reactivo viene en forma de parches que se pueden instalar al interior de la pared de la botella de incubación o en forma de un capilar que entra por el tapón de la botella (sensor SP-PSt3-NAU-YOP) y leído con el detector Fibox 4 (PreSens, Regensburg, Germany) para posteriormente calcular R y compararlo con F y la abundancia bacteriana.

En los experimentos efectuados se dividió el volumen de los sub-cultivos y al inicio del monitoreo del consumo de oxígeno se tomaron dos réplicas de 80 mL de tres sub-cultivos y fueron incubados con INT por una hora. Las réplicas fueron filtradas con filtros de membrana de $0.22 \mu\text{m}$ (*Durapore*) para coleccionar los cristales de formazán producto de la reducción del INT. Se realizó la disolución de formazán con 1.5 mL de isopropanol. Se obtuvieron los espectros de absorbancia con espectrofotómetro Perkin-Elmer, se registró el valor de absorbancia corregido a 485 nm, se realizó la corrección de la línea base espectral y se calculó F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] mediante una curva de calibración para compararlo con la tasa de consumo de oxígeno.

En los experimentos se seleccionaron bacterias de diferentes cultivos de diatomeas (*Thalassiosira sp.* y *Chaetoceros sp.*), colectadas en la bahía y un control de medio sin inóculo pero contaminado de bacterias (Figura 26). Las mediciones de la formación de formazán se realizaron al inicio y al final, después de 4 horas de incubación para medir la respiración de oxígeno. Los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] obtenidos por célula para cada tratamiento fueron comparados con el consumo de oxígeno monitoreado mediante el cálculo de tasas instantáneas de respiración (Figura 28); se encontró una correlación donde

las bacterias que más respiraron fueron las que más formazán produjeron de igual forma la correlación con la abundancia bacteriana demostró en general que conforme aumenta el número de células procariotas aumenta la concentración de formazán. Sin embargo, también se encontraron valores atípicos fuera de la relación esperada.

