

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



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Exploración metodológica del potencial de formación de geles
marinos**

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

Presenta:

Paola Jacqueline Valdés Villaverde

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por
Paola Jacqueline Valdés Villaverde

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Director de tesis

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Ramón Cajal Medrano



Dr. Jorge Adrián Rosales Casián
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Paola Jacqueline Valdés Villaverde** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina

Exploración metodológica del potencial de formación de geles marinos

Resumen aprobado por:

Dr. Helmut Maske Rubach
Director de tesis

En el océano se pueden encontrar estructuras gelatinosas tridimensionales compuestas principalmente de moléculas orgánicas como polisacáridos y proteínas. Estas estructuras pueden agregarse/desagregarse de forma continua debido a sus características aglutinantes y a fuerzas electrostáticas. Los geles orgánicos se distribuyen a lo largo del continuo de tamaños y, por lo tanto, su categorización como materia orgánica particulada (MOP) o disuelta (MOD) es difícil. Además, la cuantificación de los geles es compleja ya que los métodos actuales sólo permiten detectar ciertas fracciones de geles. La manera en que los geles impactan los diferentes reservorios de carbono y a la ecología de los microbios marinos son aspectos pobremente estudiados. En este proyecto se hizo una investigación metodológica para evaluar y controlar la formación de geles en muestras de agua de mar con el fin de generar información que ayude en futuras investigaciones sobre el papel de los geles en la ecología microbiana. Se realizaron filtraciones secuenciales de muestras de agua de mar para colecta y mediciones de carbono orgánico particulado (COP) y nitrógeno orgánico particulado (NOP). Se cuantificaron partículas exopoliméricas transparentes (PET) como referencia. Así mismo, se realizaron conteos bacterianos y pruebas de viscosidad. Nuestros resultados sugieren la formación de partículas orgánicas a partir de MOD en muestras filtradas. El carácter dinámico del intercambio entre MOD y MOP complica el control de la concentración de geles para investigar experimentalmente su papel en la ecofisiología de los procariontes heterotróficos. Los resultados de PET (0.13 a $2.15 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$) son congruentes con lo antes reportado para la misma región. Los resultados de las pruebas de viscosidad sugieren que la influencia de la materia orgánica sobre la viscosidad no es significativa. En esta investigación destacó el potencial de la MOD para formar relativamente altas concentraciones de MOP. Las implicaciones ecológicas de este potencial de formación todavía deben de ser investigadas.

Palabras clave: Geles orgánicos, MOD, MOP, COP, PET, partículas

Abstract of the thesis presented by **Paola Jacqueline Valdés Villaverde** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Methodological exploration of the marine gels formation potential

Abstract approved by:

Dr. Helmut Maske Rubach
Thesis Director

In the ocean three-dimensional gelatinous structures composed mainly of organic molecules such as polysaccharides and proteins can be found. These structures can aggregate/disaggregate continuously due to their agglutinative characteristics and electrostatic forces. Organic gels are distributed along the size continuum and so their categorization as particulate organic matter (POM) or dissolved organic matter (DOM) is difficult. In addition, the quantification of gels is complex since the current methods only allow to detect certain fractions of gels. In addition, the ways in which gels impact the different carbon reservoirs and the ecology of marine microbes are poorly studied aspects. In this project, a methodological investigation was made how to evaluate and control gel formation in seawater in order to generate information that will help in future research on the role of gels in microbial ecology. Sequential filtrations of seawater samples were carried out for the collection and measurement of particulate organic carbon (POC) and particulate organic nitrogen (PON). Transparent exopolymeric particles (TEP) were quantified as a reference. Also, bacterial counts and viscosity tests were performed. Our results suggest the formation of organic particles from DOM in filtered samples. The dynamic nature of the exchange between DOM and POM complicates the control of gels concentration to experimentally investigate their role in the ecophysiology of heterotrophic prokaryotes. TEP results (0.13 to $2.15 \mu\text{g XG eq mL}^{-1}$) are similar to those previously reported for the same region. Viscosity tests results suggest that the influence of organic matter on viscosity is not significant. The noteworthy result of this research is the potential of DOM to form relatively high concentrations of POM. The ecological consequences of this formation have yet to be investigated.

Keywords: Organic gels, DOM, POM, POC, TEP, particles

Dedicatoria

Con gran cariño, por ser mis pilares, mi ejemplo y mi inspiración

A mis hermanos

A mis padres

A mi familia

Para todos aquellos que quieren “*hacer ciencia*”

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, becaria N°613462) por el apoyo económico y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme realizar mi posgrado en sus instalaciones.

Al Consejo de Programa de Posgrado en Ecología Marina y al Departamento de Oceanografía Biológica por el apoyo económico y logístico otorgados durante la realización de esta tesis.

A mi director, Dr. Helmut Maske Rubach, por su confianza, su guía, sus explicaciones y sus consejos. Gracias por apostar por mí.

A mis sinodales, Dr. Ramón Cajal-Medrano, Dr. Axayácatl Rocha-Olivares y Dra. Rosa Reyna Mouriño-Pérez. A los tres, por sus valiosos consejos, correcciones y aportes a lo largo de este proceso de aprendizaje. Le agradezco especialmente, a Ramón, por el apoyo moral y la confianza, a Axa, por permitirme hacer uso del Laboratorio de Ecología Molecular y por sus atinados comentarios y a Rosa, por acompañarme a través de un proceso que le agregó peso extra a este viaje.

Al Institut de Recherche et le Développement (IRD, Francia) por el apoyo económico y especialmente al Dr. Aurélien Paulmier por todo el apoyo administrativo, para asistir al “7th International SOLAS Summer School” en Cargèse, Francia.

A los miembros del laboratorio de Ecología de Microbios Marinos (MICMAR), a los de base y a los intermitentes, por su ayuda, por las charlas y por compartir sus ideas conmigo. Especialmente a César por su ayuda técnica y su apoyo emocional, esta tesis es casi tan tuya como mía.

A los miembros del laboratorio de Ecología Molecular, particularmente a Ivonne y Anita, por dejarme trabajar en su espacio, por sus aportes y por brindarme su ayuda con una sonrisa.

Al personal del Departamento de Embarcaciones Oceanográficas de CICESE y a Ernesto y Julio del IIO-UABC quienes, aprovechando sus salidas a campo, me trajeron agua de mar para mis experimentos.

A Uriel, Citlalli, Carmen, Olga y Martin quienes me permitieron hacer uso de las instalaciones a su cargo para pesar, analizar o almacenar mis muestras.

A mis profesores de la maestría por compartir sus experiencias de vida profesional y personal.

A Elizabeth y Yahaira, quienes me escucharon y aconsejaron en momentos difíciles.

A mis amigos y compañeros de CICESE: a los de la generación de arriba, a los de mi generación, a los de la generación de abajo y a los de otros departamentos. Gracias por las reuniones, las pláticas, las preguntas, las explicaciones, las risas, los partidos, la música.

A Esperanza, Frida, Tania, Adolfo, Ernesto y Jaime porque me acompañaron, me escucharon y me brindaron su apoyo y su cariño incondicional cuando más los necesité.

A Josué, por estar conmigo, por ser mi compañero de desvelos, por aguantar mis altibajos y ayudarme en esos momentos difíciles, por escucharme y aconsejarme siempre, por todo.

Finalmente, a mi familia, porque son lo más importante que tengo, porque lejos o cerca, en las buenas, en las malas y en las peores, siempre están para mí.

¡De todo corazón, gracias!

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Introducción general.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación.....	11
1.4 Hipótesis.....	12
1.5 Objetivos.....	12
1.5.1 Objetivo general	12
1.5.2 Objetivos específico.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	13
2.1 Adquisición de muestras.....	13
2.1.1 Muestras de cultivos.....	13
2.1.2 Muestras naturales.....	13
2.2 Colecta y cuantificación de microgeles orgánicos marinos.....	14
2.2.1 Carbono Orgánico Particulado (COP) y Nitrógeno Orgánico Particulado (NOP).....	16
2.2.2 Colecta y cuantificación de partículas exopoliméricas transparentes (PET) y sus precursores (p-PET).....	17
2.2.3 Colecta y cuantificación de bacterias.....	18
2.3 Viscosidad.....	19
Capítulo 3. Resultados.....	20
3.1 Comparación de filtros	20
3.1.1 Marca Whatman vs Marca Millipore.....	20
3.1.2 Tiempos de calcinación y tipo de filtración.....	22

3.1.3 Representatividad de la distribución de COP en filtros de 47 mm	24
3.2 Cuantificación de microgeles orgánicos marinos.....	25
3.2.1 Determinación de PET y precursores de PET (p-PET).....	26
3.2.2 Acidificación de muestras vs no acidificación.....	29
3.2.3 Carbono Orgánico Particulado (COP) y la relación C/N.....	31
3.2.4 Abundancia bacteriana.....	35
3.3 Viscosidad.....	37
3.3.1 Medición de viscosidad con presión diferencial constante y resistencia dinámica de capilares.....	37
3.3.1.1 Capilares de distinto calibre.....	38
3.3.1.2 Capilares de distinta longitud.....	40
Capítulo 4. Discusión.....	42
4.1 Las PET como referencia de partículas gelatinosas en el océano.....	44
4.2 Aspectos metodológicos para la cuantificación de geles en suspensión.....	46
4.3 Potencial de formación y re-ensamblaje de geles.....	49
4.4 Relación geles y viscosidad.....	50
4.5 Implicaciones de un balance dinámico entre MOD y geles.....	51
Capítulo 5 . Conclusiones.....	54
Literatura citada.....	55
Anexos.....	59
Anexo A. Mecanismos de intercambio entre reservorios de MOD y MOP en el océano (He <i>et al.</i> , 2016).....	59
Anexo B. Valores de viscosidad del agua experimentales y recomendados por Collings y Bajenov (1983).....	60
Anexo C. Comparación de COP, PET y p-PET en términos de carbono ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en muestras de agua de mar de diferentes profundidades.....	61

Lista de figuras

Figura		Página
1	Transformación e intercambio de materia orgánica disuelta (MOD) y materia orgánica particulada (MOP) en forma de geles por procesos de aglutinación y fragmentación (Modificado de Orellana y Verdugo, 2003).....	3
2	Escala de tamaño de componentes de carbono orgánico en agua de mar y métodos para estudiarlos (Tomada de Verdugo, 2012).....	4
3	Dinámica de geles en el océano (Adaptado de Orellana y Leck, 2015).....	5
4	Carbono orgánico retenido por filtros GFF a diferentes presiones de filtración por presión. Muestras de tres diferentes cultivos de diatomeas indicado por color. Datos menos los blancos y normalizados a las muestras filtradas con 0.005 MPa. (Proporcionada por Maske y Almeda-Jauregui).....	10
5	Esquema general para la realización de filtraciones secuenciales para la cuantificación de geles marinos. Las colectas de COP/NOP se realizaron con filtros de GF/F calcinados.....	15
6	Dispositivo diseñado para medir la viscosidad. El dispositivo está compuesto por una columna de altura variable en la que se coloca la muestra, una serie de capilares sumergidos en un baño maría para mantener la temperatura de la muestra, una zona de válvulas controlados con temporizadores y un área de colectores.....	19
7	Carbono orgánico particulado colectado de muestras de agua de mar con dos marcas de filtros GF/F (Whatman y Millipore) filtradas con dos presiones diferenciales (0.005 MPa y 0.05 MPa) mediante vacío. Las barras de error indican la desviación estándar (n=6).....	21
8	Relación carbono nitrógeno de muestras de agua de mar con dos marcas de filtros GF/F (Whatman y Millipore) filtradas con dos presiones diferenciales de vacío (0.005 MPa y 0.05 MPa). Las barras de error indican la desviación estándar (n=6).....	21
9	Carbono orgánico particulado estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio sometidos a diferentes tiempos de calcinación (4 y 12 h). La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=8). *Diferencias entre filtración por presión y vacío.....	23
10	Relación carbono/nitrógeno estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio sometidos a diferentes tiempos de calcinación (4 y 12 h). La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=8). * Diferencias entre filtración por presión y vacío.....	23

11	Carbono orgánico particulado estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio (Whatman (W) y Millipore (M)) de 47 mm y cortados en cuatro porciones iguales. La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=4).....	24
12	Relación carbono/nitrógeno estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio (Whatman (W) y Millipore (M)) de 47 y cortados en cuatro porciones iguales. La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=4).....	26
13	Concentración de PET (>0.45 μm) y p-PET (>0.2 μm) estimadas en muestras naturales sin prefiltrar (AM) y en muestras prefiltradas con baja y alta presión (FBP y FAP, respectivamente). La colecta de PET y p-PET de las muestras FBP y FAP se realizó 48 horas después de la primera filtración. Las muestras fueron colectadas en la estación Antares.....	27
14	a) Perfiles de PET (>0.45 μm) y b) precursores de PET (>0.2 μm) presentes en muestras de agua de mar (AM) y en filtrados de agua de mar 48 horas después de haber sido sometidas a dos tratamientos de presión diferencial 0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP). Las muestras fueron colectadas en la estación Antares.....	28
15	Carbono orgánico particulado de muestras de cultivos de <i>Thalassiosira weissflogii</i> diluido al 20% (Tw20%), en los filtrados de estas mismas muestras después de 24 horas en refrigeración (Filtrado Tw20%) y en muestras de agua de mar filtradas con presiones diferenciales (0.005 y 0.05 MPa, FBP Y FAP, respectivamente) sometidas a tratamientos de acidificación y no acidificación. Las barras de error indican la desviación estándar (n=12).....	30
16	Relación carbono/nitrógeno en muestras de cultivo de <i>Thalassiosira weissflogii</i> diluido al 20% (Tw 20%), en los filtrados de estas mismas muestras después de 24 horas en refrigeración (Filtrado Tw 20%) y en muestras de agua de mar filtradas con presiones diferenciales de 0.005 y 0.05 MPa, (FBP Y FAP, respectivamente) sometidas a tratamientos de acidificación y no acidificación. Las barras de error indican la desviación estándar (n=12).....	30
17	Concentración de carbono orgánico particulado (COP) en muestras de cultivos de diatomeas (Pn y Tw) y en muestras naturales (AM) sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío. Las barras de error indican la desviación estándar (n=5).....	31
18	Relación Carbono-Nitrógeno en muestras de cultivos de diatomeas (Pn y Tw) en muestras naturales (AM) sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío. Las barras de error indican la desviación estándar (n=5).....	32
19	Distribución vertical de carbono orgánico particulado (a) y distribución vertical de la relación carbono nitrógeno(b) obtenido a partir de muestras naturales tomadas en la estación Antares (ambiente oceánico) y sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío (0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP)).....	33

20	Carbono orgánico particulado colectado en filtraciones secuenciales de filtrados de muestras de agua de mar superficial (AMS), agua de mar profunda (AMP) y cultivos (C). Los datos son normalizados a las concentraciones de la primera filtración de la muestra.....	34
21	Relación C/N en filtrados de muestras de agua de mar superficial (AMS), agua de mar profunda (AMP) y cultivos (C).....	35
22	Abundancia bacteriana en muestras de filtraciones secuenciales de agua de mar superficial y profunda (AMS y AMP, respectivamente) y en muestras de agua de mar sometidas a tratamientos de presión diferencial (AMS AP y AMS BP) (ver Tabla 5 para los períodos de refrigeración). Las barras de error indican la desviación estándar.....	36
23	Viscosidad de muestras de cultivos de dinoflagelados filtradas a con baja (0.005 MPa, BP) y alta presión (0.05 MPa, AP) a través de capilares de distinto calibre (1.57 mm y 0.5 mm). El tipo de muestra se refiere al tiempo de refrigeración (ver tabla 6).	38
24	Flujo de agua destilada a través de capilares de dos calibres diferentes: grueso, 1.57 mm (círculos) y delgado, 0.5 mm, (triángulos) en función de a) temperatura (°C) y b) viscosidad (MPa s ⁻¹).....	39
25	Viscosidad de muestras de cultivos de diatomeas filtradas a baja (0.005 MPa, BP) a alta (0.05 MPa, AP) a través de capilares de distinta longitud (2 m y 1 m). El tipo de muestra se refiere al tiempo de refrigeración (ver tabla 6).....	40
26	Flujo de agua destilada a través de capilares de dos longitudes diferentes (rombos, 1 m y círculos, 2 m) en función de a) temperatura (°C) y b) viscosidad (MPa s ⁻¹).....	41
27	El ciclo del carbono en el ecosistema marino (Modificado de Syres et al., 2000).....	43
28	Ciclo microbiano del carbono en la nieve marina (Modificado de Azam y Malfatti, 2007).....	52
29	Contenido de carbono (µg mL ⁻¹) presente en muestras de COP obtenidas a partir de filtraciones de agua de mar con baja y alta presión (BP y AP, respectivamente) y en muestras de PET y p-PET colectadas a partir de muestras de agua de mar. El contenido de carbono en muestras de PET y p-PET se calculó con el factor de conversión f' con un valor promedio de 0.63 (Engel, 2004).....	61

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Clasificación de geles marinos por componente mayoritario y método de cuantificación asociado.....	7
2	Número de cultivos, clave de identificación y relación de muestras colectadas a partir de cada uno.....	13
3	Detalles ambientales, fechas y métodos de colecta de muestras en campo.....	14
4	Pruebas estadísticas para la comparación de la concentración de PET (>0.45 μm) y p-PET (>0.2 μm) presentes en muestras de agua de mar (AM) y en filtrados de agua de mar 48 horas después de haber sido sometidas a dos tratamientos de presión diferencial 0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP).....	29
5	Periodo de refrigeración de muestras para filtraciones secuenciales y tipo de material colectado.....	34
6	Identificador de muestras utilizadas para las pruebas de viscosidad con capilares de distintos calibres y longitudes.....	37

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción general

Las partículas orgánicas no vivas, como detritus y nieve marina, están en gran parte conformadas por geles. Los geles orgánicos son estructuras tridimensionales que se forman de manera natural en la biósfera, incluido el medio marino. Están compuestos en su mayoría por moléculas orgánicas (polisacáridos y proteínas) que de manera espontánea se agregan y mantienen unidas gracias a fuerzas electrostáticas, enlaces iónicos y/o puentes de hidrógeno (Chin *et al.*, 1998; Orellana *et al.*, 2011). En la literatura también existe el concepto clásico sobre la formación de agregados por el carácter parcialmente hidrofóbico de las moléculas orgánicas. El concepto de la formación de agregados por fuerzas electrostáticas (Verdugo, 2012) es más reciente y todavía no se ha publicado una evaluación comparativa de los dos conceptos. En este trabajo se maneja el concepto de la formación de los agregados orgánicos por fuerzas electrostáticas.

En los ambientes acuáticos es posible encontrar superficies, orgánicas o inorgánicas, con diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Estas superficies, dentro de las que se incluyen partículas y conglomerados, son típicamente colonizadas por diversos microorganismos (principalmente procariontes) que, una vez que se han adherido, comienzan a formar una biopelícula compuesta principalmente por agua y sustancias poliméricas extracelulares y en menor medida por proteínas (Jimenez-Taracido, 2009; Dang y Lovell, 2016) en la cual crecen embebidos. Asimismo, en la literatura se menciona que la formación de biopelículas beneficia a la comunidad microbiana al facilitar la adhesión entre los microorganismos presentes. De esta manera se crean consorcios microbianos en los que las relaciones sinérgicas entre especies les permiten desarrollar diferentes estrategias de supervivencia (Jiménez-Taracido, 2009) entre las que destacan: 1) la función protectora (mediada químicamente) contra depredación, fagocitosis y estrés térmico (Matz *et al.*, 2008; Johnson, 2008), 2) la retención de nutrientes y subproductos metabólicos (Costerton *et al.*, 1995; Jiménez-Taracido, 2009) y 3) la transferencia de información entre bacterias (Yang *et al.* 2017).

Por su parte, la formación de geles en suspensión depende de la calidad y la concentración de los precursores orgánicos los cuales son exudados por bacterias y células de fitoplancton a través de diversos procesos biológicos o liberados como resultado de la muerte celular. La aglutinación de estas moléculas, determinada por las condiciones físicas y químicas del agua de mar, culmina en una matriz compuesta de polímeros de polisacáridos, o de proteínas, en la cual, tanto los procariontes como las moléculas orgánicas

que se encuentran en la columna de agua quedan aisladas en una estructura porosa y tridimensional en forma de gel (Chin *et al.*, 1998; Orellana y Verdugo, 2003; Verdugo, 2012; Orellana y Leck, 2015).

En la literatura también se sugieren aspectos en los que los geles en suspensión y las biopelículas pudieran ser análogos (Azam, 1998; Malfatti y Azam, 2009; Orellana *et al.*, 2007), sin embargo, la manera en la que los geles impactan los diferentes reservorios de carbono y la ecofisiología de los microbios marinos son aspectos pobremente estudiados. En este estudio se hizo una exploración metodológica para evaluar y controlar la formación de geles en muestras de agua de mar para generar información que ayude en futuras investigaciones sobre el papel de los geles en la ecología microbiana marina.

1.2 Antecedentes

La matriz de estas redes tridimensionales es estabilizada mediante enlaces iónicos y no de forma covalente de forma que las agregaciones gelatinosas resultantes poseen propiedades aglutinantes que les permiten asociarse o fragmentarse continuamente. Los geles de tamaño microscópico pueden llegar a formar agregaciones macroscópicas y viceversa (Chin *et al.*, 1998; Orellana y Verdugo, 2003; Radić *et al.*, 2011). También es importante señalar que este proceso depende principalmente de condiciones ambientales tales como la temperatura, el pH o la concentración de iones de calcio y magnesio en el medio (Figura 1) (Chin *et al.*, 1998).

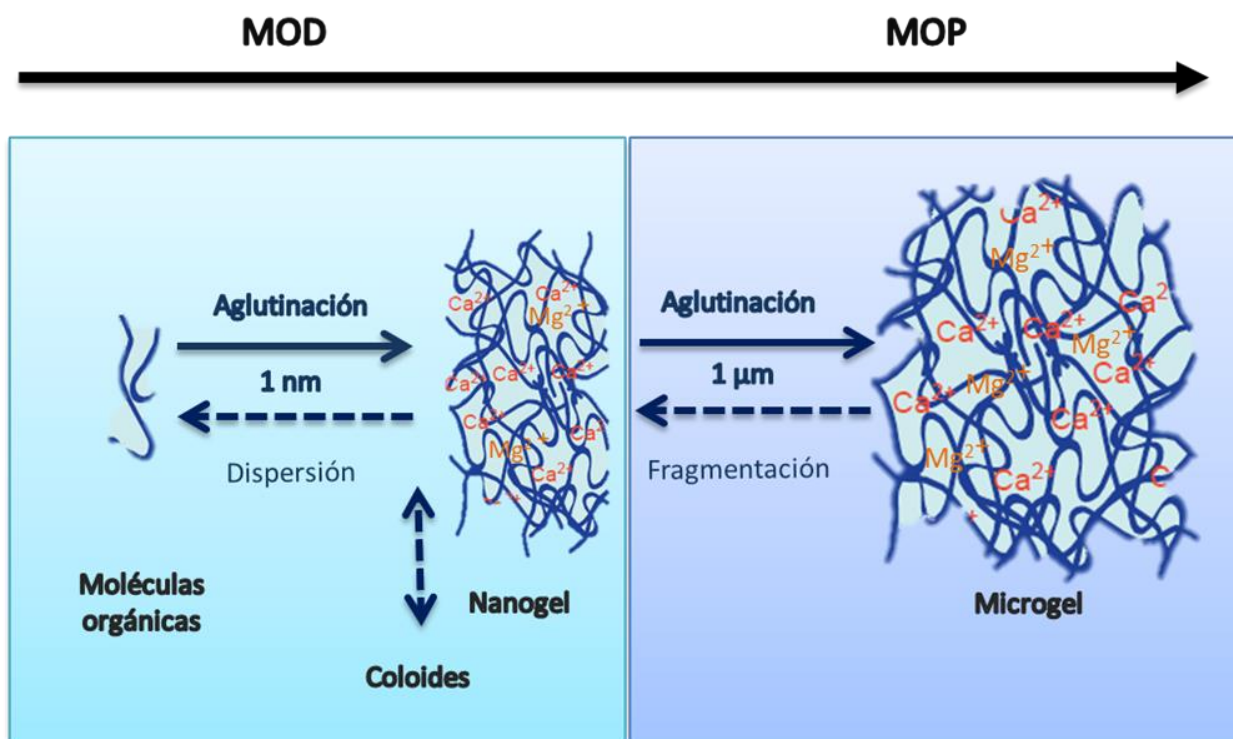


Figura 1. Transformación e intercambio de materia orgánica disuelta (MOD) y materia orgánica particulada (MOP) en forma de geles por procesos de aglutinación y fragmentación (Modificado de Orellana y Verdugo, 2003).