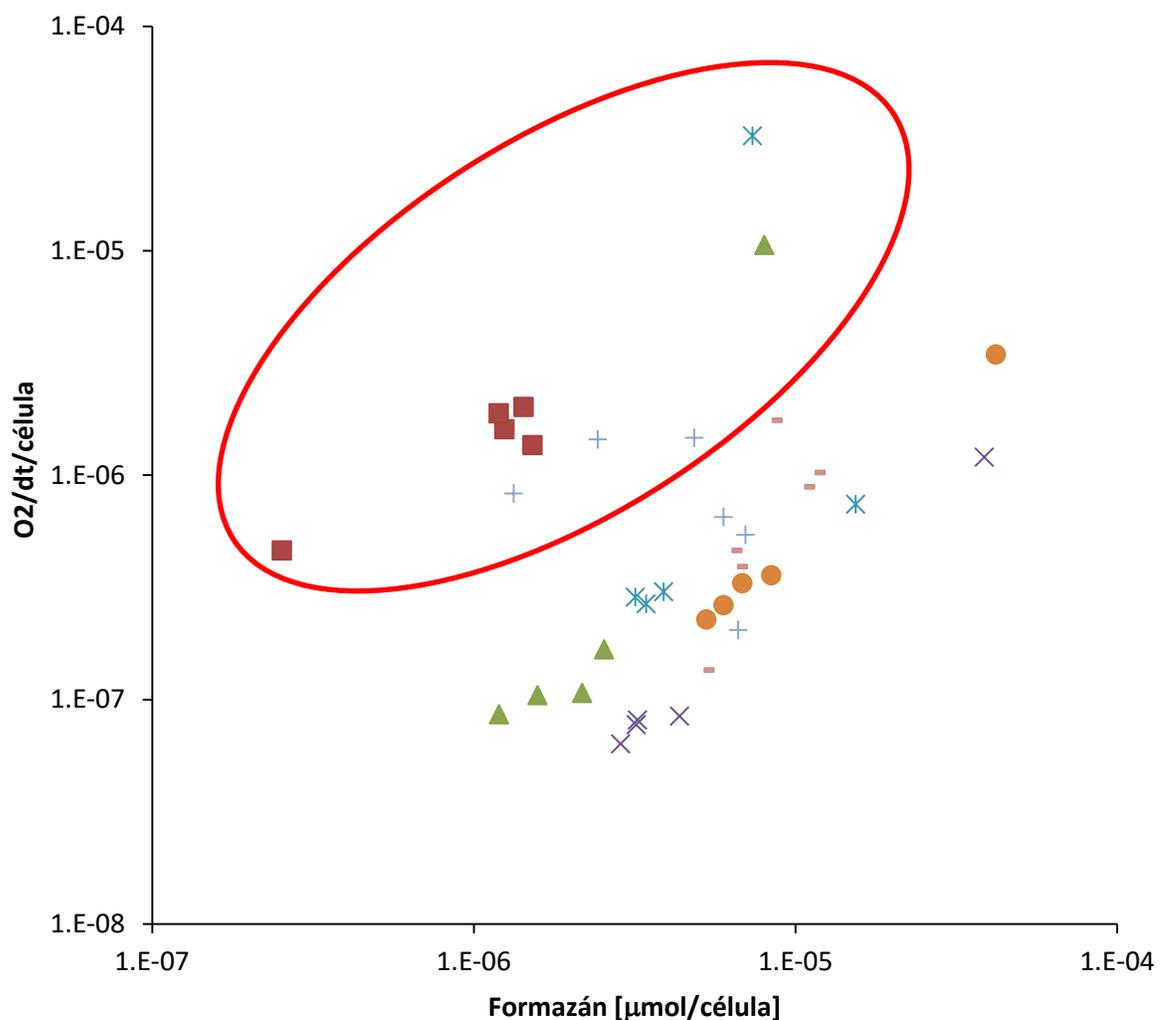


Figura 28. Comparación entre F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] y R [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] por célula calculados para los sub-cultivos procariotas en períodos de 4 horas ($n=74$). El óvalo color rojo agrupa a los datos fuera de la tendencia positiva entre F y R . La muestra de bacterias con monitoreo de O_2 e incubadas con INT provienen de: sub-cultivos de primera incubación de *Thalassiosira sp.* (cuadros y cruces), segunda incubación de *Thalassiosira sp.* (guiones) primera incubación de *Chaetoceros sp.* (triángulos), segunda incubación de *Chaetoceros sp.* (equis), primera incubación de bacterias de la bahía (asteriscos) y segunda incubación de bacterias de la bahía (círculos).

Los sub-cultivos utilizados forman parte de otro proyecto donde se investiga el impacto de los geles sobre el comportamiento fisiológico de las bacterias heterotróficas. La respiración de las muestras se midió durante un período de 48 horas aproximadamente. Al inicio y al final de la incubación para la medición de oxígeno se tomaron muestras para ETS_{vivo} . Se encontró una diferencia significativa en las pendientes y en los coeficientes de correlación entre los grupos de datos correspondientes a las mediciones al inicio y al final de las incubaciones para el monitoreo de oxígeno en los sub-cultivos procariotas. La segunda incubación con INT presenta un mayor valor de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] que la primera medición (Figura 29); esto se debe probablemente al estado fisiológico de las bacterias relacionado al momento de la medición. Este es un ejemplo del problema de la calibración de F y parcialmente está relacionado con las largas incubaciones que son necesarias para obtener datos de consumo de oxígeno.

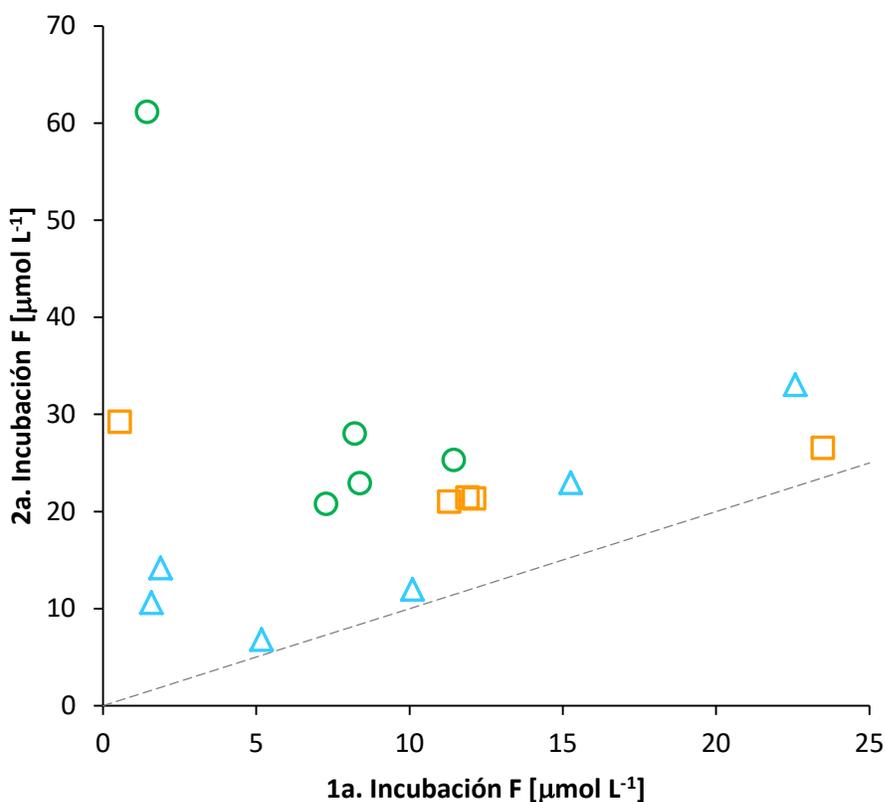


Figura 29. Comparación de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] entre la extracción de formazán antes y después de la incubación para la medición de oxígeno de tres sub-cultivos de bacterias (asociadas a *Chaetoceros sp.*, círculos verdes, $-3.95x+60.74$, $r^2=0.74$; provenientes de la bahía, cuadros naranjas, no hay cambio significativo en y , $r^2=0.05$; asociadas a *Thalassiosira sp.*, triángulos azules, $1.03x+6.78$, $r^2=0.79$). La línea gris corresponde a la pendiente teórica 1/1, $n=58$.

3.3.3 Perfil de reducción de INT en el Pacífico.

Para la respectiva evaluación del método ETS_{vivo} en relación a R [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] en muestras de campo de procariontes marinos se colectó agua de mar a diferente profundidad (35, 100, 200, 500 y 830 m) en la estación oceanográfica Antares ($31^{\circ}44.929' \text{ N}$, $116^{\circ}57.140' \text{ W}$) durante uno de los cruceros. Las muestras marinas fueron filtradas por $0.8 \mu\text{m}$, incubadas con INT y procesadas de acuerdo a los pasos estipulados en el método ETS_{vivo}. Simultáneamente se realizó un monitoreo del consumo de oxígeno de las muestras de agua de mar con un óptodo para calcular las tasas de respiración por hora. Las muestras tipo blanco se generaron a partir de la incubación de las muestras en formol al 4% por una hora y la posterior adición de INT. Se realizó la medición de absorbancia de formazán y la corrección de la línea base para estimar F .

En la Figura 30 se muestra que la pendiente entre la tasa de respiración y el formazán en la muestra es de -2.47 y para el formazán neto, es decir con el blanco restado, la pendiente resultó en -3.32 . Esto nos indica que no se encontró una correlación positiva entre F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] y R [$\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] como se ha reportado (Villegas-Mendoza, 2015).