La fragmentación o aglutinación constante permite la formación de aglomerados de distintos tamaños dando paso a una transferencia de materia entre los reservorios del carbono orgánico particulado (COP) y el disuelto (COD). De esta manera juegan un papel fundamental en el transporte de la materia orgánica (MO), así como en los procesos de degradación en los que intervienen los microbios marinos. Debido a ello, existe una conectividad entre las dos fases, disuelta y particulada que representan dos reservorios en la que se transfiere material, en forma de polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, desde y hacia estas redes gelatinosas. Adicionalmente la actividad degradadora de los microbios puede transferir parte del COP en forma de gel al reservorio de COD a través de diversas rutas enzimáticas (Ghiglione *et al.*, 2007, Verdugo, 2012; Orellana y Leck, 2015).

La materia orgánica marina, ha sido típicamente dividida en dos fracciones: la fracción disuelta y la fracción particulada (MOD y MOP, respectivamente). Dicha clasificación se basa principalmente en el tamaño de las partículas que son retenidas con un filtro de fibra de vidrio (GF/F, GF/C) o con diferentes tipos de filtros de policarbonato con tamaños de poro entre 0.2 y 1.0 μm . Se considera como parte del MOP todo aquel material colectado en los filtros mientras que todas aquellas partículas que han logrado pasar, forman parte de la fracción disuelta. Sin embargo, en cuanto a los geles en suspensión se refiere, las propiedades

fisicoquímicas que les permiten ensamblarse y fragmentarse de manera espontánea, fomentan la incorporación y liberación sistemática de moléculas e iones desde y hacia la matriz y, por lo tanto, estos geles sufren cambios morfológicos importantes que derivan en una transición de la fracción particulada a la fracción disuelta y viceversa. De esta forma, la amplia gama de tamaños, desde partículas disueltas hasta grandes conglomerados, en las que se presentan los geles hace difícil su clasificación en alguna de las dos fracciones por lo que se les define como parte del continuo de tamaños (Figura 2) (Verdugo *et al.*, 2004; Hakspiel-Segura *et al.*, 2017).

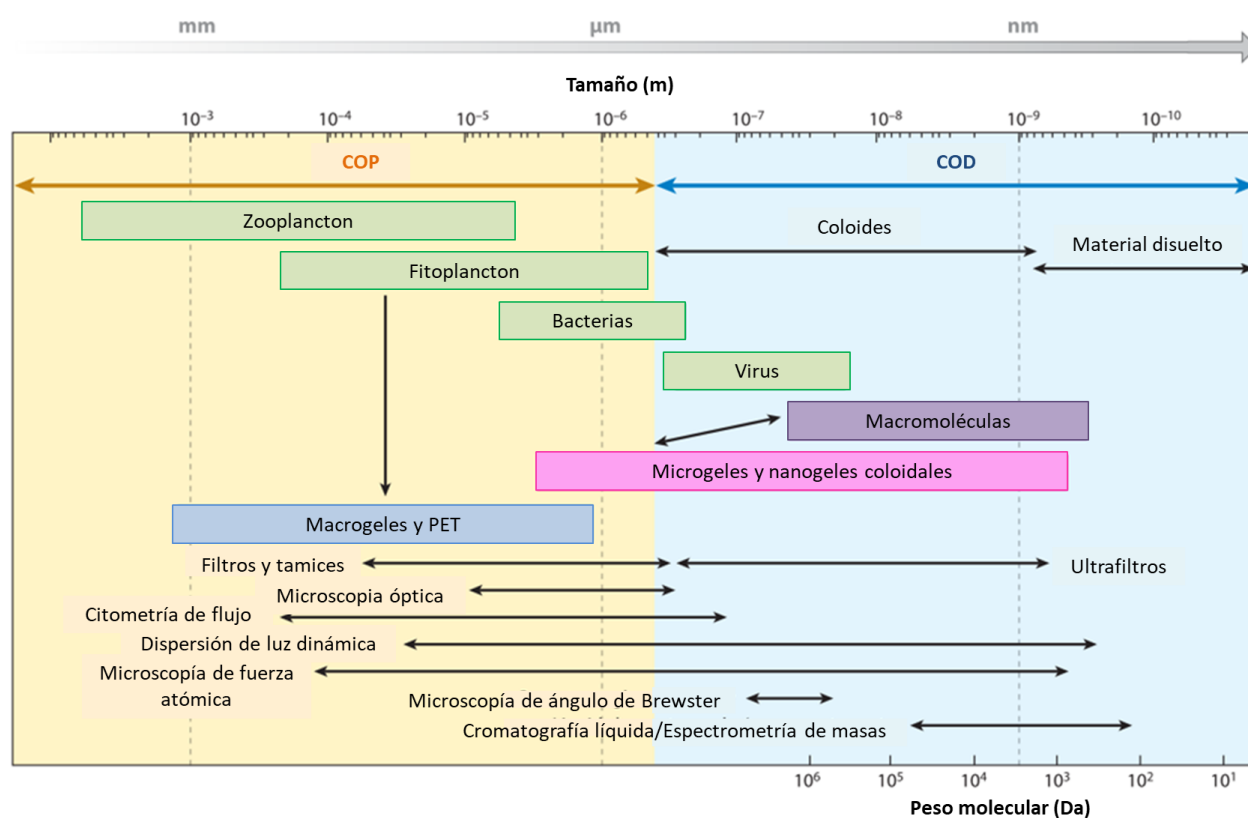


Figura 2. Escala de tamaño de componentes de carbono orgánico en agua de mar y métodos para estudiarlos (Tomada de Verdugo, 2012).

En el océano, el reservorio de carbono orgánico más grande es el que se encuentra en forma de carbono orgánico disuelto (COD) y se considera que aproximadamente el 10% de este COD se encuentra en forma de gel (Hansell *et al.*, 2009; Verdugo, 2012). Por su parte, el tamaño del reservorio de carbono orgánico particulado (COP) es similar a la fracción gelatinosa del COD (Chin *et al.*, 1998). Ahora bien, de acuerdo con la escala de “bioreactividad relacionada al tamaño” del carbono orgánico disuelto, la fracción en forma de geles representaría la fuente de carbono orgánico biodegradable más grande y más accesible para las bacterias heterotróficas. De esta manera, el aporte de COD en forma de gel podría ser considerada como

la mayor contribución de carbono al llamado “bucle microbiano” (Orellana y Verdugo, 2003; Orellana y Leck, 2015). Por otro lado, la aglutinación de partículas tiene un papel importante en el control de la sedimentación de la materia orgánica. Los geles pueden encapsular partículas orgánicas e inorgánicas como células y detritos sólidos durante su formación por agregación/aglutinación de suerte que la tasa de hundimiento de estas partículas aumenta considerablemente (Figura 3). De igual forma, dado el alto contenido de carbono de algunos geles como las partículas exopoliméricas transparentes (PET), su sedimentación aceleraría la exportación del carbono biogénico hacia el océano profundo. De esta manera, los geles en suspensión jugarían un papel fundamental en el secuestro de carbono y, por ende, en el ciclo del carbono (Wurl y Holmes, 2008).

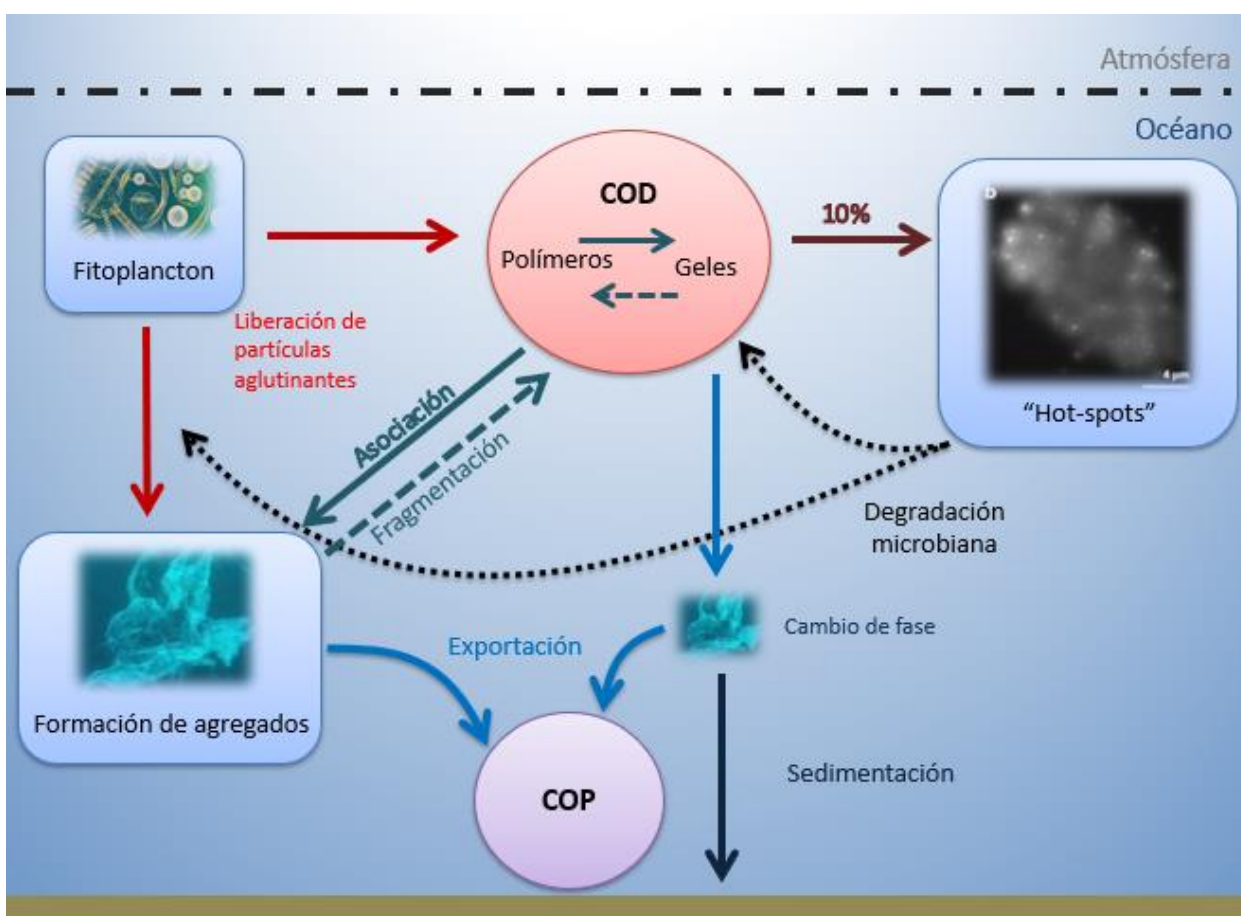


Figura 3. Dinámica de geles en el océano (Adaptado de Orellana y Leck, 2015).

Las partículas gelatinosas presentes en el agua de mar se han documentado desde finales del siglo XX y han generado cada vez más interés. Lo anterior se debe a que la formación de estas partículas constituye un elemento importante a considerar en procesos como el transporte de carbono orgánico desde la superficie hacia aguas profundas (Verdugo *et al.*, 2004) y en la adsorción de metales traza y nutrientes

(Engel, 2009), por mencionar algunos. Además, la coagulación de estos geles los convierte en una fuente de carbono lábil que afectaría de manera significativa el desarrollo de microorganismos (bacterias heterotróficas) e incluso de algunos organismos del zooplancton (copépodos) (Ling y Alldredge, 2003; Del Negro *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2018). No obstante, el estudio de las partículas gelatinosas en suspensión en el agua de mar sigue en sus inicios.

A pesar de que existen diversos tipos de partículas gelatinosas, el grueso de los estudios realizados se ha enfocado principalmente en los geles de mucopolisacáridos. Los mucopolisacáridos son cadenas largas de moléculas de azúcares ácidos y aminoazúcares exudados por bacterias, micro y macroalgas, corales y bivalvos (Decho, 1990) y representan la mayor parte de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) presentes en el agua de mar. Algunas de estas SPE pueden ser retenidas con filtros de poro operacional de $0.4 \mu\text{m}$ y, por consiguiente, pueden ser clasificadas como partículas gelatinosas. En función de su contenido de azúcares o proteínas, estos pueden ser catalogados en dos subgrupos de partículas discretas, ya sea como partículas exopoliméricas transparentes (PET) o como partículas teñibles con azul de Coomassie (PTC), respectivamente. Si bien se ha observado que tanto PET como PTC están estrechamente ligadas, aún se desconoce si estas partículas pudiesen ser subunidades químicas de una misma partícula gelatinosa (Engel, 2009) y es preciso recalcar que la mayor parte de la información que se tiene sobre el origen, la formación y la función de estas partículas en el océano deriva de las investigaciones sobre PET (Cisternas-Novoa *et al.*, 2015).

En cuanto a los procesos de formación de las partículas gelatinosas se refiere, se sugieren tres mecanismos: 1) la agregación de fibrillas de polímeros y posiblemente coloides (agregados orgánicos $< 1 \mu\text{m}$ unidos por fuerzas hidrofóbicas) por procesos físicos, de acuerdo con la teoría de la coagulación, 2) ensamblajes espontáneos de materia orgánica disuelta y 3) la exudación biológica de material con un alto potencial de aglutinación que promueve la agregación celular (Cisternas-Novoa *et al.*, 2015). Por ejemplo, los nanogeles suelen ensamblarse de forma espontánea a partir de exopolímeros (Chin *et al.*, 1998) mientras que las partículas de tamaño superior a $0.4 \mu\text{m}$ se forman por procesos de agregación (Engel *et al.*, 2004) (Figura 3). Independientemente del mecanismo de formación, las aglomeraciones resultantes exhiben una estructura tridimensional porosa en la cual el solvente (agua de mar) impide el colapso de la red mientras que las cadenas de polímeros, unidas por puentes físicos y/o químicos, encapsulan al solvente. Esto genera un microambiente en equilibrio termodinámico con el medio circundante (Chin *et al.*, 1998; Verdugo *et al.*, 2012). Adicionalmente, las características fisicoquímicas de las cadenas poliméricas, en conjunto con las propiedades dieléctricas del agua de mar, determinan la reactividad de la matriz gelatinosa con respecto al agua, orgánicos, metales disueltos y microorganismos que se encuentran dentro y fuera de esta red. Esto

se debe a que las propiedades electrolíticas del agua, el grado de hidrofobia, la longitud, y el tipo de cadena (lineal o ramificada) de los polímeros en la matriz del gel pueden interactuar fuertemente entre sí, con el disolvente, o con solutos más pequeños y de esta forma definir las propiedades físicas de cada partícula de gel. Es por ello por lo que los geles poliméricos son una línea de investigación en la física moderna (Chin *et al.*, 1998). Los resultados de dichas investigaciones han sido y siguen siendo aplicados para el estudio de los procesos que afectan a la materia orgánica marina.

Actualmente se desconoce la relación que existe entre la degradación de sustratos y la dinámica de la comunidad bacteriana asociada a geles en la columna de agua (Mitulla *et al.*, 2016). Esto se debe en gran parte, a la dificultad para la visualización de los geles debido a sus propiedades ópticas (Johnson, 2008) así como a la especificidad de los métodos de cuantificación de los diferentes tipos de geles en función de sus componentes mayoritarios; polisacáridos para PET o proteínas para PTC (ver Tabla I.) (Engel, 2009). Esta última limita el entendimiento sobre el aporte de los diferentes tipos de geles a la fracción total de geles marinos (Maske y Almeda-Jauregui, 2017). Finalmente, la gran plasticidad de estos geles implica la transferencia constante de material entre los reservorios materia orgánica disuelta y particulada en el océano de suerte que la dicotomía entre COD/COP se vuelve menos significativa (Alldredge *et al.*, 1993).

Tabla 1. Clasificación de geles marinos por componente mayoritario y método de cuantificación asociado.

<i>Tipo de gel</i>	<i>Componente cuantificado</i>	<i>Método de cuantificación</i>
Partículas exopoliméricas transparentes (PET)	Polisacáridos ácidos	Tinción con azul alcian
Microgeles autoensamblables (MAE)	COD	Dispersión dinámica de luz
Partículas teñibles con Coomassie (PTC)	Proteínas	Tinción con azul de Coomassie
(algunas) Sustancias exopoliméricas (SEP)	Polisacáridos	COD por combustión a altas temperaturas

La materia orgánica es ubicua en el planeta y aproximadamente 662 Gt se encuentran secuestradas en forma de COD en el océano, mientras que la materia orgánica particulada abarca un estimado de, al menos, 30 Gt (Hansell *et al.*, 2009). Como se ha mencionado antes, existe un intercambio dinámico entre ambos reservorios de materia orgánica marina. Este intercambio juega un papel importante en procesos como el

ciclo del carbono, la biodisponibilidad de contaminantes y la formación de mucílagos y nieve marina (Chin *et al.*, 1998, Verdugo *et al.*, 2004). La formación de estos últimos conlleva el secuestro y transporte de carbono orgánico, así como áreas para el asentamiento y el desarrollo de bacterias (Azam y Malfatti, 2007). Adicionalmente, la conversión de MOD a macro agregados tiene una repercusión importante en la ecología marina al ser un proceso sin pérdida de carbono en la columna de agua (Kerner *et al.*, 2003). Ahora bien, dada la actual y creciente actividad antropogénica, el balance de MO en el océano está cambiando. Las fluctuaciones en los reservorios de carbono orgánico marino implican, a su vez, variaciones en el transporte de carbono y, por consiguiente, en la productividad biológica dada la función conectora de la MO entre los sistemas orgánicos e inorgánicos al proveer de energía y alimento a los microorganismos heterotróficos (He *et al.*, 2016).

Diversos modelos conceptuales se han propuesto para explicar el intercambio de la materia orgánica disuelta y particulada y estos se han enfocado en dos mecanismos. En el primero, denominado “mecanismo homogéneo”, algunos constituyentes de la MO tienen mayor participación mientras que otros, como los iones de calcio (Ca^{2+}), funcionan como ligandos. En el segundo, denominado “mecanismo heterogéneo”, además de los constituyentes de la MO, algunos minerales y coloides se ven involucrados. También es importante mencionar que la transferencia de MO entre reservorios involucra otros elementos como son la radiación solar y la presencia de microorganismos (Chin *et al.*, 1998; Kerner *et al.*, 2003; He *et al.*, 2016) (ver Anexo I).

La agregación es uno de los procesos fundamentales en los ecosistemas marinos puesto que facilita el transporte de materia orgánica hacia aguas profundas (Azam y Malfatti, 2007). Además, aumenta y define la conformación y el tamaño de la MOD cuando es degradada por los microorganismos en los diferentes estratos de la columna de agua (Azam y Malfatti, 2007; Verdugo y Santschi, 2010) El movimiento Browniano, el flujo turbulento, la filtración, la coagulación en la superficie de las burbujas y la unión mediada por cationes son considerados como los procesos principales que promueven agregación. El intercambio de materia que se da por movimientos Brownianos (movimientos aleatorios derivados choques entre partículas contenidas en un fluido) depende de la probabilidad de cohesión por colisión (coagulación pericinética). El flujo turbulento, por su parte, determina la frecuencia de colisión entre los agregados de tamaño $>1 \mu\text{m}$ en función de la energía cinética derivada de las colisiones entre partículas (coagulación ortocinética). Es decir, a baja turbulencia se promueve la formación de partículas. Por el contrario, si la turbulencia es alta, habrá una desagregación de estas partículas (He *et al.*, 2016). Por otro lado, la formación de burbujas por sedimentación o por turbulencia, promueve la floculación del material

disuelto concentrado en la interfase aire/agua por propiedades de polaridad (Chin *et al.*, 1998; Kerner *et al.*, 2003; He *et al.*, 2016).

Otro mecanismo de formación de partículas es la adsorción y controla la cantidad y la calidad tanto de la materia orgánica disuelta como de la particulada. La asociación de MOD con minerales disminuye la biodisponibilidad y degradación de estos y al mismo tiempo afecta su transporte. En cuanto a la adsorción, las fuerzas físicas intermoleculares (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) y los mecanismos químicos son los principales actores. Estos mecanismos son heterogéneos dado que involucran la participación de minerales, coloides y otros componentes de la MO como aminoácidos y sustancias húmicas (He *et al.*, 2016).

Con respecto a los factores que influyen el intercambio MOD-MOP, la mayor parte de los estudios se han centrado en las propiedades de la MO, los componentes iónicos y los organismos involucrados en el proceso (He *et al.*, 2016). En cuanto a las propiedades de la materia orgánica se refiere, las agregaciones con altos contenidos de minerales tenderán a aumentar de tamaño más rápidamente que aquellos con un bajo contenido mineral puesto que se favorece la adsorción de MOD. También, la composición química y la concentración de la materia orgánica determinan la dirección del intercambio (MOD a MOP o viceversa) (He *et al.*, 2016). Adicionalmente, el tamaño de la materia disuelta influye directamente en la agregación: moléculas como los polisacáridos se agregarán más fácilmente que los oligosacáridos, por ejemplo, simplemente por tener un tamaño más grande (He *et al.*, 2016). En cuanto a la composición iónica, los cationes polivalentes son los que se ven mayormente involucrados tanto en la agregación como en la adsorción. El aluminio (Al^{3+}) y el hierro (Fe^{3+}), por ejemplo, son los responsables de propiciar la adsorción en minerales ya que flocculan fácilmente en estos. Por su parte, los enlaces de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) favorecen la formación de agregados (Kerner *et al.*, 2003, He *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado antes, la materia particulada está definida como todo aquello que puede ser colectado con la ayuda de filtros con poros mayores a $0.45 \mu\text{m}$. De acuerdo con esta definición, las células del fitoplancton de tamaño igual o superior pueden ser catalogadas como MOP. Ahora bien, en biología, existe el concepto de que las células sometidas a altas presiones de filtrado pueden romperse y liberar así parte de su contenido (Sheldon, 1972). Dicho contenido está mayormente conformado por azúcares (carbohidratos) y proteínas, los cuales funcionan como precursores de los geles en suspensión (Orellana *et al.*, 2011). Por otro lado, las partículas gelatinosas que forman parte de la MOP también pueden fragmentarse fácilmente por acción mecánica (Alldredge *et al.* 1993; Verdugo *et al.*, 2004). Por consiguiente, en una muestra que es filtrada a altas presiones podría haber una disminución en la

concentración del material colectado con respecto a una muestra idéntica filtrada con baja presión. Con base en lo anterior, en un trabajo preliminar Maske y Almeda-Jauregui (2017), observaron que la concentración de COP en muestras sometidas a tratamientos con presiones diferenciales era inversamente proporcional a la presión de filtración (Figura 4). Es decir, las muestras tratadas con alta presión presentaban menores concentraciones COP que aquellas que fueron sometidas a bajas presiones. Sin embargo, ellos consideraron que, en este caso, las diferencias en la concentración de COP fueron probablemente resultado del rompimiento de geles más que del rompimiento de células.

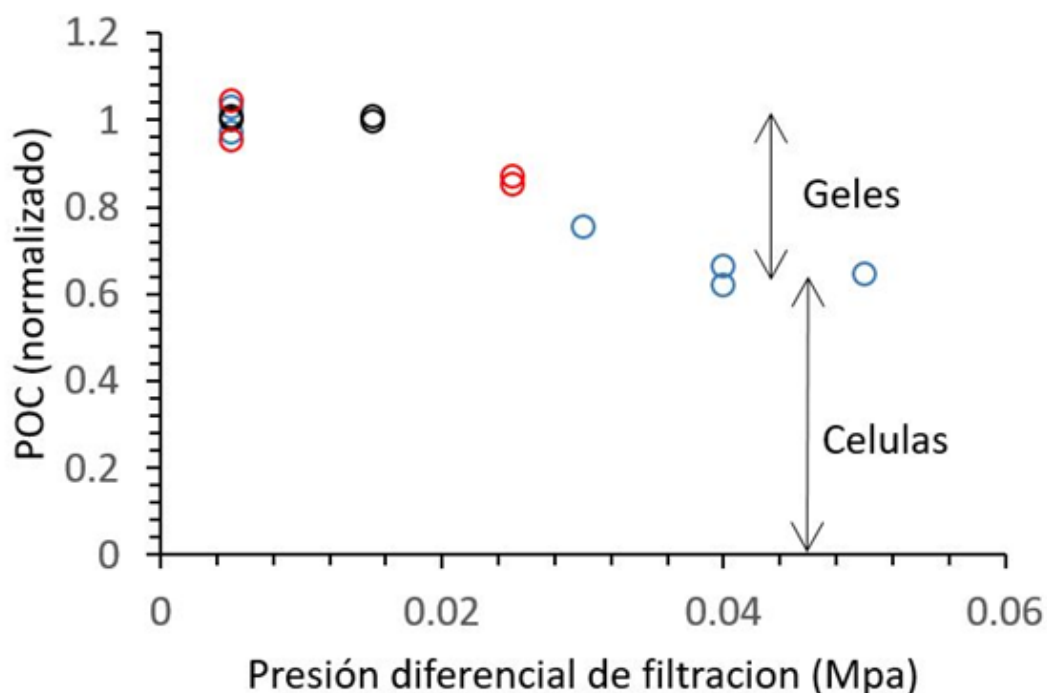


Figura 4. Carbono orgánico retenido por filtros GFF a diferentes presiones de filtración por presión. Muestras de tres diferentes cultivos de diatomeas indicado por color. Datos menos los blancos y normalizados a las muestras filtradas con 0.005 MPa. (Proporcionada por Maske y Almeda-Jauregui).