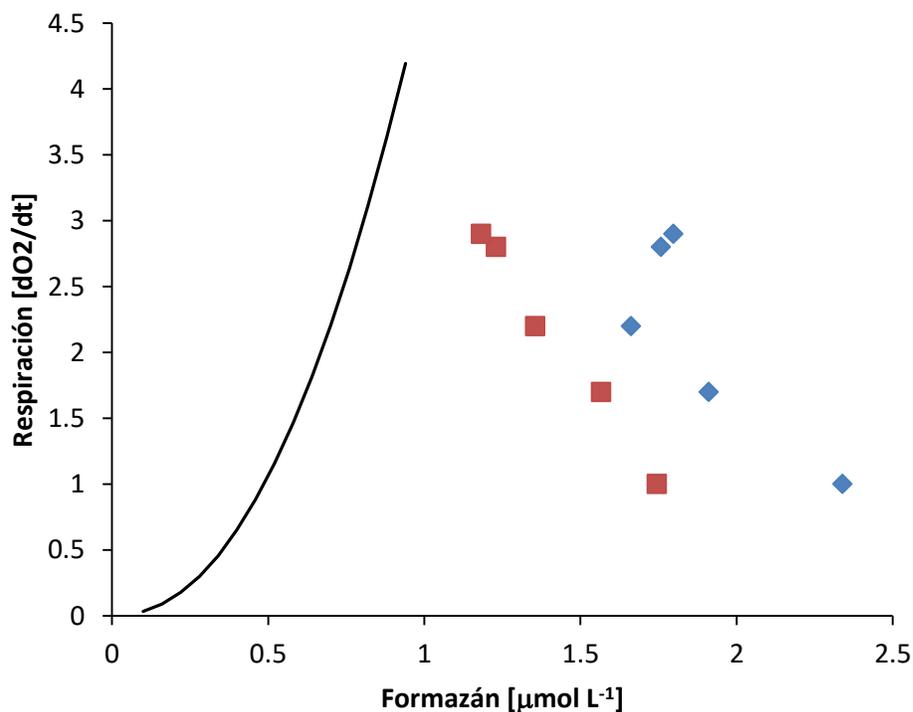


Figura 30. Relación entre F y R calculada a partir de muestras de bacterias marinas de diferentes profundidades incubadas con INT y comparadas con la respiración de acuerdo al método ETS_{vivo}. (Formazán neto, cuadros rojos, $-3.32x+6.83$, $r^2=0.98$; formazán muestra, rombos azules, $-2.47x+6.80$, $r^2=0.68$). La línea negra corresponde a la relación esperada entre R y F encontrada por Villegas-Mendoza (2015).

Capítulo 4. Discusión

4.1 Importancia del método y su potencial para la ecología marina

Se estima que la respiración microbiana en los ecosistemas marinos pelágicos corresponde aproximadamente a la mitad de la respiración de la comunidad. Por lo tanto, el conocimiento de las tasas de este proceso resulta importante para estimar la oxidación de materia orgánica y flujo de nutrientes en el océano. El desarrollo de un método práctico y sensible, como se refiere al método ETS_{vivo}, aportaría información básica sobre los procariontes y su interacción con el ambiente con el fin de mejorar la comprensión actual del ecosistema marino. En comparación con el método convencional, el método ETS_{vivo} aumentaría la sensibilidad de la medición de respiración en aguas oligotróficas y profundas para conocer con detalle las tasas de respiración en la comunidad bacteriana que habita en las diferentes regiones del océano.

La optimización del método ETS_{vivo} permitiría procesar poco volumen y de forma rápida las muestras filtradas de agua de mar con la fracción bacteriana *in-situ* y de esta manera evitar los largos tiempos de incubación a los que se someten las muestras durante la medición de consumo de oxígeno; desventaja en la que adicionalmente se alterarían variables como la temperatura, disponibilidad de oxígeno y estructura de la comunidad microbiana que afectarían las tasas de respiración de los procariontes marinos.