De acuerdo con estos resultados y con base a los pocos estudios que existen sobre la relación entre la fracción total de los geles en suspensión y las bacterias, se elaboró un protocolo que nos permitiera explorar y controlar la formación de partículas gelatinosas para, en un futuro, realizar bioensayos con bacterias. Si bien, los resultados preliminares fueron utilizados para conceptualizar este trabajo de investigación, se presentaron dificultades para reproducirlos y, por consiguiente, el enfoque de este trabajo cambió. De esta forma, nos hemos enfocado en la realización de pruebas de tipo metodológico para definir la relación entre la materia orgánica disuelta y los geles. Para ello se buscó una forma de estimar la concentración de geles a partir de mediciones de viscosidad, por un lado, y por el otro, mediante la colecta de material particulado mediante filtraciones.

1.3 Justificación

Los geles son una de las formas menos estudiadas de materia orgánica en el agua de mar. Si bien existe una cantidad importante de literatura sobre geles marinos en suspensión, como lo son las PET y las PTC, todavía se desconocen los mecanismos de formación, la facilidad con la que los geles pueden afectar el secuestro y transporte de carbono en la columna de agua, así como sus efectos sobre la ecología de microorganismos marinos, considerando la alta actividad y proporción de microbios adheridos a ellos. De esta manera los geles impactan los diferentes reservorios de carbono de manera significativa, un aspecto pobremente estudiado (Orellana y Leck, 2015). Esto se debe en gran medida a que las investigaciones sobre el papel de los geles en el océano están limitadas por la falta de una metodología integral para la cuantificación de geles en suspensión. La metodología para la determinación de PET, por ejemplo, ofrece información semi-cuantitativa sobre los carbohidratos presentes en este tipo de geles, se limita a partículas de tamaño superior a 0.45 μm y al mismo tiempo utiliza un estándar que representa una parte desconocida de la fracción total de los carbohidratos presentes en las PET (Hakspiel-Segura *et al.*, 2017).

El sesgo que existe en las investigaciones sobre geles orgánicos marinos aunado a la falta de información sobre la relación bacterias-geles derivaron en dos preguntas de investigación. La primera, ¿es posible cuantificar geles marinos de forma integral? Y la segunda, ¿cuál es el papel de los geles en la ecología microbiana marina? Para ello se planteó un diseño experimental en el que se concentrarían geles exudados por diatomeas (*Thalassiosira weissflogii*, elegida por ser una de las especies más utilizadas en las investigaciones de PET) mediante distintas técnicas de filtración y posteriormente se elaborarían bioensayos con bacterias. No obstante, dicho proyecto no consideraba el carácter altamente dinámico de los geles en suspensión. Dada la importancia de esta plasticidad, primero se debe explorar el potencial de formación de geles para, posteriormente, establecer las bases que permitan determinar la existencia de la relación funcional entre los geles oceánicos y la comunidad microbiana. En este proyecto se propone realizar una examinación experimental del potencial de formación de geles a través de diversas aproximaciones metodológicas como lo son pruebas bajo diferentes condiciones de presión y la estimación y cuantificación de geles con mediciones de COP y PET como referencia.

1.4 Hipótesis

El carbono orgánico particulado colectado de los filtrados de muestras de MOP de agua de mar está parcialmente compuesto de geles. Las partículas gelatinosas están en balance dinámico con la materia orgánica disuelta y esto se refleja como un potencial de formación de geles en filtrados de MOP.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar y controlar la formación de geles en suspensión en muestras de agua de mar.

1.5.2 Objetivos específicos

- I. Cuantificar el potencial del agua de mar para formar geles.
- II. Explorar los aspectos metodológicos para cuantificar geles por composición elemental.
- III. Examinar la relación entre la concentración de geles y viscosidad.
- IV. Estudiar el potencial de reensamblaje de geles en filtrados.
- V. Evaluar la posibilidad de controlar los geles presentes para investigar su papel en la ecología microbiana.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Adquisición de muestras

2.1.1 Muestras de cultivos

Se obtuvieron muestras de cultivos densos de diatomeas (*Pseudonitzchia* sp. y *Thalassiosira weissflogii*) (Tabla 2). El cultivo de *Pseudonitzchia* fue proporcionado por el Dr. Ricardo Cruz-López mientras que los cultivos *T. weissflogii* (CCMP1336) fueron mantenidos con medio L1 en incubadores a una temperatura promedio de 19°C a partir de la cepa adquirida de NCMA Bigelow.

Tabla 2. Número de cultivos, clave de identificación y relación de muestras colectadas a partir de cada uno.

<i>Especie</i>	<i>Número de cultivos utilizados</i>	<i>Identificador</i>	<i>Muestras colectadas</i>
<i>Pseudonitzchia</i> sp.	1	Pn	COP, NOP, CI
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	4	Tw1, Tw2, Tw3, Tw	COP, NOP, CI

2.1.2 Muestras naturales

Se colectaron muestras de agua de mar en diferentes estaciones oceanográficas ubicadas dentro y fuera de la bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California. Una estación en la línea de costa (Coral), tres estaciones dentro de la bahía (BTS1, BTS2 y BTS3) y una estación oceánica (Antares) (Tabla 3).

Tabla 3. Detalles ambientales, fechas y métodos de colecta de muestras en campo.

<i>Estación</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Ambiente</i>	<i>Profundidad máxima (m)</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Método de muestreo</i>	<i>Fecha de colecta</i>
Coral	31.8612°N 116.6596°W	Costero	<20	Agua superficial cerca de la playa	Balde oceanográfico	28/01/2018
BTS1	31.7798°N 116.6615°W	Costero	~23	Agua superficial a varios kilómetros de la playa	Botellas Niskin	21/03/2018
BTS2	31.8339°N 116.6564°W	Costero	~20	Agua superficial a varios kilómetros de la playa	Balde oceanográfico	01/03/2018
BTS3	31.7997°N 116.6549°W	Costero	~20	Agua superficial a varios kilómetros de la playa	Balde oceanográfico	14/06/2018 05/11/2018
Antares	31.7387°N 116.9536°W	Oceánico	~1100	Agua de mar de diferentes profundidades (2, 12, 100, 600 y 950 m)	Botellas Niskin	21/03/2018

2.2 Colecta y cuantificación de microgeles orgánicos marinos

Se filtraron muestras naturales y muestras de cultivos de microalgas a través de filtros de fibra de vidrio GF/F de 47 y de 25 mm de diámetro previamente calcinados a 450 °C durante 4 horas (reducción del tamaño de poro de 0.7 a $\leq 0.5 \mu\text{m}$ (Abdel-Moati, 1990; Nayar y Chou, 2003)). Los volúmenes filtrados fueron de 500 a 1500 mL para muestras naturales y de 100 a 500 mL para muestras de cultivos. Se realizaron filtraciones con bomba de vacío y filtraciones con presión, en ambos casos se controlaban y midieron cuidadosamente las presiones diferenciales. Una vez filtrada la muestra a través de filtro de 47 mm, se procedió a cortar el filtro partes iguales. Es importante mencionar que se utilizó una base de corte

en la que se identificaron las porciones con el fin de destinar siempre la misma porción a cada variable. Las muestras destinadas para COP se colocaron en viales de vidrio previamente calcinados a 450 °C por 4 horas. Todas las muestras fueron etiquetadas y almacenadas en congelación a -20 °C. En el caso de los filtros de 25 mm, estos fueron destinados íntegros para cada una de las variables. Adicionalmente se colectaron muestras para cuantificación de partículas exopoliméricas transparentes (PET) y de bacterias antes de cada filtración de muestras naturales.

Con base a los patrones observados en experimentos previos, se realizaron pruebas para determinar si la presión de filtración influye directamente en la cantidad de COP colectado en los filtros. Para ello se filtraron las muestras con presiones diferenciales (presión baja, 0.005 MPa y presión alta, 0.05 MPa). Adicionalmente, se realizaron filtraciones secuenciales de los filtrados obtenidos con baja presión. Estos se mantuvieron a 4°C durante 24 horas y se realizaron filtraciones intermedias con baja presión (0.005 MPa) a los tiempos 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas de refrigeración (Figura 5). Entre cada una de las filtraciones se hizo la colecta de los filtros. Así mismo, se realizaron pruebas utilizando filtros GF/F de dos marcas distintas (Whatman y Millipore, pruebas con filtros de 25 y 47 mm) para determinar si la manufactura de estos influye en la cantidad de COP colectado. Adicionalmente, se realizaron pruebas de representatividad para las porciones de los filtros de 47 mm de diámetro.

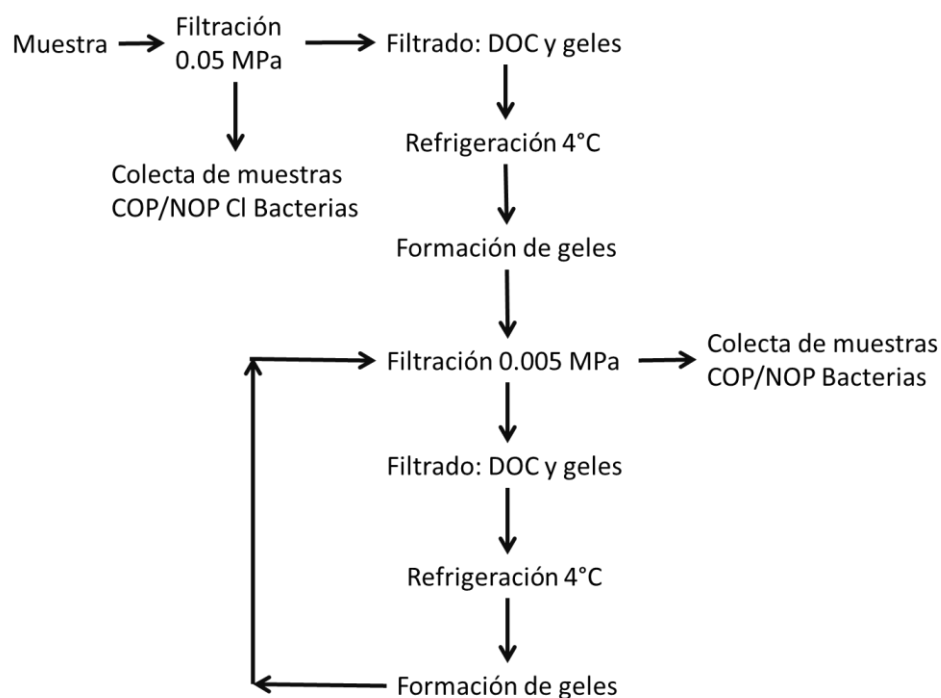


Figura 5. Esquema general para la realización de filtraciones secuenciales para la cuantificación de geles marinos. Las colectas de COP/NOP se realizaron con filtros de GF/F calcinados.

Dado que la metodología para cuantificación de COP implica el uso de filtros calcinados, se decidió probar si el tiempo de calcinación tiene un efecto en la conformación de los filtros y por lo tanto en la capacidad de retención de partículas. Para ello se calcinaron filtros de fibra de vidrio de 25 mm de ambas marcas, Whatman y Millipore, durante 4 y 12 h. Del mismo modo, la metodología estándar para COP establece que las muestras deben ser acidificadas para eliminar el carbono inorgánico particulado (CIP). Como el pH afecta drásticamente la formación de geles en suspensión (Verdugo, 2012) se decidió probar si al acidificar las muestras, la cantidad de COP era menor a la encontrada en una réplica sin acidificar.

2.2.1 Carbono Orgánico Particulado (COP) y Nitrógeno Orgánico Particulado (NOP)

Las mediciones de carbono orgánico particulado se realizaron a partir de muestras de agua de mar filtrada a través de filtros de fibra de vidrio GF/F previamente calcinados. Para su análisis, se secaron los filtros a 60°C durante 6 h. Una vez secos, se seleccionaron algunas muestras para ser colocadas en un desecador de vidrio con ácido clorhídrico concentrado (HCl, 12 N) durante 12 a 24 h con el propósito de eliminar carbono inorgánico particulado (CIP) con los vapores del ácido. Posteriormente se sacaron los filtros del desecador y se dejaron durante una hora en la campana de extracción para eliminar los vapores excedentes de HCl antes de volverlos a secar en la estufa a 60°C por 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se almacenaron todos los filtros en un desecador hasta ser analizadas por pirolisis y cuantificación con un detector de conductividad térmica. Para ello se introdujeron en un Analizador Simultáneo de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno y Azufre (Vario Micro Cube, Elementar) con el modo operacional CHN. Una vez terminado el análisis de las muestras, se procedió a corregir manualmente las integraciones de los picos de los cromatogramas arrojados por el software del analizador. Esto debido a una determinación de la línea base automática poco confiable y a limitaciones de la integración de los picos por el programa del instrumento, los cuales resultaban en sobre o subestimaciones de las integraciones. Posteriormente se determinó la concentración de COP (NOP) ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en las muestras con base a las áreas de sus picos en los cromatogramas, restando las áreas de los blancos (ver abajo) y de la calibración obtenida a partir de la cantidad de moles de carbono (nitrógeno) (α y β respectivamente) presentes en diferentes pesajes de un estándar de acetanilida y en función del volumen de muestra filtrado (V_f) (ecuaciones 1 y 2). De igual modo, se calculó la razón carbono-nitrógeno (C/N) para cada muestra.

$$[\text{COP}] = \frac{\alpha * p}{V_f} \quad (1)$$

$$[\text{NOP}] = \frac{\beta * p}{V_f} \quad (2)$$

Donde p es un factor que depende del tipo de filtro utilizado para coleccionar la muestra: filtros de 47 mm, $p=4$ y filtros de 25 mm, $p=1$.

Para el análisis de estas muestras se utilizaron dos tipos de blancos de GF/F: a) filtros calcinados nuevos se introdujeron directamente en el Analizador Elemental, estos se denominaron “Blancos Secos” y b) filtros calcinados nuevos humedecidos con 2 mL de muestra, estos se denominaron “Blancos húmedos” y recibieron el mismo tratamiento: secado-acidificación-secado-análisis para las muestras que fueron acidificadas o secado-análisis para aquellas que no fueron acidificadas.

2.2.2 Colecta y cuantificación de partículas exopoliméricas transparentes (PET) y sus precursores (p-PET)

Se coleccionaron aproximadamente 200 mL de agua de mar en botellas de polietileno de alta densidad (HDPE) antes y después de ser sometidas a tratamientos de filtración utilizando dos presiones diferenciales (0.005 y 0.05 MPa, FBP y FAP, respectivamente). Las muestras sometidas a los tratamientos de filtración fueron mantenidos a 4°C por 48 h previo a la colecta de PET y sus precursores. La colecta de PET se realizó de acuerdo con la metodología de Passow y Alldredge (1995) filtrando 100 mL de muestra a través de filtros de policarbonato de 0.45 μm de tamaño de poro (Nuclepore, Whatman, 25 mm) mientras que para la colecta de precursores de PET se filtraron 100 mL de muestra a través de filtros de policarbonato con tamaño de poro de 0.2 μm (Nuclepore, Whatman, 25 mm) (Hakspiel-Segura *et al.*, 2017); ambas filtraciones se realizaron con una presión de vacío suave y constante (10-15 kPa). Enseguida se agregó 1 mL de solución de trabajo de azul alcian (0.02% en 0.06% de ácido acético, pH 2, prefiltrada por 0.2 μm) tratando de cubrir completamente el filtro, se dejó unos segundos, se filtró hasta que el filtro quedase seco. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua Milli-Q (prefiltrada por 0.2 μm) para eliminar el excedente de colorante en la muestra. Para los blancos se filtró 1 mL de agua Milli-Q y se realizó la tinción como en el resto de las muestras. Se colocaron los filtros en microviales de 2 mL y se almacenaron a -20°C hasta la extracción. Para la extracción de los PET y p-PET se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 80% y se dejaron durante 3 h en oscuridad. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se midió la absorbancia de las muestras a 787 nm con un espectrofotómetro Lambda 40 UV/VIS (Perkin Elmer). Para calcular la concentración de PET y sus precursores, primero se realizaron las curvas de

calibración de absorbancia a partir de una solución stock de goma de Xantano ($0.11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (una curva para cada tamaño de poro). Los cálculos se realizaron de acuerdo con la ecuación propuesta por Villacorte *et al.* (2015) (ecuación 3), las concentraciones se expresan en equivalentes de goma de Xantano ($\mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$). Posteriormente se estimó el contenido de carbono ($\mu\text{g C}\cdot\text{mL}^{-1}$) presente en PET y p-PET con un factor de equivalencia promedio 0.63 (Engel, 2004).

$$TEP = \frac{A_m - A_b}{m_{787} * V_f} \quad (3)$$

Donde A_m es la absorbancia de la muestra, A_b es la absorbancia del blanco, m_{787} es la pendiente de la curva de calibración con goma de Xantano y V_f es el volumen de muestra filtrado.

2.2.3 Colecta y cuantificación de bacterias

Se colectaron 5 mL de muestra de agua de mar y se agregó una solución de formaldehído amortiguado con borato de sodio a una concentración final de 2%. Se tomó 1 mL de la muestra fijada y se agregaron 10 μL de una solución de trabajo de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, 500 μM) y se incubó por 10 minutos en la oscuridad. Se filtró a través de un filtro de policarbonato negro con tamaño de poro de 0.2 μm y 25 mm de diámetro (Poretics); mismo que se montó en un portaobjetos con 20 μL de una solución anti-blanqueamiento previamente preparada (50% glicerol y 50% PBS con p-fenilenediamina al 0.1%). La preparación fue observada en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss con un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión de baja fluorescencia. Se seleccionaron campos al azar hasta contar ≥ 300 células por muestra. La abundancia celular se estimó de acuerdo con la ecuación 4.

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\bar{x} * F}{V} \quad (4)$$

Donde \bar{x} es el promedio de células por campo, F es el cociente entre el área del filtro y el área de la rejilla de conteo y V es el volumen de muestra filtrado.

2.3 Viscosidad

Se realizaron varias pruebas con la finalidad de reportar cambios en la viscosidad y por lo tanto la presencia de geles en muestras sometidas a tratamientos de filtraciones con presiones diferenciales. Para ello se diseñó un dispositivo compuesto por una columna de altura variable en la que se colocó la muestra, una serie de capilares sumergidos en un baño maría para mantener estable la temperatura y un área de colecta (Figura 6). El paso de la muestra a través de los capilares fue accionado con válvulas solenoides temporizadas. Se realizaron distintos tipos de pruebas en las que se utilizaron uno o varios de los arreglos siguientes: 1) dos capilares de distinto calibre (1.57 mm y 0.5 mm), 2) dos capilares del mismo calibre (0.5 mm) y distinta longitud (1 y 2 m), 3) calibración con agua destilada y con un baño maría a diferentes temperaturas (10, 20, 30 y 40°C), 4) ajuste de la altura de la columna para modificar la presión (20, 50 y 100 cm de altura), 5) diferentes tiempos de refrigeración de muestras (0, 4 y 24 h) y 6) filtros de membrana con tamaño de poro de 1 μm . Para todas las pruebas se registró el peso de los colectores antes y después del paso de la muestra y se calculó el flujo en $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$. Para la viscosidad se utilizaron como referencia los valores reportados por Collings y Bajenov (1983) (ver Anexo II).

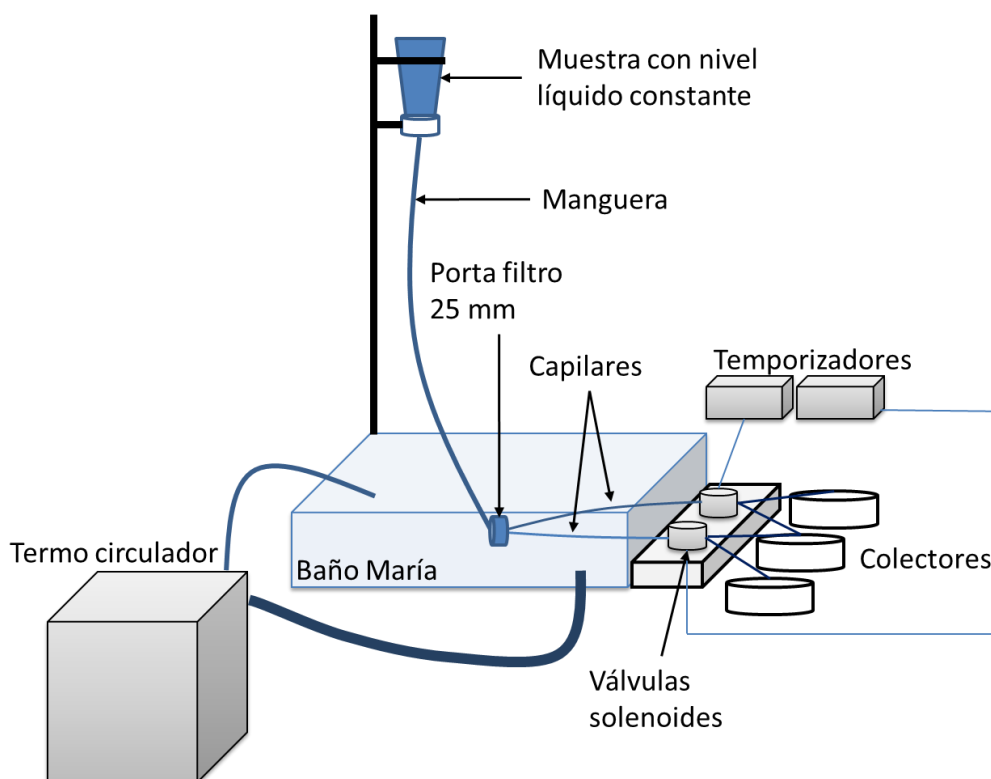


Figura 6. Dispositivo diseñado para medir la viscosidad. El dispositivo está compuesto por una columna de altura variable en la que se coloca la muestra, una serie de capilares sumergidos en un baño maría para mantener la temperatura de la muestra, una zona de válvulas controlados con temporizadores y un área de colectores.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Comparación de filtros

3.1.1 Marca Whatman vs Marca Millipore

Se realizó una prueba con dos diferentes marcas de filtros GFF para determinar si la manufactura de estos influye directamente en la cantidad de material colectado al proporcionar una mayor área de adsorción. En este trabajo se utilizaron filtros Whatman y filtros Millipore, cuya principal diferencia es el grosor (0.42 y 0.47 mm, respectivamente de acuerdo con las especificaciones de cada marca). Las filtraciones de agua de mar superficial se realizaron con bomba de vacío utilizando dos presiones diferenciales: 0.005 MPa y 0.05 MPa. Los tratamientos con presión diferencial se realizaron con el fin de determinar si al utilizar mayor presión se disminuye la cantidad de material particulado. Los resultados de la prueba indican que no hay diferencias significativas (prueba t, $p=0.10$) en la cantidad de material colectado con ambos tipos de filtro. Tampoco se observaron diferencias significativas (prueba t, $p=0.47$) entre tratamientos de presión (Figura 7). En cuanto a la relación C/N, se obtuvieron valores alrededor de 9, para ambos tipos de filtro y con ambos tratamientos con presión (Figura 8).

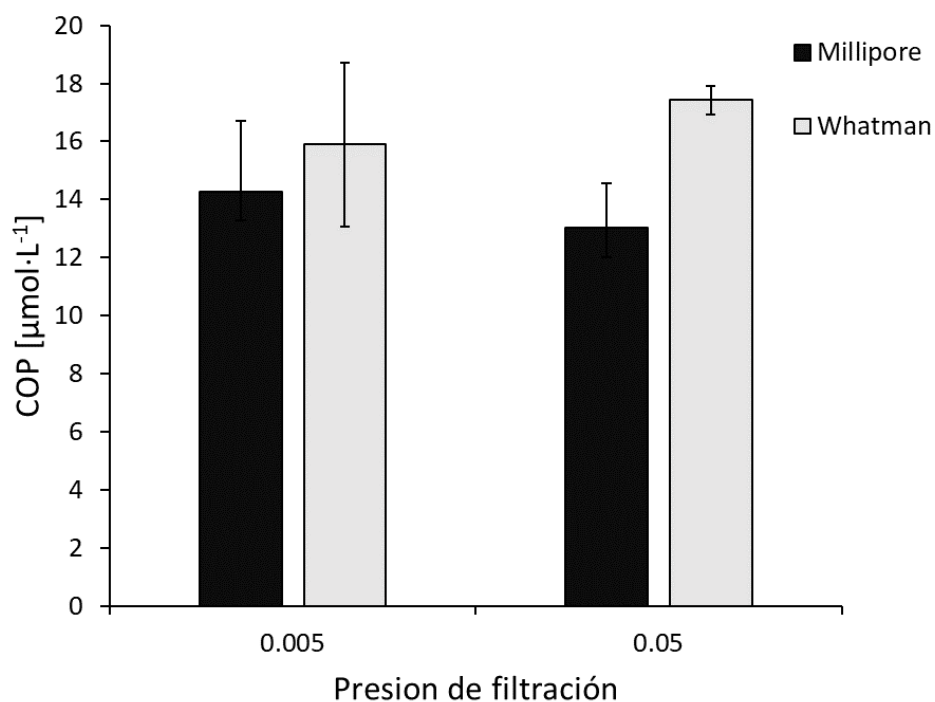


Figura 7. Carbono orgánico particulado colectado de muestras de agua de mar con dos marcas de filtros GF/F (Whatman y Millipore) filtradas con dos presiones diferenciales (0.005 MPa y 0.05 MPa) mediante vacío. Las barras de error indican la desviación estándar (n=6).

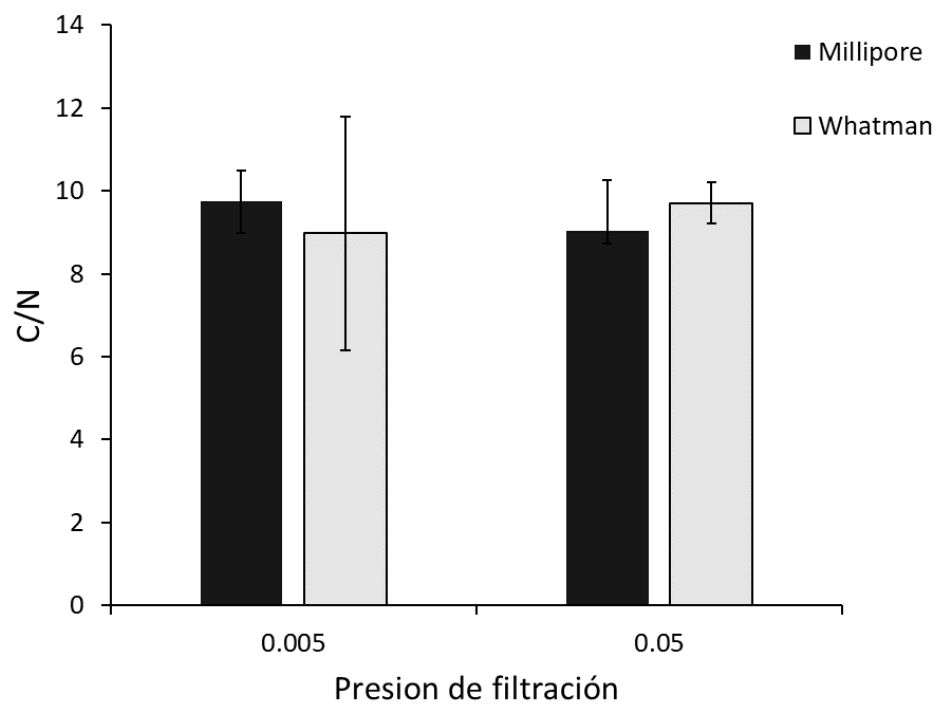


Figura 8. Relación carbono nitrógeno de muestras de agua de mar con dos marcas de filtros GF/F (Whatman y Millipore) filtradas con dos presiones diferenciales de vacío (0.005 MPa y 0.05 MPa). Las barras de error indican la desviación estándar (n=6).

3.1.2 Tiempos de calcinación y tipo de filtración

La materia orgánica marina se divide en dos fracciones en función de su tamaño. La colecta de la fase particulada se realiza con filtros de fibra de vidrio calcinados. La calcinación reduce el tamaño del poro operacional de 0.7 a 0.5 μm aproximadamente (Abdel-Moati, 1990). Para determinar si mayor tiempo de calcinación implica mayor colecta de material, se realizó una prueba en la que se calcinaron filtros de fibra de vidrio a 450 °C durante 4 (tiempo de calcinación utilizado comúnmente) y 12 horas. Esta prueba se realizó con muestras de agua de mar superficial.

Los resultados de la Figura 9 muestran que la concentración de COP no tiene un patrón que se pueda relacionar con el tiempo de calcinación de los filtros. Las concentraciones de COP en filtros calcinados durante 4 h fueron similares a las encontradas en filtros de 12 h. Esto fue confirmado con la prueba estadística de Mann-Whitney ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos periodos de calcinación ($p=0.72$).

Adicionalmente a las pruebas de calcinación se hizo una prueba con dos tipos de filtración: filtración con bomba de vacío y filtración con presión. Para ambos tipos de filtración (vacío y presión) se utilizó una presión de filtrado baja (0.005 MPa) y se filtró el mismo tipo y volumen de agua de mar superficial. Los resultados de esta prueba arrojaron diferencias significativas (Mann-Whitney, $p=0.004$) entre ambos tipos de filtración (Figura 9). Además, se observaron diferencias significativas (Mann-Whitney, $p= 0.004$) en la relación carbono nitrógeno obtenido de las muestras filtradas con presión ($C/N \sim 10.5$) y las muestras filtradas con vacío ($C/N \sim 13.2$) (Figura 10).

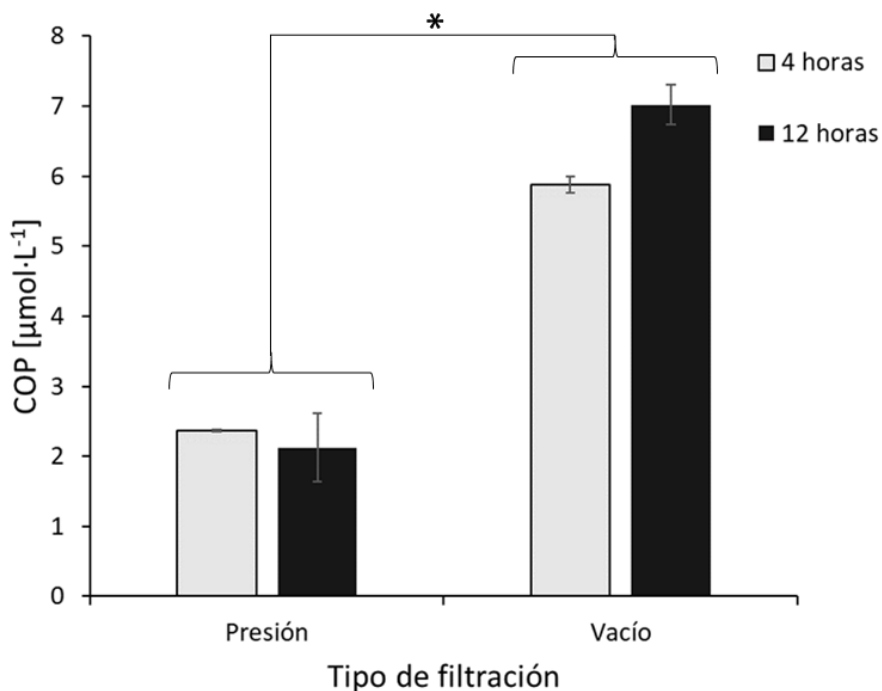


Figura 9. Carbono orgánico particulado estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio sometidos a diferentes tiempos de calcinación (4 y 12 h). La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=8). *Diferencias entre filtración por presión y vacío.

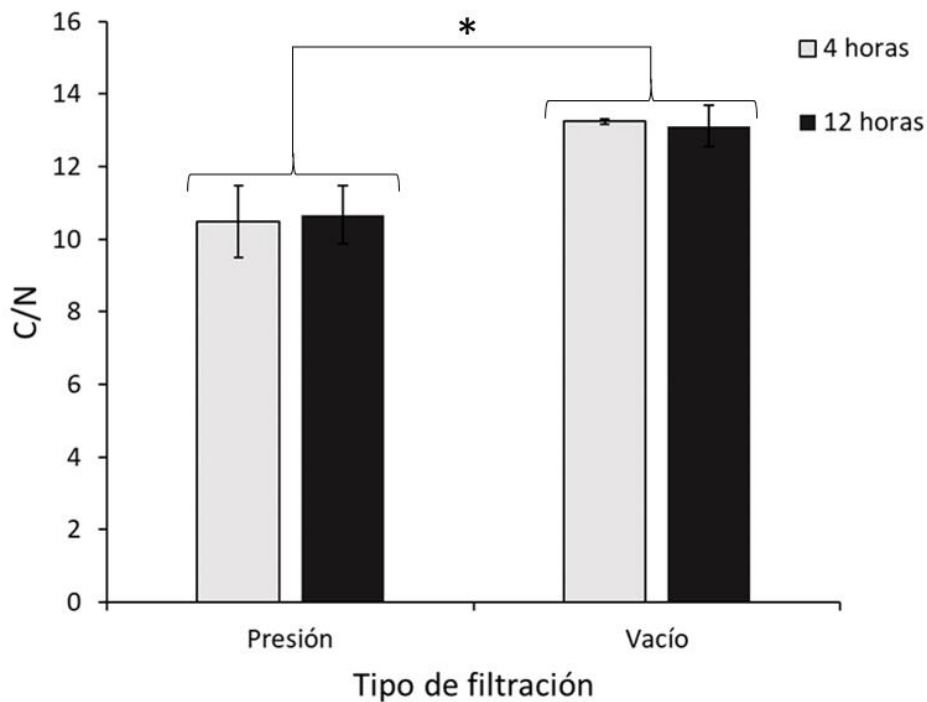


Figura 10. Relación carbono/nitrógeno estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio sometidos a diferentes tiempos de calcinación (4 y 12 h). La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=8). *Diferencias entre filtración por presión y vacío.

3.1.3 Representatividad de la distribución de COP en filtros de 47 mm

Se realizó una prueba para determinar si la distribución de una muestra de COP es homogénea sobre filtros de 47 mm. Para ello se utilizaron filtros GF/F calcinados de las marcas Whatman y Millipore. Los filtros se cortaron en cuatro porciones iguales. La filtración se realizó por vacío a baja presión (0.005 MPa). Las muestras utilizadas fueron muestras de agua de mar superficial.

Los resultados de carbono orgánico particulado obtenidos indican que no hay diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p=0.47$) entre las porciones de los filtros y presentan un comportamiento más bien homogéneo (Figura 11). Por su parte, las relaciones carbono nitrógeno muestran mayor variabilidad entre las porciones de un mismo filtro (filtro M3, por ejemplo), sin embargo, tales diferencias no son estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p=0.47$).

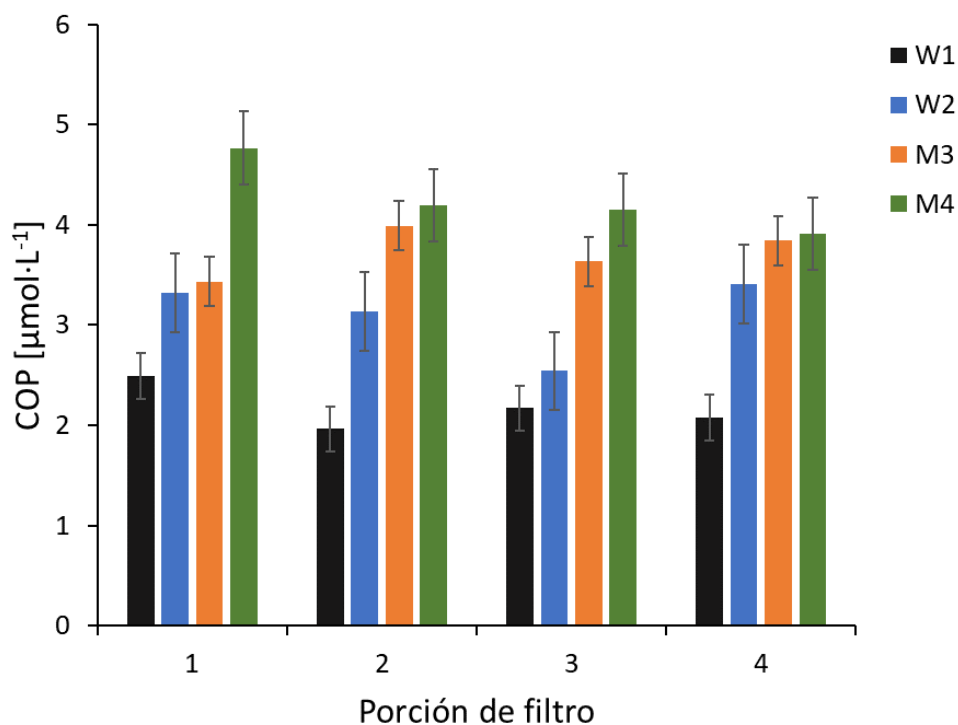


Figura 11. Carbono orgánico particulado estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio (Whatman (W) y Millipore (M)) de 47 mm y cortados en cuatro porciones iguales. La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar ($n=4$).

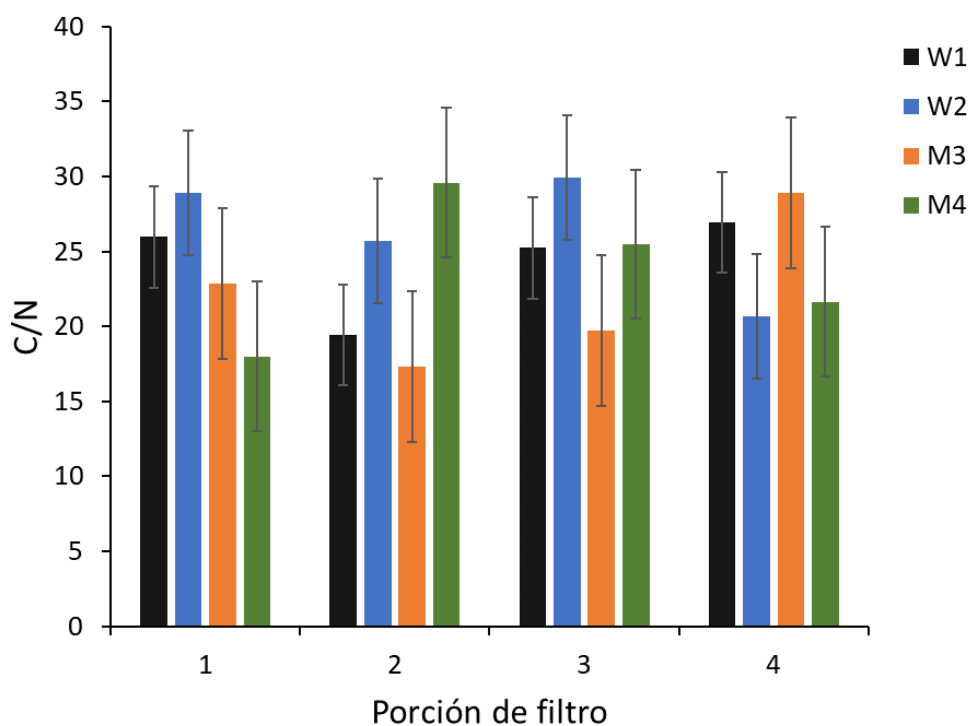


Figura 12. Relación carbono/nitrógeno estimado a partir del material colectado en filtros de fibra de vidrio (Whatman (W) y Millipore (M)) de 47 y cortados en cuatro porciones iguales. La filtración se realizó a 0.005 MPa con filtración por vacío y filtración por presión. Las barras de error indican la desviación estándar (n=4).

3.2 Cuantificación de microgeles orgánicos marinos

La cuantificación de geles orgánicos formados en suspensión es compleja debido al gran rango de tamaño en el que estos pueden encontrarse aunado a la facilidad con la que estos pueden agregarse y desagregarse. Del mismo modo, las características fisicoquímicas de cada uno de estos geles varían en función de las condiciones dominantes en el momento de su formación por lo que su carácter químico varía constantemente. Esto resulta en una gama de estructuras tridimensionales formadas de los mismos componentes orgánicos, pero en distintas proporciones. Ahora bien, uno de los métodos para la cuantificación de geles en suspensión más utilizados como indicador es la cuantificación de PET. Este método fue descrito por Passow y Alldredge (1995) y se basa en la estimación de la concentración de estas partículas exopoliméricas transparentes colorimétricamente.

3.2.1 Determinación de PET y precursores de PET (p-PET)

Se colectó material particulado ($>0.45 \mu\text{m}$) y material disuelto ($0.45 \mu\text{m} > \text{MD} > 0.2 \mu\text{m}$) tanto de las muestras de agua de mar sin filtrar, así como de las muestras de agua de mar filtradas. Las concentraciones de partículas exopoliméricas transparentes ($>0.45 \mu\text{m}$) estimadas a partir del material colectado en los filtros presentaron valores entre 0.13 y $2.15 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$ (promedio: $1.06 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$) mientras que la concentración de precursores de PET ($0.45 \mu\text{m} > \text{p-PET} > 0.2 \mu\text{m}$) estuvo entre 2.28 y $56 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$ (promedio: $10.37 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 13). Es importante mencionar que los valores de p-PET de la muestra de referencia (AM $0.2 \mu\text{m}$) incluyen tanto PET como sus precursores puesto que esta no se filtró de manera secuencial. Dado que se hizo una colecta de PET con el mismo tipo de muestra (AM $0.45 \mu\text{m}$) se presume que la diferencia entre ambas muestras de referencia es un aproximado de la cantidad de precursores presentes. Las concentraciones máximas tanto de PET como de p-PET se encontraron en las muestras superficiales (2 y 12 m, respectivamente) que no fueron sometidas a los tratamientos de filtración con presión diferenciales (Figura 13). En el caso de los precursores, el máximo coincidió con la ubicación del máximo de clorofila para el día de muestreo (datos no mostrados). En términos de carbono, los valores se encontraron entre 0.08 y $1.36 \mu\text{g C}\cdot\text{mL}^{-1}$ y entre 2.12 y $35.95 \mu\text{g C}\cdot\text{mL}^{-1}$ para PET y p-PET, respectivamente.

En cuanto a las muestras con tratamientos de presión, las prefiltraciones se realizaron con filtros de fibra de vidrio calcinados para eliminar la presencia de material particulado (en el que se incluirían PET debido al tamaño de poro operacional estimado de 0.45 a $0.5 \mu\text{m}$) y se mantuvieron a 4°C para propiciar la formación de agregados a partir del material disuelto remanente en los filtrados y minimizar la actividad fisiológica de las bacterias. La concentración de partículas exopoliméricas transparentes formadas en estas muestras fueron similares a los encontrados en las muestras de referencia.

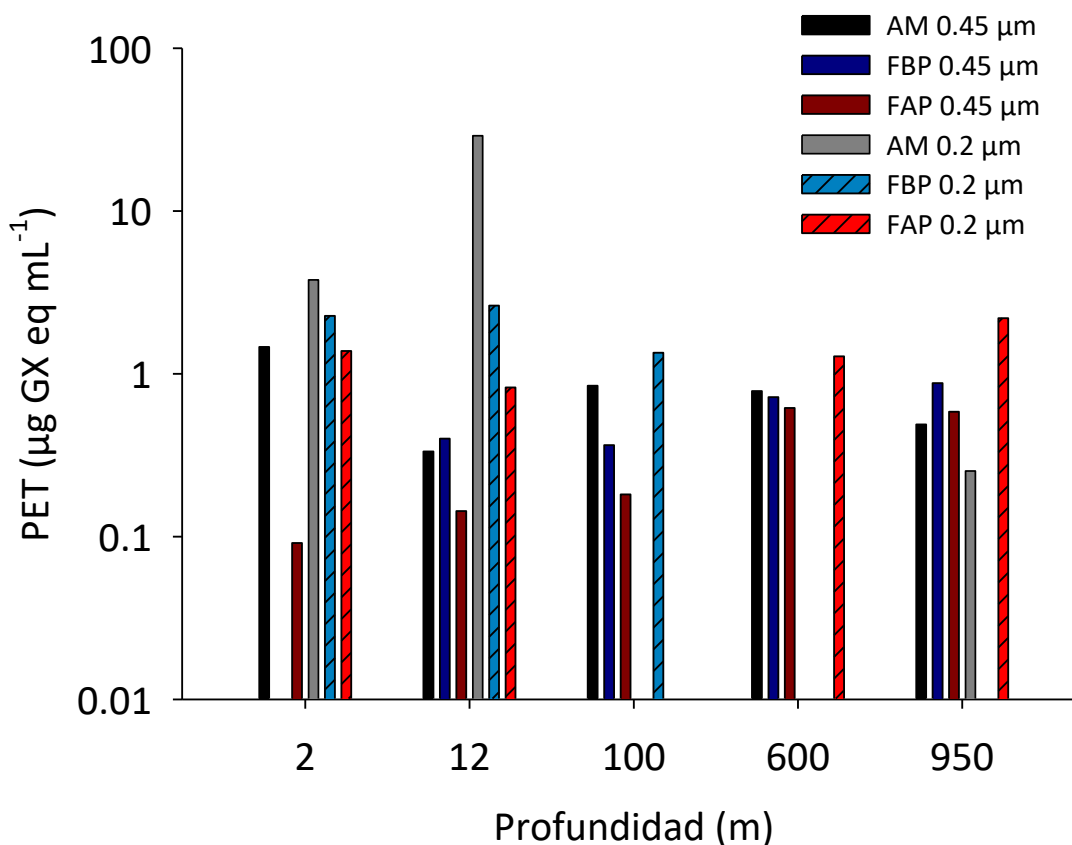


Figura 13. Concentración de PET (>0.45 µm) y p-PET (>0.2 µm) estimadas en muestras naturales sin prefiltrar (AM) y en muestras prefiltradas con baja y alta presión (FBP y FAP, respectivamente). La colecta de PET y p-PET de las muestras FBP y FAP se realizó 48 horas después de la primera filtración. Las muestras fueron colectadas en la estación Antares.

En cuanto a la distribución vertical, tanto los PET como sus precursores muestran una ligera tendencia a disminuir con el aumento de la profundidad en todas las muestras excepto en dos casos: 1) el material colectado con filtro de 0.45 µm de muestras prefiltradas a baja presión (Figura 14a perfil FBP) presenta su mínimo de PET en superficie para posteriormente aumentar hacia los 12 m y mantenerse con el aumento en profundidad y 2) la cantidad de precursores de PET colectados de las muestras profundas (600 y 950 m) prefiltradas a alta presión es ligeramente superior a las encontradas en las muestras superficiales prefiltradas a alta presión (Figura 14b perfil FAP).

La concentración de p-PET teñidos con azul alcian fue de 3 a 89 veces (promedio 11 veces; mediana: 7) mayor que la cantidad de PET colectados. Los resultados de las pruebas estadísticas (Tabla 4) mostraron que no existen diferencias entre los tratamientos de presión ni para PET ni para p-PET. Del mismo modo, no hay diferencias significativas entre los PET y p-PET encontrados entre las muestras sin filtrar y las muestras prefiltradas. La cantidad de PET y p-PET formados en los filtrados durante las 48 h a 4°C iguala

las cantidades encontradas en las muestras que no fueron sometidas a tratamientos de filtración con presión diferencial. La presión diferencial no parece afectar la cantidad de moléculas orgánicas que pasan a través del filtro. Los valores negativos que se observan en la Figura 14 son resultado de los altos blancos que se obtuvieron en el análisis de las muestras.