El mejor entendimiento del metabolismo procariota, en este caso de la respiración por medio del método ETS_{vivo}, también permitirá esclarecer las concentraciones de oxígeno que prevalecen en la columna de agua a la cuales están adaptadas las bacterias marina y la relación entre la formación de biomasa bacteriana, su respiración y la eficiencia de crecimiento de los procariontes; una propiedad importante para entender la red trófica microbiana.

La importancia de implementar el método ETS_{vivo} sería conocer los sitios potenciales de reducción celular y los gastos energéticos de las bacterias para llevar a cabo las funciones celulares y de esta forma cuantificar el valor de la respiración en términos de transferencia de carbono y otros elementos que intervienen en los ciclos biogeoquímicos para entender los procesos de transferencia trófica en el océano y el balance de la materia orgánica en el ecosistema marino.

4.2 Avances del método con la tesis

El trabajo realizado durante la evaluación del método ETS_{vivo} ayudó a mejorar ciertos aspectos del protocolo de medición en términos de concentraciones de reactivos, volumen de la muestra, tiempos de incubación y fraccionamiento de procariontes de la comunidad planctónica; así como la recomendación de algunos aspectos técnicos para implementar en el método.

De acuerdo a los experimentos realizados durante la evaluación del método de reducción, se sugiere en principio por el concepto de *PotRed* utilizar la filtración pre-incubación de la muestra antes de ser incubada con INT para la separación de la fracción procariota con filtros de policarbonato de 0.8 μm . Consecuentemente se confirmó que el tiempo de incubación de la fracción procariota con INT sea de 60 minutos y que la colecta de los cristales de formazán se realice con filtros de membrana de 0.2 μm para obtener mayor eficiencia en la colecta de formazán. Se comprobó el uso del agitador tipo vórtex para una mejor extracción de formazán en isopropanol para evitar el aumento de la señal de absorbancia por las partículas suspendidas en la muestra debido al uso del *Beadbeater*.

Se estudió el uso del formol para el tratamiento de las muestras y los blancos. Se descartó el uso de formol posterior a la incubación de la muestra oceánica con INT debido a que la sal de tetrazolio es suficiente para envenenar la muestra bacteriana y detener la respiración; también se encontró que el adición de formol posterior a la incubación con INT disminuye la señal de absorbancia de formazán en la muestra bacteriana. Se logró mejorar el estado de las muestras de tipo blanco al aumentar la concentración de formol del 2 al 3.7% para matar la muestra de forma inmediata antes de la incubación con INT.

Para la interpretación espectral de las muestras incubadas con INT, se calculó el coeficiente de absorptividad espectral molar del formazán disuelto en isopropanol que permite usar el método sin necesidad de calibrar con estándares cada serie de muestras. Se estudió la forma espectral de ϵ con lo que se logró corregir los espectros de absorbancia con la línea base espectral medidos en espectrofotómetro y sistema óptico Ocean Optics. Para ambos radiómetros se estableció el límite de detección de la señal de formazán que equivale a una concentración de formazán de 0.12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para el espectrofotómetro y de 0.6 a 1.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en Ocean Optics.

La comparación de las muestras de procariontes colectadas en campo procesadas con y sin la adición de INT demostró que existen varios componentes con contribuciones significativas a la señal de muestras

in-situ. Dentro de los diversos factores que intervienen en la interpretación de la señal de respiración se logró definir el aumento en la absorbancia de la muestra por el tratamiento con *Beadbeater* y el traslape óptico de espectros por filtros con propanol, INT no disuelto y materia orgánica disuelta como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores que intervienen en la medición de absorbancia de formazán en la muestra de bacterias marinas. Ejemplo de la importancia de los factores en relación a muestra en unidades de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. Los factores parcialmente se traslapan y no son aditivos.