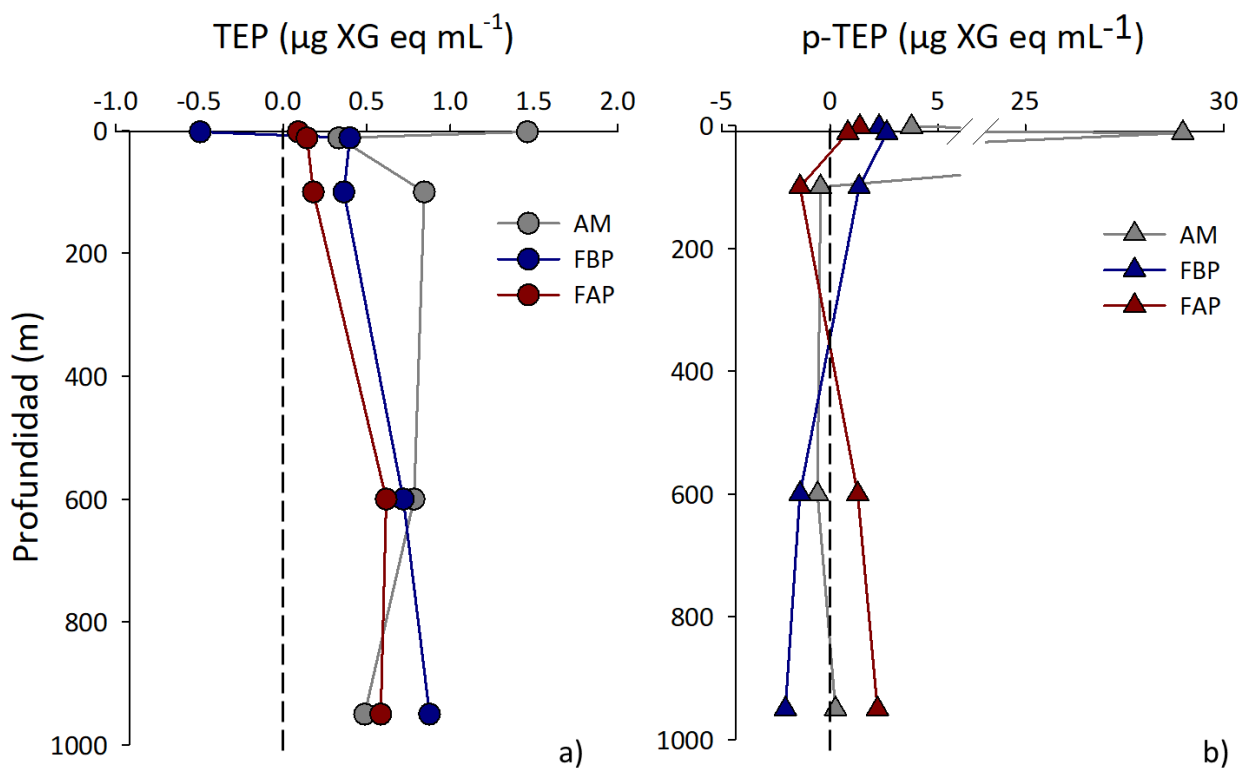


Figura 14. a) Perfiles de PET ($>0.45 \mu\text{m}$) y b) precursores de PET ($>0.2 \mu\text{m}$) presentes en muestras de agua de mar (AM) y en filtrados de agua de mar 48 horas después de haber sido sometidas a dos tratamientos de presión diferencial 0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP). Las muestras fueron colectadas en la estación Antares.

Tabla 4. Pruebas estadísticas para la comparación de la concentración de PET (>0.45 μm) y p-PET (>0.2 μm) presentes en muestras de agua de mar (AM) y en filtrados de agua de mar 48 horas después de haber sido sometidas a dos tratamientos de presión diferencial 0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP) (n=5).

<i>Comparación de grupos</i>	<i>Prueba estadística</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Resultado</i>
AM 0.45 μm vs FBP 0.45 μm	t-student	0.219	No hay diferencias significativas
AM 0.45 μm vs FAP 0.45 μm	t-student	0.076	No hay diferencias significativas
FBP 0.45 μm vs FAP 0.45 μm	t-student	0.856	No hay diferencias significativas
AM 0.2 μm vs FBP 0.2 μm	Mann-Whitney	0.548	No hay diferencias significativas
AM 0.2 μm vs FAP 0.2 μm	Mann-Whitney	1.000	No hay diferencias significativas
FBP 0.2 μm vs FAP 0.2 μm	t-student	0.797	No hay diferencias significativas

3.2.2 Acidificación de muestras vs no acidificación

Las partículas gelatinosas son muy dinámicas puesto que se agregan y se disuelven constantemente. Uno de los factores que influye su fragmentación es el pH. La metodología típica para la cuantificación de carbono orgánico particulado incluye una etapa de acidificación con el fin de eliminar cualquier carbono inorgánico que pudiese estar presente en la muestra. Por lo que se realizó una prueba en la que se sometió un grupo de muestras al tratamiento típico de acidificación con vapor de ácido clorhídrico (HCl, 12 N) mientras que otro grupo de muestras no recibió tratamiento con ácido. Para esta prueba se utilizaron muestras de cultivos de diatomeas diluidos al 20%, filtrados de muestras de cultivos refrigerados durante 24°C y filtrados de muestras sometidas a dos tratamientos de presión diferencial.

Las muestras que fueron sometidas a los tratamientos con ácido no mostraron diferencias significativas (Mann-Whitney, $p=0.82$) con respecto con set de muestras no acidificadas. La cantidad de carbono orgánico particulado colectado de los filtrados de ambos tratamientos de presión, así como del cultivo, son similares (Figura 15). En cuanto la razón C/N, las muestras de filtrados presentan valores ligeramente más elevados que las muestras de cultivo (COP casi exclusivamente compuesto de células) (Figura 16).

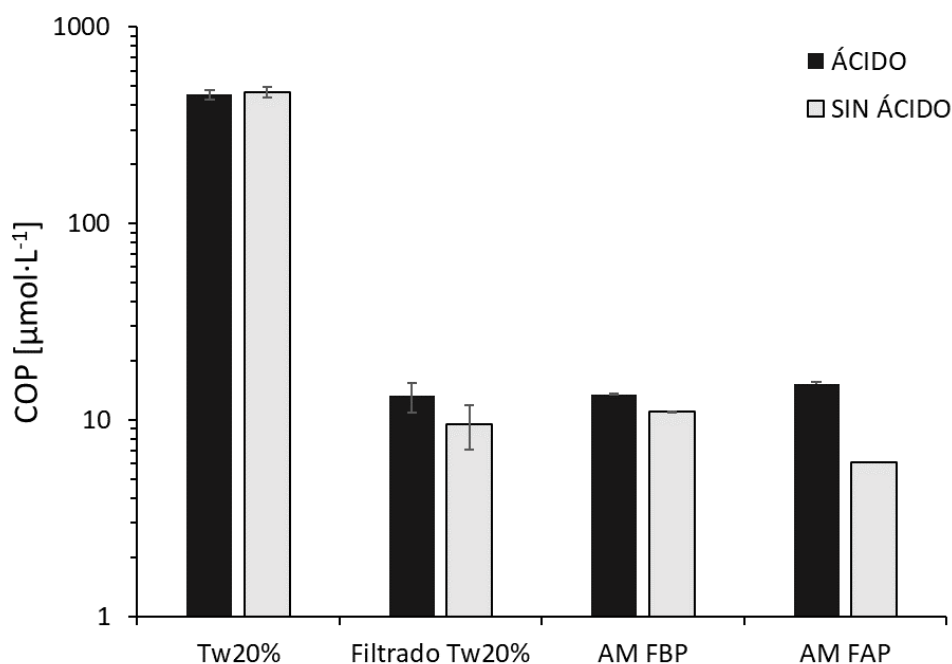


Figura 15. Carbono orgánico particulado de muestras de cultivos de *Thalassiosira weissflogii* diluido al 20% (Tw20%), en los filtrados de estas mismas muestras después de 24 horas en refrigeración (Filtrado Tw20%) y en muestras de agua de mar filtradas con presiones diferenciales (0.005 y 0.05 MPa, FBP Y FAP, respectivamente) sometidas a tratamientos de acidificación y no acidificación. Las barras de error indican la desviación estándar (n=12).

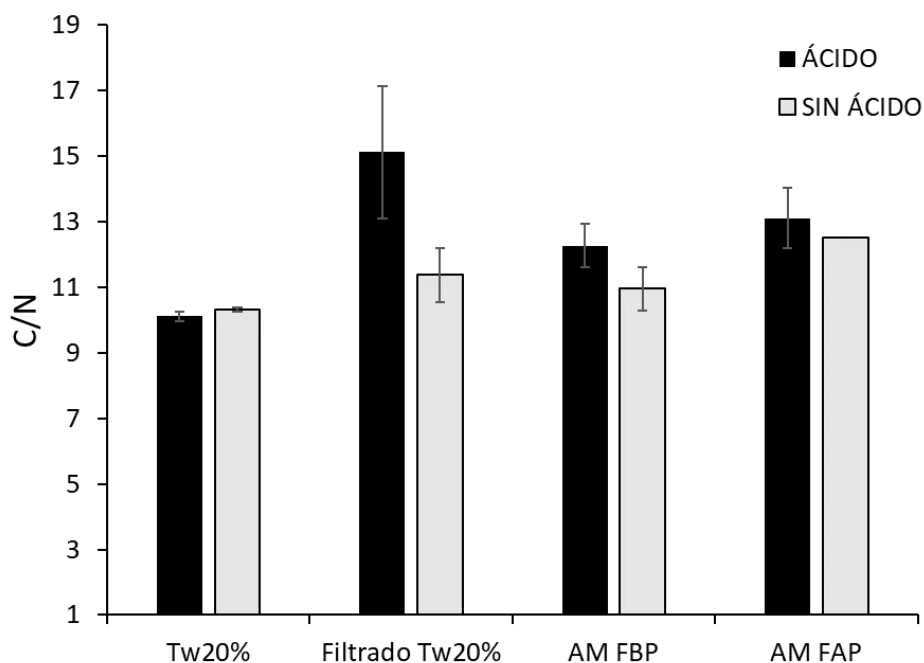


Figura 16. Relación carbono/nitrógeno en muestras de cultivo de *Thalassiosira weissflogii* diluido al 20% (Tw 20%), en los filtrados de estas mismas muestras después de 24 horas en refrigeración (Filtrado Tw 20%) y en muestras de agua de mar filtradas con presiones diferenciales de 0.005 y 0.05 MPa, (FBP Y FAP, respectivamente) sometidas a tratamientos de acidificación y no acidificación. Las barras de error indican la desviación estándar (n=12).

3.2.3 Carbono Orgánico Particulado (COP) y la relación C/N

Hasta ahora no se ha considerado que los geles marinos en suspensión puedan ser cuantificados como COP a pesar de ser una fracción considerable de la materia orgánica particulada. Por ello se realizaron experimentos para determinar si al utilizar dos tratamientos de presión diferencial, la cantidad de COP colectado presentaba diferencias. Esto con base a la gran plasticidad de las partículas gelatinosas y la facilidad con la que pueden fragmentarse. Las concentraciones de COP encontradas en las diferentes muestras no presentan diferencias significativas (Mann-Whitney, $p > 0.005$) entre ambas presiones de filtración (Figura 17). La relación carbono-nitrógeno en las muestras presenta un patrón general con valores entre 6 (muestras naturales) y 11 (cultivos) para ambos tratamientos de filtrado (Figura 18).

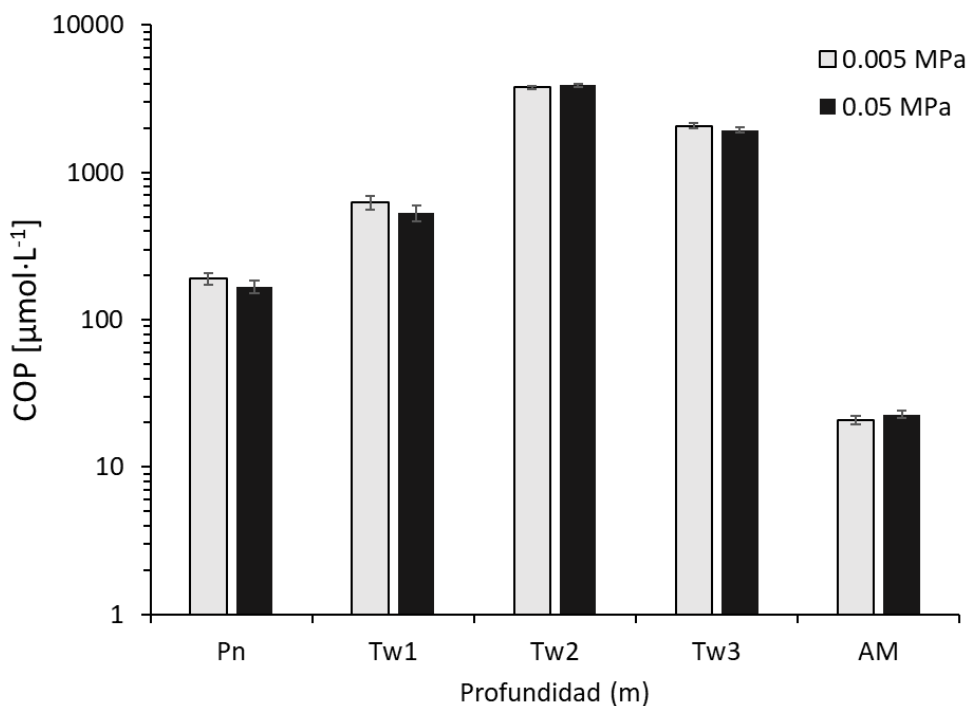


Figura 17. Concentración de carbono orgánico particulado (COP) en muestras de cultivos de diatomeas (Pn y Tw) y en muestras naturales (AM) sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío. Las barras de error indican la desviación estándar ($n=5$).

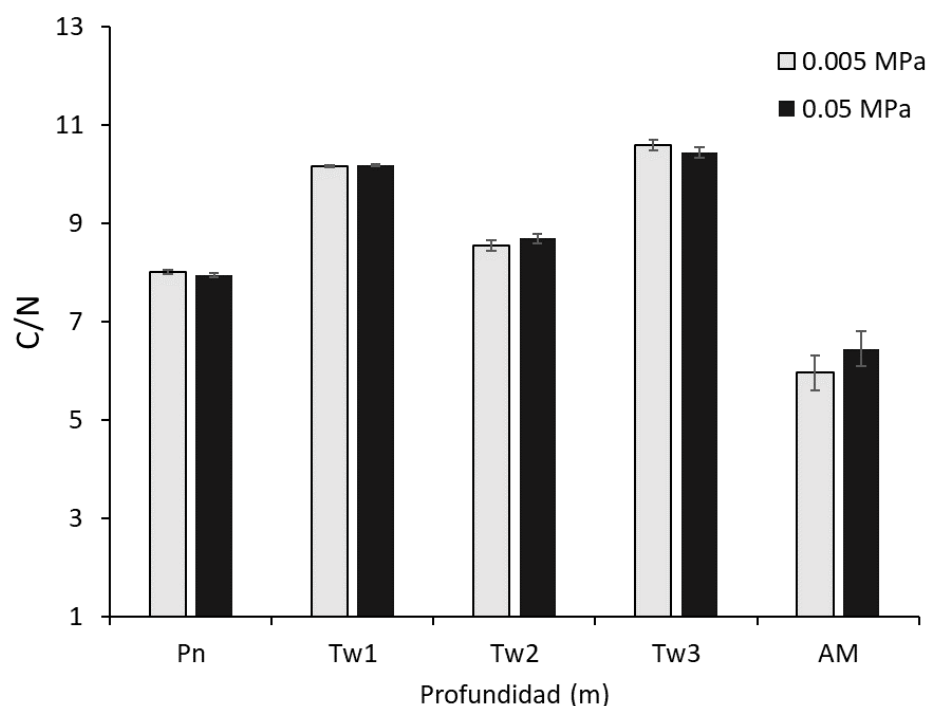


Figura 18. Relación Carbono-Nitrógeno en muestras de cultivos de diatomeas (Pn y Tw) en muestras naturales (AM) sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío. Las barras de error indican la desviación estándar (n=5).

Se realizó el mismo tipo de experimento con muestras discretas de agua de mar de distintas profundidades y provenientes de un ambiente oceánico. En cuanto a la distribución vertical de carbono orgánico particulado, se obtuvo un perfil típico con altos valores en superficie y una disminución con el aumento de la profundidad. Al igual que en el experimento con cultivos de diatomeas, no se encontraron diferencias significativas (prueba t, $p=0.89$) entre los tratamientos (Figura 19a). La proporción carbono-nitrógeno muestra un patrón general con valores alrededor de 8 en superficie, una disminución hacia profundidad y un aumento hacia los 600 m para disminuir nuevamente (Figura 19b).

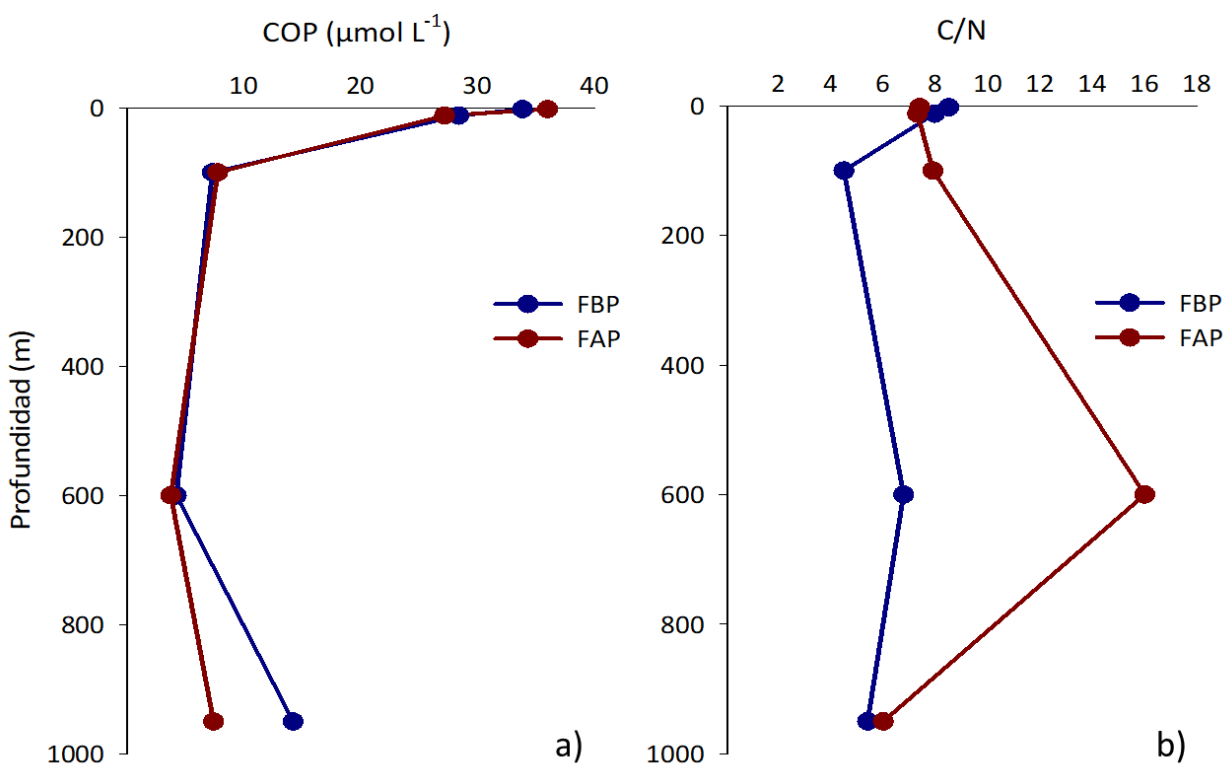


Figura 19. Distribución vertical de carbono orgánico particulado (a) y distribución vertical de la relación carbono nitrógeno(b) obtenido a partir de muestras naturales tomadas en la estación Antares (ambiente oceánico) y sometidas a dos tratamientos de filtración por vacío (0.005 MPa (FBP) y 0.05 MPa (FAP)).

Adicionalmente a los experimentos de presión diferencial, se realizaron experimentos de filtraciones secuenciales en los que se utilizó agua de mar superficial, agua de mar profunda y muestras de cultivos. Para las filtraciones secuenciales se utilizó una baja presión (0.005 MPa) y los filtrados se mantuvieron a 4°C durante un período de 24 h. Se realizaron re-filtraciones de los filtrados a distintos tiempos (Tabla 5). Esto se realizó para determinar el potencial de formación de geles en muestras sin material particulado (COP removido por filtración).

Los resultados de los experimentos de filtraciones secuenciales indican que existe formación de partículas a partir de MOD presente en las muestras después de que material particulado ha sido removido. Además, este comportamiento se presentó en periodos de tiempo relativamente cortos (2 h). Se observó también que, por lo general, las concentraciones de COP formado en los filtrados fueron menores a la concentración de COP inicial y presentaron valores de alrededor del 10% inicial. Se encontraron concentraciones de COP formado en los filtrados más altas que la concentración de COP inicial. Esto ocurrió en filtrados de agua de mar superficial refrigerados durante un período de tiempo de 24 h (Figura

20). En cuanto a la relación de carbono y nitrógeno, los valores abarcan un rango muy amplio, desde 1 hasta ~ 150 . El grueso de las muestras tiene valores entre 10 y 50 (Figura 21).

Tabla 5. Periodo de refrigeración de muestras para filtraciones secuenciales y tipo de material colectado

<i>Período de refrigeración</i>	0	1	2	3	4	5	6
<i>Tiempo en horas</i>	0	0	2	4	6	24	48
<i>Tipo de muestra colectada</i>	COP COD adsorbido	Geles COD adsorbido	Geles COD adsorbido	Geles COD adsorbido	Geles COD adsorbido	Geles COD adsorbido	Geles COD adsorbido

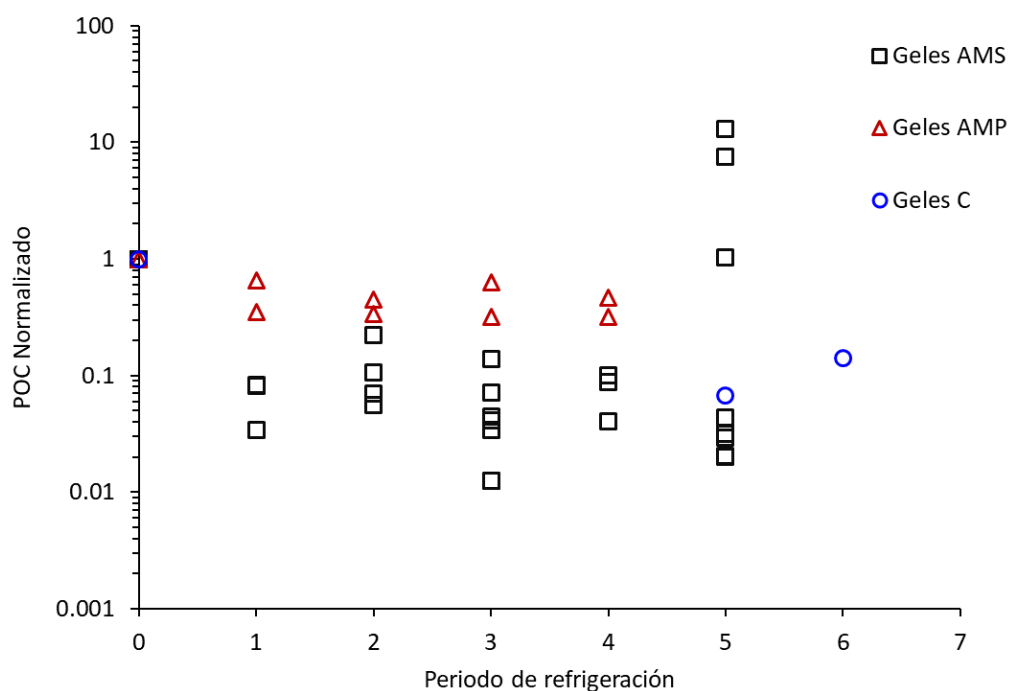


Figura 20. Carbono orgánico particulado colectado en filtraciones secuenciales de filtrados de muestras de agua de mar superficial (AMS), agua de mar profunda (AMP) y cultivos (C). Los datos son normalizados a las concentraciones de la primera filtración de la muestra.