	Formazán [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
Muestra campo	3.79
Blanco	2.21
Filtros con Beadbeater	0.65
INT no reducido	1.76
Sustancia 'x'	0.5
Materia extracelular	1.48

4.3 Problemas no resueltos

El método ETS_{vivo} en su estado actual presenta varias inconsistencias para su aplicabilidad en muestras de campo y para estimar las tasas de respiración de procariontes marinos. El método presenta varios problemas metodológicos de gran importancia para resolver: Previa investigación ha mostrado para muestras de alta actividad volumétrica una relación no-lineal entre R [$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] y F [$\mu\text{mol L}^{-1}$]. Este trabajo estaba enfocado a muestras de baja actividad respiratoria volumétrica donde no se ha encontrado relación significativa entre R y F . Parte del alto ruido de F tiene su origen en el problema de obtener datos adecuados de blancos para la interpretación del método.

De acuerdo a Robinson y Williams, 2005, el límite de detección de un método está definido por la combinación de la precisión en la técnica analítica, la reproducibilidad, la intensidad de la señal y el tiempo de la incubación.

Durante la evaluación del método de reducción de la sal de tetrazolio INT se intentó aumentar la sensibilidad a través del uso de celdas espectrofotométricas largas con el sistema óptico Ocean Optics; se identificaron diversos aspectos técnicos, como la saturación y ensuciamiento de la celda durante la medición, que no permitieron mejorar la precisión de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] ya que se subestimó el valor de la absorbancia con respecto a la medición de la muestra realizada con espectrofotómetro.

Para las muestras de bacterias colectadas en la bahía y sometidas con el método ETS_{vivo} se encontró una serie de interferencias en la medición de absorbancia de formazán por componentes extracelulares que no se lograron minimizar y tampoco fueron identificadas por completo pero que se encuentran presentes en la columna de agua. Esto evita de forma directa la cuantificación neta de formazán producido en las bacterias que se relaciona directamente con las tasas de consumo de oxígeno.

Finalmente, al realizar la comparación entre F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] y R [$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] no se encontró la relación esperada entre las tasas de respiración calculadas y la producción de formazán en las muestras de procariontes marinos obtenidos en campo. Este resultado se debió en principio a la baja señal de formazán generada en la muestra, no contar con un suficiente número de réplicas y a que las tasas de respiración dependen del grupo taxonómico presente y de su estado fisiológico. El estado fisiológico cambia durante el largo tiempo de la incubación para medir R ; es por esto que, las mediciones de F al inicio y al final de la incubación típicamente son diferentes y resultan en relaciones R/F diferentes.

De acuerdo a la literatura citada en (Reinthal et al., 2006), en profundidades de 1000 metros se han estimado tasas de respiración de $60 - 300 \mu\text{mol C m}^{-3} \text{d}^{-1}$. De forma experimental con cultivos mono-específicos de bacterias se ha establecido una relación entre el mecanismo de transporte de electrones y el proceso de respiración; esto considera en promedio una tasa de respiración de $10 \mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ para los primeros 800 metros de la columna de agua. Las tasas de respiración calculadas para dicha profundidad en el presente proyecto están por debajo del promedio.

Se sugiere en un futuro investigar la no-linealidad entre R y F mediante un cultivo de microbios, recabar datos de R y F durante la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria de las bacterias y de esta forma evaluar los datos publicados por Packard et al. (1996). De acuerdo a la Tabla 4 los aspectos

metodológicos que probablemente afectan más a F son el blanco en general, la eliminación del INT no reducido y la reducción del INT por materia orgánica disuelta. Hay que investigar estos detalles metodológicos en el futuro y se sugiere evaluar el procesamiento de las muestras blanco mediante el uso de 3,5 – diclorofenol como inhibidor de la cadena de transporte de electrones y con el cloruro de mercurio para envenenar a la comunidad procariota.

Capítulo 5. Conclusiones

La evaluación del método ETS_{vivo} basado en la reducción del cloruro de yodonitrotetrazolio (INT) a formazán por la cadena de transporte de electrones ubicado en la pared celular de las bacterias permitió conocer los factores bióticos, abióticos y técnicos que intervienen en la aplicabilidad del método *in situ* para estimar las tasas de respiración de muestras de procariontes procedentes de diferentes profundidades del océano.