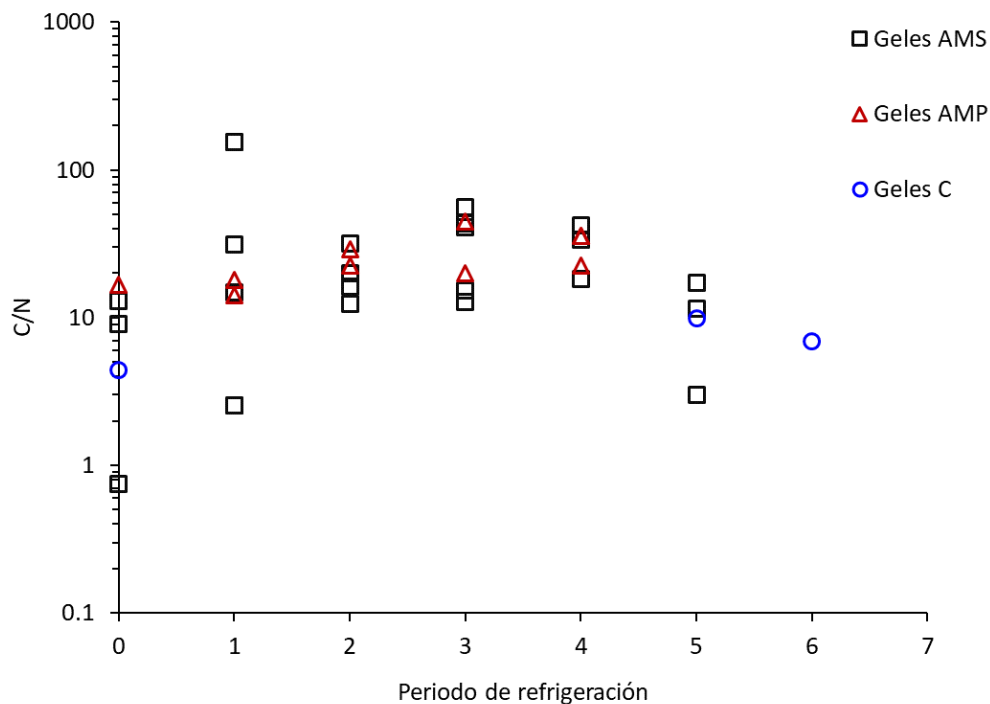


Figura 21. Relación C/N en filtrados de muestras de agua de mar superficial (AMS), agua de mar profunda (AMP) y cultivos (C).

3.2.4 Abundancia bacteriana

Adicionalmente a la colecta de COP, se tomaron muestras para conteos bacterianos al inicio de los experimentos y a lo largo de las filtraciones secuenciales para descartar la posibilidad de que la colecta de material particulado fuese resultado de un crecimiento bacteriano en la muestra. Estas pruebas se realizaron con muestras naturales sometidas a ambos tratamientos por presión y con muestras naturales sin tratamientos de presión diferencial. Para las muestras sin tratamiento de presión, se utilizó tanto agua de mar superficial como profunda.

En la Figura 22 se observa que la abundancia bacteriana inicial para agua superficial presentó valores de 4.6 a 8.2×10^5 cel mL⁻¹ mientras que las muestras de agua profunda presentaron valores de 3.5 a 5.2×10^4 cel mL⁻¹. También se observa que durante la primera filtración (colecta de COP inicial), la cantidad de bacterias se reduce entre 25 y 50% tanto para muestras superficiales como profundas. En las muestras sometidas a los tratamientos de presión, no se observan diferencias entre los tratamientos y además presentan un comportamiento distinto a las muestras sin tratamientos de presión cuyos periodos de

refrigeración fueron más cortos. En el primer caso, muestras tratadas con presión, la abundancia bacteriana parece mantenerse a lo largo del experimento mientras que, en el segundo caso, se observa una disminución sistemática de la cantidad de bacterias presentes en las muestras entre filtraciones. Esta tendencia es más evidente en las muestras de agua superficial que en las muestras profundas.

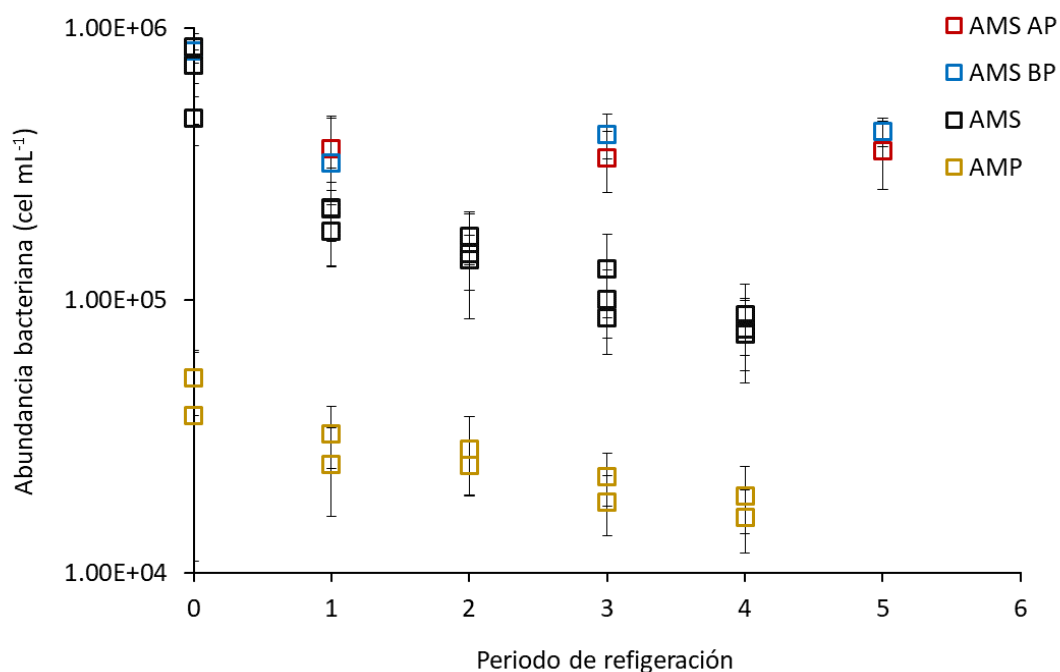


Figura 22. Abundancia bacteriana en muestras de filtraciones secuenciales de agua de mar superficial y profunda (AMS y AMP, respectivamente) y en muestras de agua de mar sometidas a tratamientos de presión diferencial (AMS AP y AMS BP) (ver Tabla 5 para los periodos de refrigeración). Las barras de error indican la desviación estándar

3.3 Viscosidad

Se ha reportado que la presencia de geles modifica la viscosidad del agua del mar. Por esta razón, se realizaron pruebas para determinar la viscosidad y, de ser posible, utilizar esta variable como indicador rápido de la presencia de geles en las muestras.

3.3.1 Medición de viscosidad con presión diferencial constante y resistencia dinámica de capilares.

El método para la medición de la viscosidad se confirmó utilizando agua destilada a diferentes temperaturas. Para optimizar el diseño experimental se hicieron pruebas con diferentes presiones diferenciales y diferentes resistencias dinámicas en forma de capilares de diferentes diámetros (calibre) y longitudes. El volumen de agua que pasó durante un período electrónicamente controlado fue utilizado como señal. Dado que se conoce la viscosidad dinámica de agua del mar a diferentes temperaturas, se pudo establecer una curva de calibración entre el volumen/tiempo y la viscosidad para capilares de distinto largo y para los capilares de distinto calibre.

Para las pruebas de viscosidad de muestras de cultivos, se utilizaron cultivos de diatomeas (prueba distinta longitud) y cultivos de dinoflagelados para la prueba con distintos calibres. Las muestras fueron sometidas a dos tratamientos con presiones diferenciales y se mantuvieron en distintas condiciones (ver Tabla 6) Las pruebas para viscosidad con resistencia dinámica de muestras de cultivos se realizaron con baño de agua a 10°C (ver Figura 6).

Tabla 6. Identificador de muestras utilizadas para las pruebas de viscosidad con capilares de distintos calibres y longitudes

<i>Identificador</i>	1	2	3	4
<i>Tipo de muestra</i>	Cultivo sin filtrar	Cultivo filtrado sin refrigerar	Cultivo filtrado y refrigerado 2 horas	Cultivo filtrado y refrigerado 24 horas

3.3.1.1 Capilares de distinto calibre

Los resultados de las distintas muestras de cultivos a través de un capilar grueso no presentaron un patrón claro ni entre tratamientos de presión ni entre condiciones de refrigeración. El flujo de estas muestras presentó valores en un intervalo entre 0.38 y 0.41 g s⁻¹. Estos valores son consistentes para muestras a temperaturas de 10°C o menos. En cuanto al flujo registrado para las muestras a través del capilar delgado, el flujo no presentó variaciones ni entre tratamientos de presión ni entre tiempos de refrigeración. En este caso, el flujo para todas las muestras fue de aproximadamente 0.062 g s⁻¹ (Figura 23).

En la Figura 24a se observa que existe una respuesta de la muestra, en este caso agua destilada, en función de la temperatura del baño de agua, a mayor temperatura mayor flujo en ambos capilares. Ahora bien, esta tendencia ascendente es mucho más marcada en el capilar delgado que en el capilar grueso. Es importante recalcar que la tendencia de flujo en función de la viscosidad del agua es inversamente proporcional a la temperatura (Figura 24b).

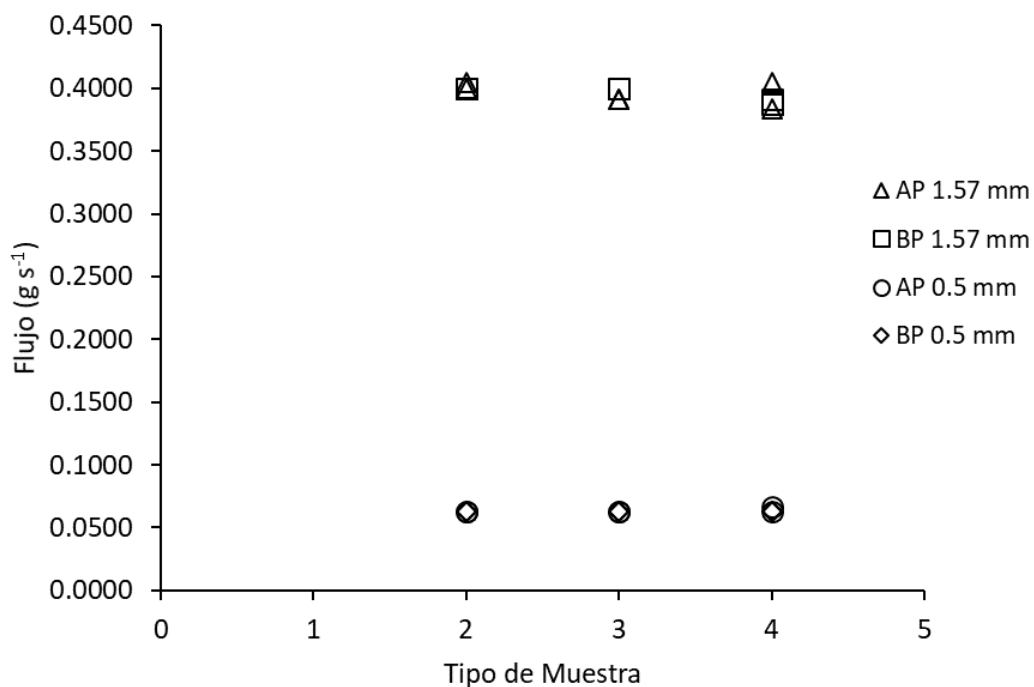


Figura 23. Viscosidad de muestras de cultivos de dinoflagelados filtradas a con baja (0.005 MPa, BP) y alta presión (0.05 MPa, AP) a través de capilares de distinto calibre (1.57 mm y 0.5 mm). El tipo de muestra se refiere al tiempo de refrigeración (ver tabla 6).

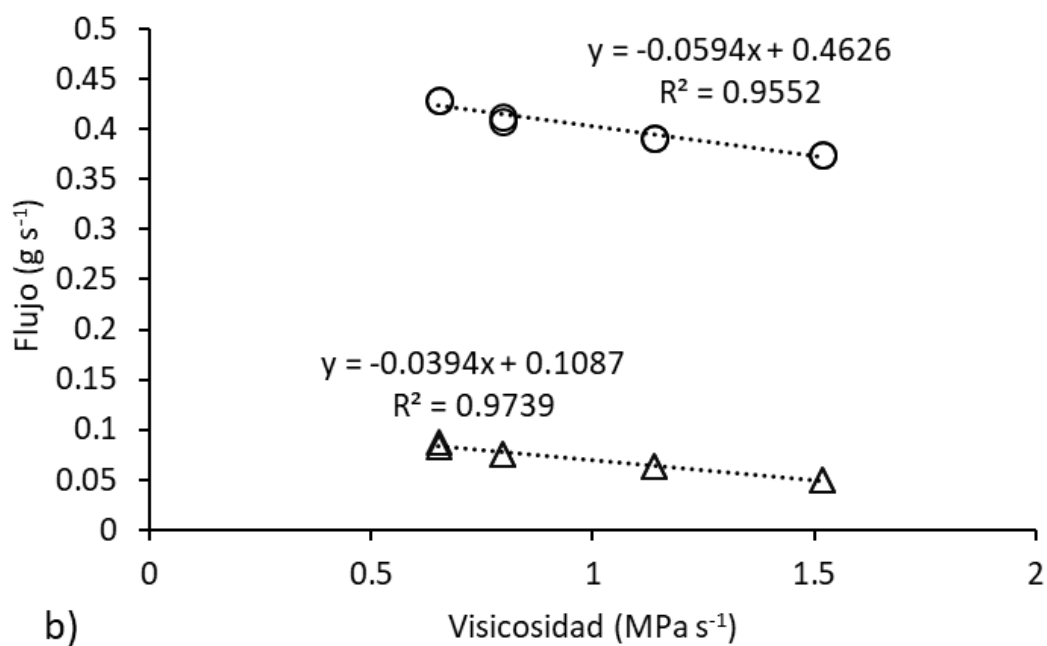
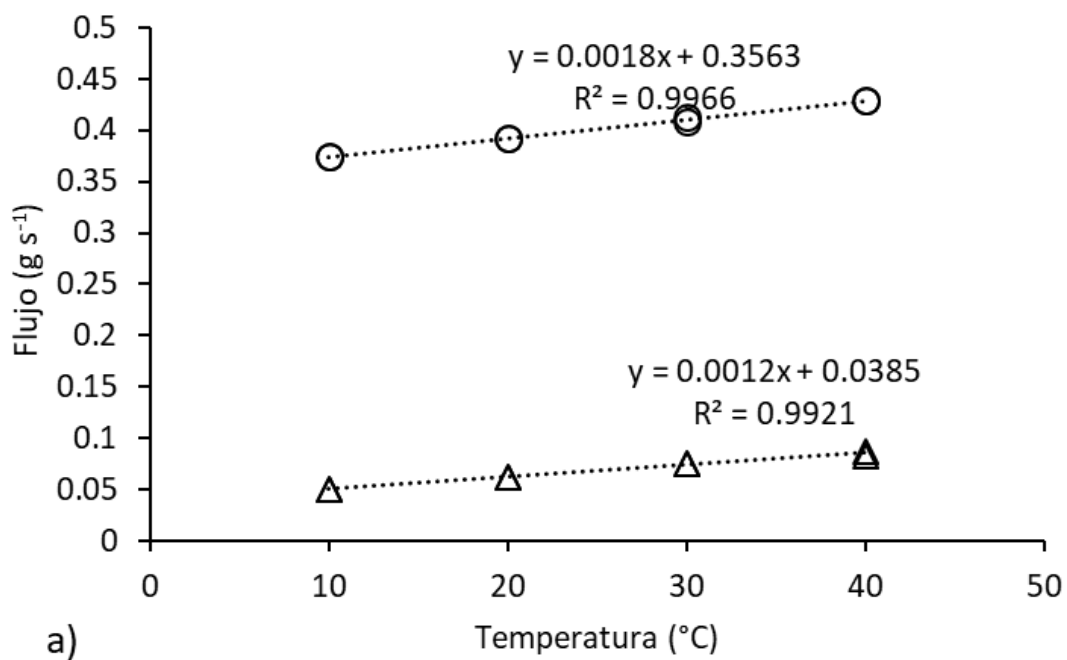


Figura 24. Flujo de agua destilada a través de capilares de dos calibres diferentes: grueso, 1.57 mm (círculos) y delgado, 0.5 mm, (triángulos) en función de a) temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y b) viscosidad (MPa s^{-1}).

3.3.1.2 Capilares de distinta longitud

Los resultados de las distintas muestras a través de capilares de distintas longitudes parecen indicar que la viscosidad de las muestras filtradas y refrigeradas es menor que la viscosidad en muestras filtradas sin refrigerar. El flujo de estas muestras presentó valores en un intervalo entre 0.005 y 0.025 g s^{-1} para el capilar de 2 m y de 0.01 a 0.07 g s^{-1} para el capilar corto (Figura 25).

En la Figura 26 a se observa que la respuesta de la muestra, agua destilada, está directamente relacionada con la temperatura. Es decir, el flujo del agua a temperaturas más bajas es menor que a altas temperaturas. Esto se observa en ambos capilares. En este caso, el flujo en función de la viscosidad del agua es inversamente proporcional a la temperatura.

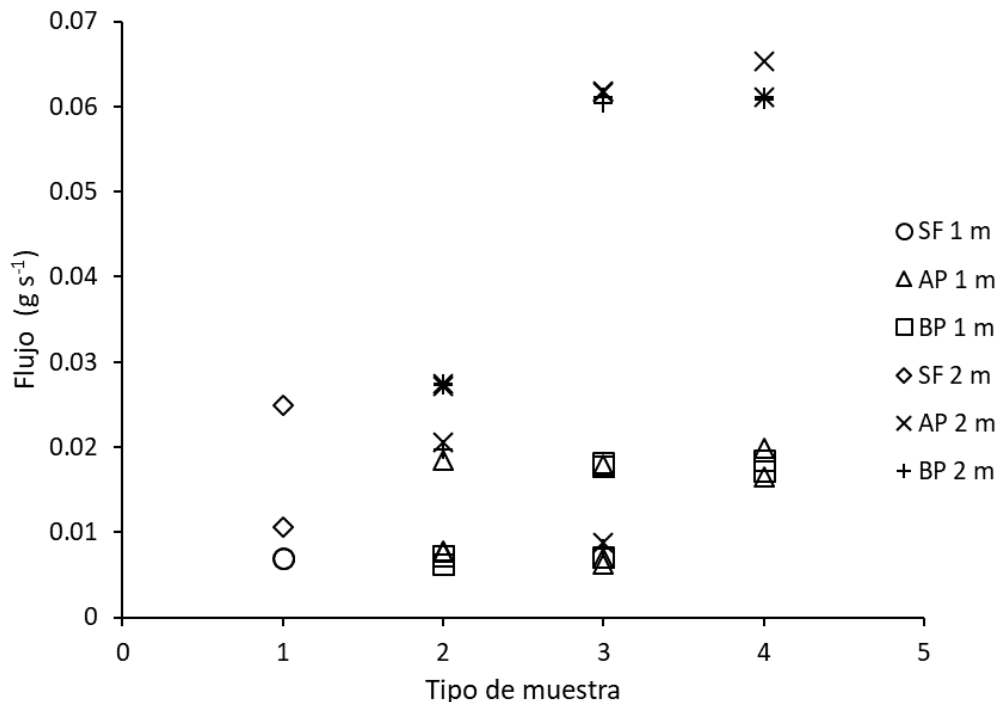
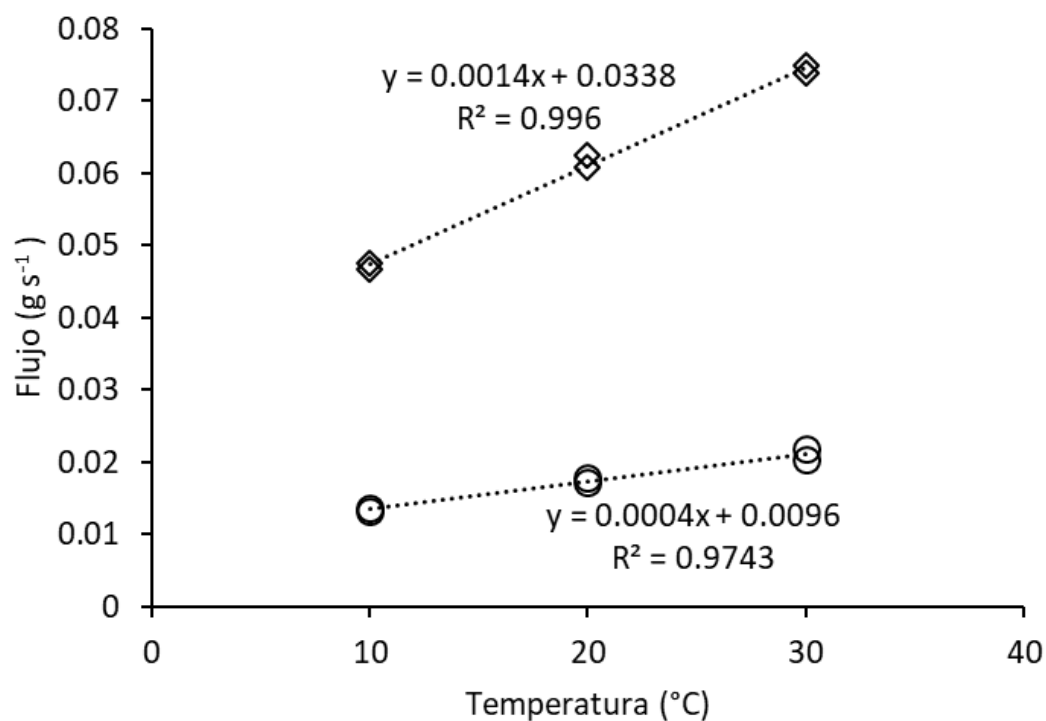
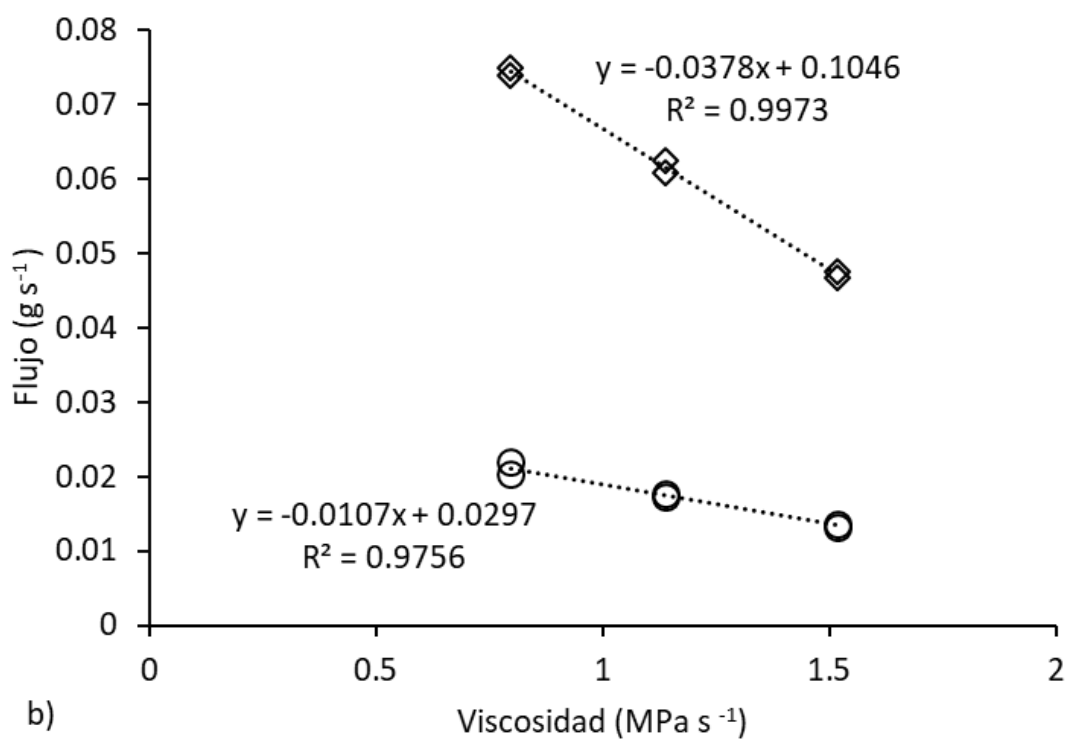


Figura 25. Viscosidad de muestras de cultivos de diatomeas filtradas a baja (0.005 MPa, BP) a alta (0.05 MPa, AP) a través de capilares de distinta longitud (2 m y 1 m). El tipo de muestra se refiere al tiempo de refrigeración (ver tabla 6).



a)



b)

Figura 26. Flujo de agua destilada a través de capilares de dos longitudes diferentes (rombos, 1 m y círculos, 2 m) en función de a) temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y b) viscosidad (MPa s^{-1}).

Capítulo 4. Discusión

En el océano, la entrada de materia orgánica está mediada por la actividad biológica (productividad primaria y secundaria). Las tasas de producción de carbono orgánico que tienen lugar en la superficie del mar son considerablemente mayores con respecto con el aporte de ríos o aerosoles, por ejemplo. Gran parte de esta materia orgánica es rápidamente degradada por oxidación o liberada como material disuelto en las capas superficiales por procariotas heterotróficos (Williams, 2000; Maske *et al.*, 2007; Benner y Amon, 2015). Aproximadamente el 50% de la producción primaria se transfiere a COD mediante procesos fisiológicos y mecanismos tróficos (lisis celular, muerte, depredación, etc.) (Figura 27). En el océano la gran mayoría del COD es de carácter refractario y no puede ser degradado por bacterias. Actualmente se manejan tres hipótesis para intentar explicar la incapacidad de degradación del COD recalcitrante: 1) la mineralización está limitada por la disponibilidad de recursos esenciales (oxígeno, hierro y vitaminas, por ejemplo); 2) la estabilidad de la MOD se debe a la presencia de estructuras moleculares resistentes y 3) la MOD está extremadamente diluida (Dittmar, 2015). Hasta el momento, no se han identificado propiedades moleculares típicas que permitan establecer cuáles son las moléculas resistentes. Por otro lado, la fracción lábil de COD (CODL), que se encuentra cerca de la superficie y puede ser fácilmente degradada, se considera que está compuesta por aminoácidos, libres y compuestos, monosacáridos, entre otros (Hansell, 2013). Sin embargo, existe una fracción pequeña de COD en la superficie, y recién sintetizada por bacterias que escapa a la degradación y que está constituido por moléculas de tamaño, bio-disponibilidad y reactividad variables (Jiao *et al.*, 2010).

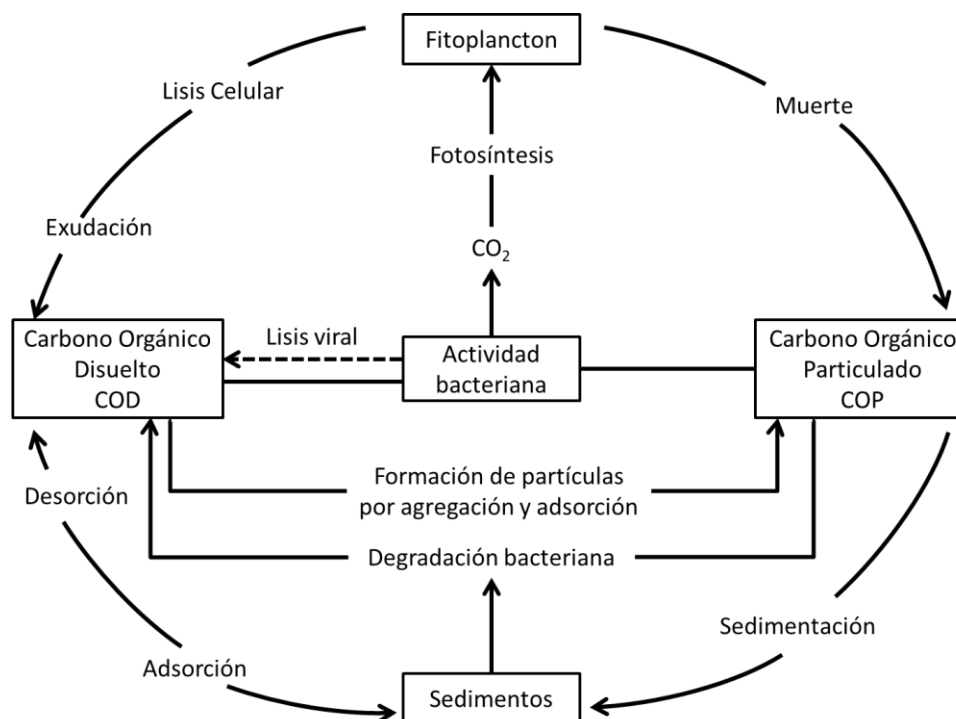


Figura 27. El ciclo del carbono en el ecosistema marino (Modificado de Syres *et al.*, 2000).

El carbono orgánico disuelto fue durante mucho tiempo considerado como un reservorio de carbono refractario poco o nada dinámico igualmente distribuido a lo largo del mar profundo. Esta visión cambió hace casi tres décadas y trajo consigo nuevas interpretaciones sobre el funcionamiento de la bomba biológica. El hundimiento de partículas dejó de ser el mecanismo único de transporte de carbono hacia aguas profundas y ahora se acompaña por las cantidades de material disuelto liberada a partir de la degradación de partículas a lo largo de la columna de agua. La actividad biológica y el hundimiento de partículas propician así el transporte y secuestro del carbono biogénico hacia la profundidad, lejos de la atmósfera. (Hansell *et al.*, 2009). No hay que olvidar que el grueso del COD es refractario (CODR) y tiene una edad de varios miles de años desde su producción biológica hasta su eventual mineralización o eliminación por otro tipo de procesos y, por lo tanto, funciona como reservorio de carbono orgánico (Hansell, 2013). Esta remoción de CODR puede ocurrir por dos procesos abióticos: a) fotooxidación a CO_2 o CO por luz ultravioleta o b) fotólisis por radiación ultravioleta (UV) que pueden convertir el CODR a CODL. Dado el requerimiento luminoso de los dos, este tipo de remoción se limita a la superficie. Otro proceso que cambia potencialmente el papel ecológico del COD es su cambio a partículas orgánicas. El cambio de biopolímeros y geles puede ser espontáneo con o sin la ayuda de núcleos de condensación como partículas

orgánicas, por ejemplo, por la adsorción de estos a partículas inorgánicas puede derivar, a su vez, en la formación de partículas gelatinosas como las PET (Hansell *et al.*, 2009).

4.1 Las PET como referencia de partículas gelatinosas en el océano

Uno de los objetivos de este trabajo fue buscar una metodología integrativa que permita, en un futuro, cuantificar la fracción total de los geles en suspensión. Esto se debe a que, a pesar de representar una fracción considerable del COD (~10%) (Verdugo, 2012), la gran parte de la literatura sobre geles en el agua de mar gira en torno a la formación, la capacidad de retención de partículas orgánicas e inorgánicas y las propiedades aglutinantes de las PET (Engel *et al.*, 2004). Estas características permiten a las PET distribuirse a lo largo del espectro de tamaños por lo que su estudio es complicado (Verdugo *et al.*, 2004).

Con base en lo anterior se realizó la colecta de PET, de acuerdo con la metodología propuesta por Passow y Alldredge (1995) y su cuantificación tomando en cuenta las modificaciones propuestas por Villacorte y colaboradores (2015) a partir de muestras naturales de agua de mar con y sin tratamiento de presión diferencial. Esto se hizo para tener una referencia comparable a lo que actualmente está disponible en la literatura. Las muestras no sometidas a los tratamientos de presión diferencial (AM 0.45 μM y AM 0.2 μM) fueron utilizadas como referencia para las muestras que si se sometieron los tratamientos de presión (FBP 0.45 μM , FBP 0.2 μM , FAP 0.45 μM y FAP 0.2 μM).

Los datos de PET y p-PET obtenidos de las muestras de referencia en este trabajo son consistentes con los valores reportados por Hakspiel-Segura y colaboradores (2017) para esta zona del Pacífico mexicano y se encuentran dentro del intervalo propuesto para la región del sistema de la corriente de California (SCC) (Wurl *et al.*, 2009).

Las colectas de PET y p-PET de las muestras prefiltradas sugieren la aglutinación y/o agregación del material disuelto presente en las muestras sometidas a ambos tratamientos. El método de colecta de PET indica que la filtración de estas partículas debe de realizarse con una presión suave y constante para evitar su ruptura (Passow y Alldredge, 1995), sin embargo, los resultados indican que esto no sucede. Esto debe ser manejado con cautela debido a los casos negativos (referidos anteriormente como “indetectables”) mostrados en la Figura 14. Estos datos pueden ser un artefacto producido por los blancos cuyas absorbancias fueron mayores a las de algunas muestras, tanto en muestras prefiltradas como en las

muestras de referencia. La presencia de “blancos altos” se puede explicar como una formación de agregados propios de la solución de azul alcian ya que esta debe ser prefiltrada con filtro de policarbonato de 0.2 μm cada vez antes de ser utilizada (Engel, 2009). Además, los blancos deben estar lo suficientemente secos antes de ser teñidos puesto que la solución de azul alcian puede formar agregados sobre el filtro si este está mojado (Passow y Alldredge, 1993). En este trabajo, la solución de azul se filtró siempre antes de su utilización por lo que, en caso de tener agregados de azul alcian estos habrían ocurrido al momento de la elaboración de blancos.

El SCC es altamente dinámico en términos de productividad primaria tanto espacial como temporalmente (Gaxiola-Castro *et al.*, 2010). Esta variabilidad es resultado de los procesos de mesoescala así como del gradiente que se origina entre la costa y el mar abierto (Santamaría-del-Angel, 2002; Barocio-Leon *et al.*, 2007). De esta forma se producen florecimientos fitoplanctónicos importantes (Barocio-León *et al.*, 2007) a los cuales se les asocia la acumulación de COP y COD en las capas superficiales (Engel *et al.*, 2012) así como un incremento en la cantidad de PET presentes en el medio (Passow, 2002). Se esperaría que las mayores concentraciones de PET se encontraran en las capas más superficiales y hacia finales de estos eventos, de igual forma para los p-PET. Similar a lo reportado anteriormente para la zona por Hakspiel-Segura *et al.* (2017), las concentraciones de PET son considerablemente altas ($>0.3 \mu\text{g XG eq}\cdot\text{mL}^{-1}$) a lo largo de la columna de agua comparadas con lo reportado anteriormente para aguas oceánicas. Además, se notó que el máximo de p-PET se ubicó a la misma profundidad de que el máximo de clorofila para el día de muestreo (12 m, datos no mostrados). Con base a lo descrito por Passow (2002), estas altas concentraciones p-PET serían producto directo de la actividad fitoplanctónica y microbiana en esa capa. El máximo de PET, por su parte, se encontró en la superficie. Las partículas gelatinosas, como otro tipo de partículas, se hunden, sólo cuando el núcleo de la PET se calcifica, de otra forma, puede mantenerse en la misma capa o bien flotar hacia la superficie e incluso abandonar el océano en forma de aerosol (Orellana y Leck, 2015).

Uno de los problemas asociados a la cuantificación de PET es que esta se realiza con base a un estándar y no en términos de carbono lo que hace difícil su comparación con los reservorios de MO en el océano. Además, el contenido de carbono de estas partículas está íntimamente ligado con el tipo de precursor de esta (Engel, 2004). Engel y Passow (2001) sugirieron el factor de conversión f' ($f'=\Delta C/\Delta\text{PET}$) con un valor promedio de 0.75 para estimar el contenido de carbono de las PET y así compararlas con el carbono en el océano. Posteriormente fue actualizado por Engel (2004) ($f'=0.63$). No obstante, cuando se utiliza este factor de conversión, la concentración de carbono de las PET es por mucho superior a la concentración de

COP obtenida a partir del mismo tipo de muestra (ver Anexo III) por lo que se sugiere cautela al utilizar este factor de conversión.

4.2 Aspectos metodológicos para la cuantificación de geles en suspensión

Como se mencionó anteriormente, es debido al dinamismo que rige la formación y desintegración de los geles en suspensión, que éstos no pueden ser clasificados como material particulado o disuelto puesto que su naturaleza no satisface la definición basada en tamaños de las dos fracciones. Los geles pueden presentarse en tamaños distintos pasando desde material disuelto a material particulado. La materia orgánica asociada con geles existe en un espectro tamaño continuo, desde precursores inicialmente disueltos, hasta polímeros y agregados de diferentes grados. Es por ello por lo que no existe una definición rígida sobre cuál es el tamaño de los polímeros y los agregados de geles. Además, la cuantificación de los geles marinos en suspensión puede ser engañosa debido a que son una forma de materia orgánica con gran plasticidad, lo que a su vez implica la transferencia constante de material entre los reservorios materia orgánica disuelta y particulada (Alldredge *et al.*, 1993). Adicionalmente, a pesar de ser una fracción importante de la materia orgánica particulada, hasta ahora no se ha considerado que estos puedan ser cuantificados como COP. Es por ello por lo que en este trabajo se trató de dilucidar la relación de los geles en suspensión y la materia orgánica particulada.

Para explicar las posibles razones por las que se presentaron tales diferencias entre los resultados preliminares (Maske y Almeda-Jauregui, 2017) y los del presente trabajo, se analizaron a detalle las diferencias en los protocolos y se encontraron tres posibles fuentes de error. La primera diferencia que se encontró fue el tipo de filtros utilizados. Si bien en ambos casos se trató de filtros de fibra de vidrio, la manufactura de estos era distinta (marcas Whatman y Millipore). La segunda diferencia radicó en el procesado de las muestras, en el estudio preliminar la filtración se realizó por presión y no por vacío, como en este trabajo. Adicionalmente, las muestras no fueron acidificadas mientras que en este sí. Finalmente, el tamaño de los filtros y la porción utilizados: filtros de 25 mm completos en el estudio preliminar contra filtros de 47 mm cortados en cuatro porciones iguales en este trabajo. Una vez identificadas estas posibles fuentes, se procedió a realizar pruebas para determinar si la manufactura, la acidificación o una distribución heterogénea en la superficie de los filtros de 47 mm explicaban las diferencias entre resultados. Adicionalmente se hicieron pruebas para determinar si el tiempo de calcinación de los filtros y el tipo de filtración influyó en la retención de material particulado.

En cuanto a la manufactura de los filtros, se ha sugerido que el grosor de estos puede ser determinante en cuanto a la capacidad de retención de material se refiere. Esto debido al aumento de la superficie de los filtros en la cual pueden adherirse partículas de tamaños más pequeños (Abdel-Moati, 1990; Nayar y Chou, 2003). En otras palabras, las partículas de tamaño superior al poro se acumularían en la superficie mientras que el material más pequeño podría quedar atrapado en la columna del filtro. Existen dos marcas de filtros de fibra de vidrio tipo GFF con características nominales similares, Millipore y Whatman. Los filtros Millipore son más gruesos que los filtros Whatman, por lo que se esperaría que la colecta de material con los filtros Millipore fuese mayor si hubiese colecta de material por adsorción. Los resultados de este trabajo indican que la retención con filtros Whatman es mayor que la retención de los filtros Millipore en muestras sometidas a tratamientos de presión diferencial, sin embargo, con el número de pruebas limitantes no se logró mostrar si la presión de filtración o la manufactura de los filtros influyen directamente en la cantidad de material colectado.

En cuanto al procesado de las muestras de COP típicamente, estas se someten a un tratamiento de secado-acidificación-secado previo a su análisis en un analizador de elementos (Liu *et al.*, 2005). La acidificación es un paso importante en la cuantificación de COP dado que ayuda a disolver los remanentes de carbono inorgánico particulado que pudiesen estar en la muestra. En lo que al estudio de partículas gelatinosas se refiere, el pH juega un papel importante dado que este factor puede influir en la aglutinación o fragmentación de estos (Verdugo, 2012). La acidificación de las muestras de COP, que presumiblemente contienen partículas gelatinosas, podría afectar (disminuir) la concentración del material gelatinoso en la superficie de los filtros. Por ello se realizaron pruebas sometiendo un grupo de muestras al tratamiento clásico para muestras de COP y otro grupo sin acidificar. No se encontraron diferencias significativas entre ambos sets de muestras. Por lo que el tratamiento con ácido no es determinante en la concentración del carbono orgánico particulado.

En este trabajo se utilizaron filtros de 47 mm de diámetro para muestras de volúmenes de 500 a 1500 mL. Estos filtros fueron cortados en 4 partes iguales para hacer adicionalmente cuantificación de clorofilas y ADN que servirían como indicador de rompimiento (o no) de células o de partículas gelatinosas. Los resultados mostraron una distribución homogénea sobre los filtros de 47 mm de diámetro. Para filtraciones de grandes volúmenes, utilizar filtros de 47 mm supondría una ventaja al reducir el tiempo de filtración comparado con el uso de varios filtros de 25 mm para cuatro muestras. Además, se reduciría el error asociado a la elaboración de múltiples alícuotas a partir de una misma muestra de agua de mar o de cultivo. Por otro lado, es importante mencionar que, derivado de los resultados de las colectas de COP/NOP tanto de muestras de cultivos como de muestras de agua de mar, se decidió no continuar con

las cuantificaciones de clorofilas y ADN. Esto debido a que la hipótesis inicial del proyecto planteaba que la diferencia en la cantidad de COP colectado a partir de muestras idénticas sometidas a tratamientos de filtración con presiones diferentes sería resultado del rompimiento de los microgeles presentes en la muestra por el esfuerzo mecánico ejercido sobre ellos durante la filtración. Los resultados del estudio no mostraron tales diferencias entre tratamientos (Figuras 17 y 19 a) por lo que se descartó la hipótesis y, por consiguiente, la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y del material genético.

Finalmente, se realizaron pruebas con filtros calcinados durante diferentes períodos (4 y 12 horas) y con dos tipos de filtración (vacío y presión) para determinar si el periodo de calcinación modifica la capacidad de retención de los filtros. Se sabe que la calcinación reduce el tamaño de poro como consecuencia de la compactación y rompimiento de las fibras de borosilicato (Abdel-Moati, 1990; Nayar y Chou, 2003). Los resultados de este trabajo no mostraron diferencias en la concentración de COP colectadas con filtros sometidos a diferentes periodos de calcinación. Nayar y Chou (2003) realizaron pruebas con filtros calcinados a 600°C durante 1 h en vez de la calcinación tradicional (4 h, 450°C) y observaron que en estos filtros la cantidad de partículas era similar a la presente en filtros de policarbonato de 0.2 μm . Esto sugiere que es la temperatura y no el tiempo de calcinación lo que fomenta la compactación de las fibras de vidrio. Por otro lado, el tipo de filtración parece tener un efecto directo en la cantidad de material colectado ya que las muestras de filtración con presión presentaron concentraciones de aproximadamente la mitad que los encontrados en las muestras filtradas con vacío. Esto a pesar de que se utilizó una presión de filtración baja (0.005 MPa) y el mismo volumen de muestra (500 mL) en ambos tipos de filtración (presión y vacío). Este comportamiento podría ser análogo con lo que sucede cuando se comparan los resultados de filtraciones de muestras colectadas con botellas Niskin y las bombas *in situ*. Generalmente, las muestras de botella presentan valores mucho mayores que las muestras de los bombeos *in situ* y a pesar de que aún se desconoce el porqué de esto, se ha sugerido la pérdida de carga a través del filtro como una de las posibles explicaciones (Gardner *et al.*, 2003). La pérdida de carga se refiere a la pérdida de presión derivada de la fricción de las partículas del fluido con el sistema que lo conduce. El sistema de filtración por presión que se utilizó en este trabajo tiene una serie de mangueras por las que pasa la muestra antes de llegar al filtro, por lo que, en este caso, la pérdida de carga podría explicar la diferencia en la cantidad de material colectado con respecto a la filtración por vacío. Otra explicación podría ser la fragmentación de las partículas gelatinosas presentes en la muestra como consecuencia de choques con las paredes de las mangueras del sistema de filtración por presión.

4.3 Potencial de formación y re-ensamblaje de geles

En la Figura 20, se observa el potencial de formación de partículas en muestras prefiltradas en una escala de tiempo relativamente corta (horas). Las concentraciones de COP formado en los filtrados tienden a ser menores que las concentraciones de COP iniciales. De esta forma, las filtraciones secuenciales indicarían que una fracción grande de la materia orgánica disuelta está involucrada en la formación de COP. Esta formación de partículas también se observó en las muestras de PET (Figura 13). La formación de partículas, PET, en muestras filtradas también sugieren que el material disuelto remanente en las muestras se agrega y forma partículas hasta llegar a concentraciones similares a la concentración de partículas gelatinosas presentes inicialmente. La aglomeración de material disuelto en muestras de filtraciones secuenciadas no parece incrementar con el tiempo, esto podría ser un indicador de que existe un balance dinámico entre las fases disuelta y particulada. En otras palabras, la materia disuelta remanente se agregaría hasta formar partículas de diversos tamaños que ocupen el lugar de las partículas que fueron removidas durante las filtraciones precedentes de suerte que el espectro de tamaños siga siendo uno continuo. Esta observación del balance dinámico es una observación nueva y no concuerda con los conceptos actuales en los que se postula que el papel de las partículas orgánicas en la ecología microbiana marina depende de que las partículas son estructuras semi-permanentes cuyas superficies se encuentran densamente pobladas por microorganismos (Bižić-Ionescu *et al.*, 2018).

Sheldon y colaboradores (1967), por otro lado, mencionaron que los mecanismos de formación de partículas en el agua de mar pueden ocurrir en cualquier nivel de la columna de agua, aunque este efecto es enmascarado por los aportes terrígenos y por la gran actividad biológica en las capas superficiales. Adicionalmente, sugieren que la formación de partículas está estrechamente ligada a la presencia de bacterias dado que, al limitar la presencia de estos microorganismos, se limita también la formación de partículas. Es importante señalar que, en su estudio, observaron que se induce la formación de nuevas partículas cuando las muestras de agua de mar son prefiltradas. Ahora bien, existe un fenómeno concomitante a las filtraciones que es la formación de burbujas. De acuerdo con los resultados de Johnson y Cooke (1980), la disolución de estas burbujas puede ser el origen de la formación de nuevas partículas en las muestras. Las burbujas serían entonces otro mecanismo por el cual, mediante la concentración de material disuelto en sus interfaces aire/agua, se formarían partículas inmediatamente después al colapso de la burbuja en muestras filtradas.

4.4 Relación geles y viscosidad

El agua de mar es tradicionalmente considerada como un fluido Newtoniano, es decir, no elástico y con una viscosidad dominada por la temperatura y la salinidad (Jenkinson, 1986). Sin embargo, la presencia del material polimérico de origen biológico le otorga una “viscosidad aparente” que le confiere las características de un fluido no-Newtoniano. Esto se debe a que la presencia de los exudados del fitoplancton, por ejemplo, modifica el ambiente marino al aumentar su elasticidad y su viscosidad (Jenkinson, 1986). La presencia de partículas pequeñas en el medio marino ha hecho que, en algunos casos se considere al agua de mar como un “hidrogel” (Chin *et al.*, 1998). La viscosidad, a escalas microscópicas, controla la mayoría de los procesos hidrodinámicos. Esta escala de tamaño es en la que se desarrollan la mayor parte de los procesos ecológicamente relevantes como la absorción y adsorción de nutrientes, las infecciones virales, la formación de agregados, entre otros. Además, los cambios en la viscosidad pueden influir de forma directa en procesos ecológicos como la agregación y/o hundimiento de partículas además de que afectan la motilidad y la velocidad de nado de los microorganismos marinos. Sin embargo, aún se desconoce cómo se lleva a cabo esta bio-modificación del flujo o el impacto de los factores biológicos en la dispersión, el hundimiento y la agregación/desagregación de partículas y, por consiguiente, en la viscosidad del agua de mar (Seuront *et al.*, 2006)

En relación con lo anterior, se hicieron mediciones de viscosidad, principalmente con la esperanza de encontrar un indicador rápido la materia orgánica en forma de gel. Para ello se realizaron pruebas con muestras de cultivos de dinoflagelados y diatomeas filtrados y sometidos a diferentes tiempos de refrigeración. Adicionalmente, se hicieron pruebas con agua destilada para confirmar las mediciones de viscosidad a diferentes temperaturas. Los resultados de las pruebas de viscosidad con agua destilada mostraron que el dispositivo diseñado si es capaz de medir la viscosidad de un flujo Newtoniano utilizando capilares de calibres y longitudes (Figuras 23 y 25).

Los resultados de muestras de cultivos no mostraron diferencias de viscosidad en ninguno de los casos (diferentes calibres, diferentes longitudes, tratamientos de presión). Es importante mencionar que se esperaba que las muestras filtradas con alta presión presentaran una viscosidad mayor que aquellas que se sometieron a una baja presión debido a la hipótesis inicial del proyecto -muestras sometidas a filtración con alta presión tendrían una mayor concentración de geles debido al rompimiento y paso de los geles a través del filtro-. Sin embargo, en estas pruebas, como en las pruebas discutidas en la sección 4.2, la presión de filtración parece no influir en la concentración de geles prefiltrados. Por otro lado, las muestras prefiltradas fueron sometidas a diferentes temperaturas y períodos de tiempo con la finalidad de inducir

la formación de partículas gelatinosas. Entre los diferentes tipos de muestra (sin filtrar o filtradas con o sin refrigeración) sólo en el caso del capilar delgado se observó que todas las muestras presentan datos de viscosidad similares. En cuanto a las muestras de cultivos de diatomeas sin filtrar (Figura 26), los resultados presentan los valores de flujo bajos que son consistentes con una alta viscosidad. Considerando lo mencionado anteriormente, se puede decir que el dispositivo diseñado, además de detectar el flujo Newtoniano podría detectar flujos no Newtonianos. Aun se requieren más pruebas y modificaciones al diseño del dispositivo antes de poder afirmar que estos datos son confiables.