De acuerdo a los objetivos planteados, se redujo la fuente de altos blancos en muestras oceánicas y en cultivos de procariontes mediante el aumento de la concentración de formol de 2 a 4%, lo que permitió que la señal de los blancos no sobrepasara los valores de F [$\mu\text{mol L}^{-1}$] de las muestras para obtener la concentración neta de formazán y relacionarla con las tasas de consumo de oxígeno.

La optimización del protocolo con la evaluación del método refiere a realizar la filtración pre-incubación de los procariontes antes de incubar las muestras con INT. Reemplazar el filtro de policarbonato de 0.2 μm por filtro de membrana para tener una mejor eficiencia en la colecta de bacterias con formazán. No realizar la extracción de formazán mediante el agitador de tipo vórtex o *Beadbeater* para evitar la sobreestimación de la señal por las partículas suspendidas.

Se determinó la forma espectral y el coeficiente de absortividad molar del formazán disuelto en isopropanol para el espectrofotómetro y para el sistema de fibra óptica Ocean Optics para la interpretación de la señal de formazán a 485 nm. El sistema Ocean Optics subestimó el valor de ϵ con respecto al valor calculado para el espectrofotómetro.

El ajuste de los espectros de absorbancia con la corrección de la línea base espectral mediante la resta de la pendiente entre los datos de 600 a 650 nm evitó la sobreestimación de la señal por el ruido del instrumento y conservó la forma espectral del formazán.

Actualmente el método de reducción de INT no es adecuado para la estimación de la tasa de respiración en bacterias marinas. Sin embargo, se identificaron varios factores en la interferencia de la medición de absorbancia de formazán por componentes extraídos en la muestra marina: la reducción de INT por sustancias disueltas en el mar principalmente y el aumento de la señal óptica por componentes extracelulares.

Literatura citada

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. a, and Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257-263.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Biddanda, B., Opsahl, S., and Benner, R. (1994). Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. *Limnology and Oceanography*, 39(6), 1259–1275. Recuperado de: <http://doi.org/10.4319/lo.1994.39.6.1259>
- Burd, A. B., Anderson, T. R., Arístegui, J., et al. (2010). Assessing the apparent imbalance between geochemical and biochemical indicators of meso- and bathypelagic biological activity: What the @\$#! is wrong with present calculations of carbon budgets? *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57 (16), 1557–1571. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.02.022>
- Childress, J. J., and Seibel, B. A. (1998). Life at stable low oxygen levels: Adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 1223–1232.
- Christensen, J. P., and Packard, T. T. (1979). Respiratory electron transport activities in phytoplankton and bacteria: Comparison of methods. *Limnology and Oceanography*, 24 (3), 576–583. Recuperado de: <http://doi.org/10.4319/lo.1979.24.3.0576>
- del Giorgio, P., and Williams, P. (Eds.). (2005). *Respiration in Aquatic Ecosystems*. (pp. 325) New York, Oxford University Press.
- del Giorgio, P. A., and Gasol, J. M. (2008). Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. In: D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. 2nd ed. (pp. 243–285). John Wiley & Sons, Inc.
- Green, J. D., and Narahara, H. T. (1980). Assay of Succinate Dehydrogenase Activity by the Tetrazolium Method : Evaluation of an Improved Technique in Skeletal Muscle Fractions. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 28 (5), 408–412.
- Kirchman, D. L. (Ed.). (2008). *Microbial Ecology of the Oceans*. 2nd ed. (pp. 569). Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- Kragh, T., Sondergaard, M., and Tranvik, L. (2008). Effect of exposure to sunlight and phosphorus-limitation on bacterial degradation of coloured dissolved organic matter (CDOM) in freshwater. *FEMS Microbiology Ecology*, 64 (2), 230–239. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00449.x>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2004). *Brock: Biología de los Microorganismos*. 10^a ed. (pp. 1008). España, Prentice Hall.
- Maldonado, F., Packard, T. T., and Gómez, M. (2012). Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. *Journal of*

Experimental Marine Biology and Ecology, 434, 110–118. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.08.010>

- Marchand, D., Prairie, Y. T., and del Giorgio, P. (2009). Linking forest fires to lake metabolism and carbon dioxide emissions in the boreal region of Northern Québec. *Global Change Biology*, 15 (12), 2861–2873. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01979.x>
- Martínez-García, S., Fernández, E., Aranguren-Gassis, M., and Teira, E. (2009). In vivo electron transport system activity: a method to estimate respiration in natural marine microbial planktonic communities. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 459–469. Recuperado de: <http://doi.org/10.4319/lom.2009.7.459>
- Morris, R. L., and Schmidt, T. M. (2013). Shallow breathing: bacterial life at low O₂. *Nature Reviews. Microbiology*, 11 (3), 205–12. Recuperado de: <http://doi.org/10.1038/nrmicro2970>
- Nagata, T. (2008). Organic matter-bacteria interactions in seawater. In: D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. 2nd ed. (pp. 207–232). John Wiley & Sons, Inc.
- Packard, T. T. (1969). *The estimation of the oxygen utilization rate in sea water from the activity of the respiratory electron transport system in plankton*. Thesis (Ph. D.). University of Washington. 101 p.
- Packard, T. T. (1971). The measurement of respiratory electron transport activity in marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 29, 235–244.
- Packard, T. T., and Williams, B. (1981). Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the northwest Atlantic. *Oceanologica Acta*, 4 (3), 351–358.
- Reinthalder, T., Van Aken, H., Veth, C., Arístegui, J., et al. (2006). Prokaryotic respiration and production in the meso- and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin. *Limnology & Oceanography*, 51 (3), 1262–1273. Recuperado de: <http://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1262>
- Robinson, C., and Williams, P. (2005). Respiration and its measurement in surface marine waters. In: del Giorgio, P. and Williams, P. (Eds.), *Respiration in Aquatic Ecosystems* (pp. 147–180). Oxford University Press.
- Robinson, C. (2015, January 22). *Global database of plankton community and bacterial respiration*. Recuperado de: <https://www.uea.ac.uk/environmental-sciences/people/profile/carol-robinson#researchTab>
- Seibel, B. A. (2011). Critical oxygen levels and metabolic suppression in oceanic oxygen minimum zones. *Journal of Experimental Biology*, 214 (2), 326–336. Recuperado de: <http://doi.org/10.1242/jeb.049171>
- Sherr, E., and Sherr, B. (2000). Marine microbes: an overview. In: D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. (pp. 13–46). Wiley-Liss, Inc.
- Smith, J. J., and McFeters, G. A. (1997). Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*, 29 (3), 161–175. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00036-5](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00036-5)

- Valdés-Villaverde, P. J. (2015). *Aspectos metodológicos sobre la determinación del carbono orgánico disuelto lábil mediante bioensayos de respiración y producción con bacterias marinas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. 78 p.
- Villegas-Mendoza, J. (2015). *Producción de vitamina B12 por procariotas marinos en condiciones de limitación de sustrato en cultivos continuos*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 129 p.
- Villegas-Mendoza, J., Cajal-Medrano, R., and Maske, H. (2015). INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(Phenyl) Tetrazolium Chloride) Is Toxic to Prokaryote Cells Precluding Its Use with Whole Cells as a Proxy for In Vivo Respiration. *Microbial Ecology*, 70 (4), 1004-11. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00248-015-0626-3>
- Warkentin, M., Freese, H. M., Karsten, U., and Schumann, R. (2007). New and fast method to quantify respiration rates of bacterial and plankton communities in freshwater ecosystems by using optical oxygen sensor spots. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (21), 6722–6729. Recuperado de: <http://doi.org/10.1128/AEM.00405-07>
- Williams, P. (1981). Microbial contribution to overall marine plankton metabolism: direct measurements of respiration. *Oceanologica Acta*, 4 (3), 359–364.