4.5 Implicaciones de un balance dinámico entre MOD y geles

Actualmente, se sabe que el tamaño de una partícula determina el tipo de interacciones ecológicas con el medio que le rodea (p. e. con microorganismos u otras partículas) (Burd y Jackson, 2009). No obstante, es importante recordar que la clasificación de la materia orgánica como disuelta o particulada es meramente operacional y no toma en cuenta los procesos de agregación y desagregación a la que este material está expuesto constantemente. Estos procesos (agregación/desagregación) son los responsables de que las partículas tengan diferentes tamaños a lo largo del tiempo. La agregación (desagregación) de partículas es una de las vías principales para la transformación de materia orgánica e inorgánica en el océano. Cambios en la concentración y el tamaño de las partículas puede tener implicaciones directas en la distribución de nutrientes y metales en la columna de agua, de igual forma puede modificar las características luminosas en el medio, así como también su biodisponibilidad para organismos planctónicos (Burd y Jackson, 2009).

Anteriormente, se ha mencionado que los geles (microgeles y partículas gelatinosas) se distribuyen en un “continuo de tamaños” altamente variable en el que se incluye al material disuelto y particulado (ver Figura 2) (Verdugo, 2012). Esta característica complica su estudio y, por consiguiente, el entendimiento de sus implicaciones en la ecología microbiana marina, por ejemplo. A pesar de ello, en la literatura hay numerosas referencias sobre la importancia de bacterias adheridas a partículas para la ecología de microbios marinos. Jenkinson y colaboradores (2015), por ejemplo, mencionan que el aumento de la concentración de mucopolisacáridos durante períodos de florecimientos algales conlleva a una organización continua y estructurada de la materia orgánica en el agua de mar de suerte que, durante estos eventos, la cantidad de bacterias asociadas a estructuras gelatinosas sería mayor que la cantidad de bacterias en vida libre. Además, las bacterias utilizan estrategias conductuales y bioquímicas para obtener

la materia orgánica necesaria, por ejemplo, la secreción de exoenzimas que les ayudan a solubilizar la materia orgánica particulada de forma que esta se vuelva biodisponible para ellas. De esta forma, las bacterias interactúan con las fuentes de MO y afectan directamente al ecosistema y al ciclo de carbono (Figura 28) (Azam y Malfatti, 2007). Además, gracias a los estudios de genómica y metagenómica se puede deducir que una enorme diversidad genética bacteriana existe para las interacciones bacterianas a nivel de ensamblaje (formación de partículas) con el océano (Azam y Malfatti, 2007). Por otro lado, Stemmann y colaboradores (2004a) describieron los procesos que modifican la concentración de las partículas y la forma en la que la degradación bacteriana afecta la distribución de tallas de las partículas en el agua de mar.

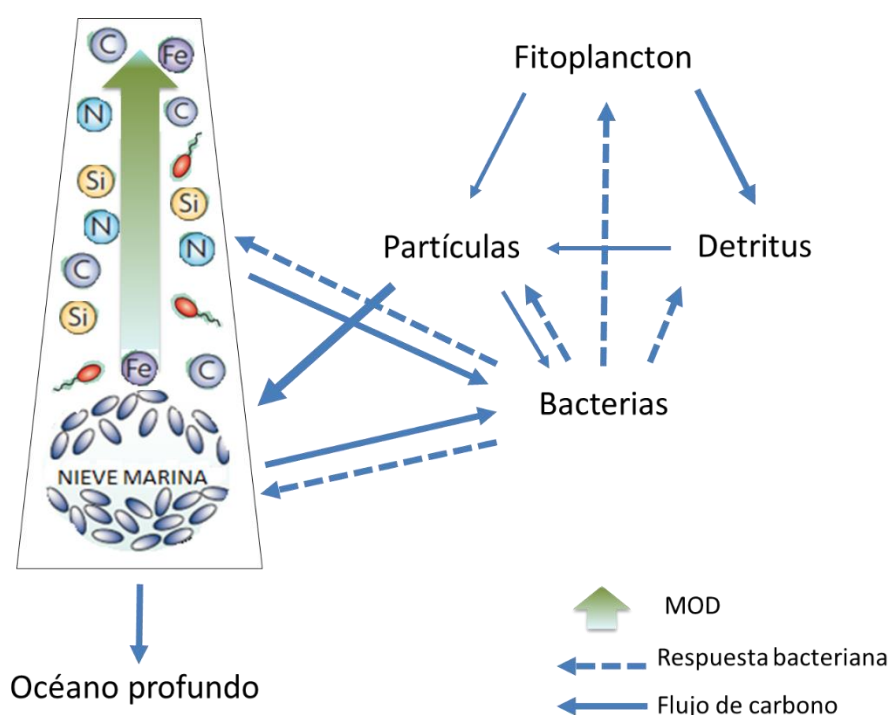


Figura 28. Ciclo microbiano del carbono en la nieve marina (Modificado de Azam y Malfatti, 2007).

Las investigaciones sobre bacterias asociadas a partículas y a geles (biopelículas) sugieren que los geles orgánicos en suspensión podrían funcionar como microambientes atractivos para las bacterias heterotróficas ya que se crearían consorcios microbianos y su desarrollo se vería favorecido. Además, se sugieren dos aspectos en los que los geles en suspensión podrían ser análogos a las biopelículas e influirían de forma importante en la ecofisiología de los microbios embebidos. Primero, la acumulación de moléculas orgánicas aumentaría el potencial nutricional y segundo, la estructura física de estos geles permitiría a las bacterias heterotróficas desarrollarse mejor que en vida libre (Azam, 1998; Malfatti y Azam, 2009; Orellana *et al.*, 2007). Diversos autores mencionan que las estructuras porosas que conforman a los geles

promueven la retención de nutrientes y de los subproductos metabólicos por lo que su potencial nutricional (para bacterias heterotróficas) aumenta (Costerton *et al.*, 1995; Azam, 1998; Orellana *et al.*, 2007; Malfatti y Azam, 2009; Jiménez-Taracido, 2009). Por otro lado, la estructura gelatinosa les confiere a las bacterias un medio de protección contra la depredación, la fagocitosis y el estrés térmico (Johnson, 2008; Matz *et al.*, 2008). Finalmente, en un estudio realizado por Yang y colaboradores (2018), se observó que las bacterias aprovechan los canales presentes en las biopelículas para comunicarse entre ellas.

No obstante, todavía se desconoce si esto mismo ocurre en los geles en suspensión. Esto debido a que las investigaciones sobre la relación entre la degradación de sustratos y la dinámica bacteriana marina asociada a partículas gelatinosas son escasas (Mitulla *et al.*, 2016). Como se ha sugerido repetidamente en la literatura, es muy probable que la dinámica entre bacterias y geles en suspensión sea análoga a lo que sucede en las biopelículas, sin embargo, es indispensable considerar la gran plasticidad de los geles en suspensión. Este gran dinamismo (aglutinación y fragmentación constantes) puede suponer dificultades para el desarrollo de las bacterias por ejemplo al liberarse nutrientes indispensables para ellas. Por otro lado, la constante aglutinación podría aumentar la protección. Además, en regiones de la columna de agua donde la mayor parte de la MOD es recalcitrante (a 1000 de profundidad, por ejemplo), la formación de partículas gelatinosas podría ser considerada como una ventaja para los microbios que ahí se encuentran. Por ello es necesario continuar con las investigaciones experimentales para identificar el papel de los geles formados a partir de materia orgánica disuelta en la ecología microbiana en los diferentes estratos de la columna de agua.

Capítulo 5. Conclusiones

Este proyecto de tesis tenía inicialmente como objetivo investigar el papel de los geles orgánicos en suspensión sobre la ecología marina y se esperaba reproducir experimentos previos con diferentes concentraciones de geles modificadas experimentalmente. Los datos de laboratorio en los que se basaron los planes experimentales fueron obtenidos de filtraciones con presión. Sin embargo, una vez comenzado el trabajo de tesis, se observaron diferencias entre los datos obtenidos con filtraciones con presión y con vacío. Por consiguiente, se tuvo que modificar el enfoque del proyecto para concentrarse en la formación de partículas a partir de MOD.

Los resultados del trabajo mostraron siempre formación de partículas orgánicas en muestras prefiltradas, i.e. a partir de MOD ya que las concentraciones de COP encontradas en filtraciones subsecuentes sugieren la formación de partículas. Las partículas encontradas en los filtrados presentaron valores de hasta 10% del COP presente en la muestra inicial. Además, la alta razón C/N indica que estas partículas están conformadas por precursores de carácter distinto de material celular vivo y consiste en gran parte de carbohidratos.

En cuanto a las concentraciones de PET y sus precursores, los resultados de este estudio son congruentes con lo reportado para la región, sin embargo, su contribución al presupuesto de carbono está por mucho sobreestimada debido al factor de calibración utilizado. Esto dificulta su interpretación y supone un alto grado de incertidumbre cuando se pretende compararlo con la materia particulada formada en filtraciones subsecuentes. La cuantificación de PET sólo proporciona información semi-cuantitativa sobre la fracción de carbohidratos de geles marinos y no debe ser considerado como un indicador de geles en suspensión.

Nuestras mediciones de viscosidad de agua de mar con MOD y MOP no difieren de las del agua destilada. Esto indica que la viscosidad no es un indicador de la concentración de MO. Probablemente, la materia orgánica no influye significativamente en la viscosidad en comparación con los cambios de temperatura.

Hasta ahora la falta de un método integral para investigar la ecología marina de los geles ha derivado en estimaciones poco o nada certeras a partir fracciones desconocidas de estos geles. Los resultados del trabajo sugieren una posible ruta para estimar la concentración elemental de las partículas gelatinosas en el océano, sin embargo, aún quedan detalles de tipo metodológico por investigar y afinar antes de sugerir un protocolo que permita hacer comparaciones directas con otras fracciones como biomasa de microbios o materia orgánica disuelta.

Literatura citada

- Abdel-Moati A. R. 1990. Adsorption of dissolved organic carbon (DOC) on glass fibre filters during particulate organic carbon (POC) determination. *Water Research* 24: 763-764.
- Allredge, A. L., Passow, U., Logan, B. E. 1993. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research I*, 40(6), 1131-1140
- Azam, F., 1998. Oceanography: microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 280, 694–696.
- Azam, F, Malfatti, F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5:782-791.
- Barocio-León, O.A., Millán-Núñez, R, Santamaría-del-Ángel E., González-Silvera A. 2007. Productividad primaria del fitoplancton en la zona eufótica del Sistema de la Corriente de California estimada mediante imágenes del CZCS. *Ciencias Marinas*, 33(1): 59–72.
- Benner, R. y Amon, R. M.W. 2015. The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Annual Review of Marine Science*, 7, 185-205.
- Bižić-Ionescu, M, Ionescu, D, Grossart, H-P. 2018. Organic Particles: Heterogeneous Hubs for Microbial Interactions in Aquatic Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 9:1-15.
- Burd, A., Jackson, G. 2009. Particle Aggregation. *Annual Review of Marine Science*, 1:65-90.
- Chin, W.-C., Orellana, M.V., Verdugo, P. 1998. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*, 391, 568–572.
- Cisternas-Novoa, C., Lee, C., Engel, A. 2015. Transparent exopolymer particles (TEP) and Coomassie stainable particles (CSP): Differences between their origin and vertical distribution in the ocean. *Marine Chemistry*, 175:56-71.
- Collings, A. F., Bajenov, N. 1983. A High Precision Capillary Viscometer and Further Relative Results for the Viscosity of Water. *Metrologia*, 19(2):61-66.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology*, 49, 711-745.
- Dang, H., Lovell, C. R. 2016. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (1), 91-138.
- Decho, A. W. 1990. Microbial exopolymer secretions in the ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and marine Biology Annual Reviews*, 28:73-153.
- Del Negro, P., Crevatin, E., Larato, C., Totti, C., Pompei, M., Giani, M., Berto, D., Fonda-Umani, S. 2005. Mucilage microcosms. *Science of the Total Environment*, 353, 258-269.
- Dittmar, T. 2015. Reasons Behind the Long-Term Stability of Dissolved Organic Matter. En: Hansell, D. A., Carlson, C. A. (Eds.). *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Second Edition. Academic Press, San Diego, pp.369-388.

- Engel, A., Thoms, S., Riebesell, U., Rochelle-Newall, E., Zondervan, I. 2004. Polysaccharide aggregation as a potential sink of marine dissolved organic carbon. *Nature*, 428:929-932.
- Engel, A. 2009. Determination of Marine Gel Particles. En: Wurl, O. (Ed.) *Practical Guidelines for the Analysis of Seawater*. CRC Press, Boca Raton. pp. 125-142.
- Engel, A., Harlay, J., Piontek, J, Chou, L. 2012. Contribution of combined carbohydrates to dissolved and particulate organic carbon after the spring blooming the northern Bay of Biscay (North-Eastern Atlantic Ocean). *Continental Shelf Research*, 45:42-53.
- Gaxiola-Castro, G., Cepeda-Morales, J.C.A., Najera-Martínez, S., Espinosa-Carreón, T.L., De la Cruz-Orozco, M.E., Sosa-Avalos, R., Aguirre-Hernández, E., Cantú-Ontiveros, J.P. 2010. Biomasa y producción de fitoplancton. In: Gaxiola-Castro G, Durazo R (eds.), *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997–2007: Diez años de investigaciones mexicanas de la Corriente de California*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Ciudad de México, pp. 59–86.
- Gardner, W., Richardson, M. J., Carlson, C. A., Hansell, D., Michonova, A. V. 2003. Determining true particle organic carbon: bottles, pumps and methodologies. *Deep-Sea Research II*, 50:655-674.
- Ghiglione, J. F., Mevel, G., Pujo-Pay, M., Mousseau, L., Lebaron, P., Goutx, M. 2007. Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 54, 217-231.
- Gutiérrez, T., Teske, A., Ziervogel, K., Passow, U., Quigg, A. 2018. Editorial: Microbial Exopolymers: Sources, Chemico-Physiological Properties, and Ecosystem Effects in the Marine Environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1822.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Repeta, D.J., Schlitzer, R. 2009. Dissolved organic matter in the ocean: New insights stimulated by a controversy. *Oceanography*, 22 (4), 52-61.
- Hansell, D. A. 2013. Recalcitrant dissolved organic carbon fractions. *Annual Review of Marine Science*, 5, 421-445.
- Hakspiel-Segura, C., Cajal-Medrano, R., Maske-Rubach, H., Villegas-Mendoza, J. 2017. Distribución temporal y espacial de partículas de exopolímeros transparentes frente a la costa norte de Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 43(4):249-267.
- He, W., Chen, M., Schlautman, M. A., Hur, Jin. 2016. Dynamic exchanges between DOM and POM pools in coastal and inland aquatic ecosystems: A review. *Sciences of the Total Environment*, 551-552:415-428.
- Jenkinson, I.R. 1986. Oceanographic implications of non-Newtonian properties found in phytoplankton cultures. *Nature* 323, 435–437.
- Jenkinson, I. R., Sun, X. S., Seuront, L. 2015. Thalassorheology, organic matter and plankton: Towards a more viscous approach in plankton ecology. *Journal of Plankton Research*, 37(6): 1100–1109.
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F. y Azam, F. 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 593-599.

- Jiménez-Taracido, L. 2009. Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad Quorum Sensing de las especies implicadas en el proceso. Tesis de Doctorado. Universidad de Cádiz. 192 pp.
- Johnson, B. D, Cooke, R. C. 1980. Organic particle and aggregate formation resulting from the dissolution of bubbles in seawater. *Limnology and Oceanography*, 25(4):653-661.
- Johnson, L. R. 2008. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 251, 24-34.
- Kerner, M., Hohenberg, H., Ertl, S., Reckermann, M., Spitzzy, A. 2003. Self-organization of dissolved organic matter to micelle-like microparticles in river water. *Nature*, 422(13):150-154.
- Ling, S. C y Alldredge, A. L. 2003. Does the marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)? *Journal of Plankton Research*, 25(5), 507-515.
- Liu, Z., Stewart, G., Cochran, J. K., Lee, C., Armstrong, R. A., Hirschberg, D. J., Gasser, B., Miquel, J. C. 2005. Why do POC concentrations measured using Niskin bottle collections sometimes differ from those using in-situ pumps? *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 52(7):1324-1344.
- Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A., *et al.* 2008. Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *PLoS One*, 3(7): e2744.
- Malfatti, F., Azam, F. 2009. Atomic force microscopy reveals microscale networks and possible symbioses among pelagic marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 58(1), 1–14.
- Maske, H., Cajal-Medrano, R., Jiménez-Mercado, A. 2007. Microbios heterótrofos en el ciclo del carbono oceánico en el Pacífico mexicano. En Hernández-de-la- Torre, B., Gaxiola-Castro, G. (Eds.) *El carbono en Ecosistemas Acuáticos de México*. Instituto Nacional de Ecología/CICESE, México, D.F. pp101-116.
- Maske, H, Almeda-Jauregui, C. 2017. Geles oceánicos, carbono orgánico entre particulado y disuelto. En: VIII Simposio Internacional del Carbono en México, Ensenada, Baja California, México, 17-19 mayo. Memoria Resúmenes cortos, pp.44.
- Mitulla, M., Dinasquet, J., Guillemette, R., Simon, M., Azam, F., Wietz, M. 2016. Response of bacterial communities from California coastal Waters to alginate particles and alginate-degrading *Alteromonas macleodii* strain. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4369-4377.
- Nayar, S. y Chou, L. M. 2003. Relative efficiencies of different filters in retaining phytoplankton por pigment and productivity studies. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences*, 58:241-248.
- Orellana, M.V., Matrai, P.A., Leck, C., Rauschenberg, C.D., Lee, A.M., Coz, E. 2011. Marine microgels as a source of cloud condensation nuclei in the high Arctic. *PNAS*. 108, 13612–13617.
- Orellana, M. V., Leck, C. 2015. Marine Microgels. En: Hansell, D. A., Carlson, C. A. (Eds.) *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter, Second Edition*. Academic Press, San Diego, pp. 451-480.
- Orellana, M.V., Petersen, T.W., Diercks, A.H., Donohoe, S., Verdugo, P., van den Engh, G. 2007. Marine microgels: optical and proteomic fingerprints. *Marine Chemistry*, 105, 229–239.

- Orellana, M. V., Verdugo, P. 2003. Ultraviolet radiation blocks the organic carbon exchange between the dissolved phase and the gel phase in the ocean. *Limnology and Oceanography*, 48,1618-1623.
- Passow, U., Alldredge, A. L. 1995. A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of the transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography*, 40(7), 1995, 1326-1335.
- Passow U. 2002. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology Progress. Series*, 236: 1–12.
- Radić, T.M., Svetličić, V., Žutić, V., Boulgaropoulos, B. 2011. Seawater at the nanoscale: marine gel imaged by atomic force microscopy. *Journal of Molecular Recognition*, 24, 397–405.
- Santamaria-del-Angel E, Millan-Nuñez R, Gonzalez-Silvera A, Müller-Karger F. 2002. The color signature of the Ensenada Front and its seasonal and interannual variability. *CalCOFI Rep.* 43: 155–161.
- Seuront, L., Vincent, D., Mitchell, J. G. 2006. Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring Bloom. *Journal of Marine Systems*, 61(3-4):118-133.
- Sheldon, R. W., Evelyn, T. P. T., Parsons, T. R. 1967. On the Occurrence and Formation of Small Particles in Seawater. *Limnology and Oceanography*, 12(3):367-375.
- Sheldon, R. W. 1972. Size separation of marine seston by membrane and glass fiber filters. *Limnology and Oceanography*, 17(3):494-498.
- Stemmann L, Jackson G.A., Janson D. 2004a. A vertical model of particle size distributions and fluxes in the midwater column that includes biological and physical processes. I. Model formulation. *Deep-Sea Research I*, 51:865–884.
- Verdugo, P., Alldredge, A. L., Farooq A., Kirchman, D. L., Passow, U., Santschif, P. H. 2004. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. *Marine Chemistry*, 92, 67–85.
- Verdugo, P, Santschi, P. H. 2010. Polymer dynamics of DOC networks and gel formation in seawater. *Deep-Sea Research II*, 57:1486-1493.
- Verdugo, P. 2012. Marine Microgels. *Annual Review of Marine Science*, 4, 375-400.
- Villacorte, L. O., Ekowati, Y., Calix-Ponce, H. N., Schippers, J. C., Amy, G. L., Kennedy, M. D. 2015. Improved method for measuring transparent exopolymer particles (TEP) and their precursors in fresh and saline water. *Water Research*, 70:300-312.
- Williams, P.J. le B. 2000. Heterotrophic bacteria and the dynamics of Dissolved Organic Matter. En Kirchman, D. (Ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*, First Edition, Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology Ralph Mitchell Series Editor, EE. UU., pp 153-200.
- Wurl, O., Holmes, M. 2008. The gelatinous nature of the sea-surface microlayer. *Marine Chemistry*, 110, 89-97.
- Yang, J., Toyofuku, M., Sakai, R, Nomura, N. 2017. Influence of alginate production on cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Microbiology Reports*, 9(3), 239-249.

Anexos

Anexo A. Mecanismos de intercambio entre reservorios de MOD y MOP en el océano (He *et al.*, 2016).

Table 2

Exchange mechanisms between DOM and POM summarized from Table S1.

Direction	Exchange mechanisms	Abiotic or biotic	Driving factors	Reference
DOM → POM	Aggregation, coagulation	Abiotic	Brownian motion, turbulent shear, differential settling, filtration, and bridging with divalent cations	Reid <i>et al.</i> (1991); Stordal <i>et al.</i> (1996); VanHeemst <i>et al.</i> (1996); Chin <i>et al.</i> (1998); Passow (2000, 2012); Kerner <i>et al.</i> (2003); Schwesig <i>et al.</i> (2003); Engel <i>et al.</i> (2004, 2014); Thornton (2004); Bhaskar <i>et al.</i> (2005); Giani <i>et al.</i> (2005); Baalousha <i>et al.</i> (2006); Baigorri <i>et al.</i> (2007); Mari <i>et al.</i> (2007); Wetz and Wheeler (2007); von Wachenfeldt and Tranvik (2008); Gogou and Repeta (2010); Asmala <i>et al.</i> (2014); Shiu <i>et al.</i> (2014)
	Adsorption	Abiotic	The physical intermolecular weak forces (e.g. hydrogen bond and van der Waals force) and chemical mechanisms(e.g. ligand exchange)	Druffel and Williams (1990); McKnight <i>et al.</i> (1992); Wershaw <i>et al.</i> (1995); Aufdenkampe <i>et al.</i> (2001); Kaiser <i>et al.</i> (2001); Hwang and Druffel (2003); Pullin <i>et al.</i> (2004); Remington <i>et al.</i> (2007); Wetz and Wheeler (2007); Kang and Xing (2008); von Wachenfeldt and Tranvik (2008); Perez <i>et al.</i> (2011); Pisani <i>et al.</i> (2011); Gao <i>et al.</i> (2012); Jagadamma <i>et al.</i> (2012); Passow (2012); Zielińska <i>et al.</i> (2014)
	Photo-flocculation/adsorption	Abiotic	Photo-oxidation of DOM	Pullin <i>et al.</i> (2004); Druon <i>et al.</i> (2010); Helms <i>et al.</i> (2013); Chen <i>et al.</i> (2014)
POM → DOM	Dissolution	Abiotic	The reversible process of aggregation	Komada and Reimers (2001); Goldthwait <i>et al.</i> (2005); Osborne <i>et al.</i> (2007); Pisani <i>et al.</i> (2011)
	Desorption	Abiotic	The reversible process of adsorption	Koelmans and Prevo (2003); Mayorga <i>et al.</i> (2005); Swan <i>et al.</i> (2009)
	Photo-dissolution	Abiotic	Photo-oxidation of POM	Kieber <i>et al.</i> (2006); Mayer <i>et al.</i> (2009, 2011); Estapa and Mayer (2010); Shank <i>et al.</i> (2011); Southwell <i>et al.</i> (2011); Helms <i>et al.</i> (2014); Schiebel <i>et al.</i> (2014); Yang <i>et al.</i> (2014)
DOM ↔ POM	Biodegradation	Biotic	Supply and depletion of the OM	Moran and Buesseler (1992); Smith <i>et al.</i> (1992); Lara and Thomas (1995); Mannino and Harvey (1999); Wetz <i>et al.</i> (2008)
	Aggregation and solubilization	Abiotic	Mentioned in aggregation/dissolution	Sannigrahi <i>et al.</i> (2006)
	Aggregation and microorganism decomposition	Both	Mentioned in aggregation/dissolution and organisms-involved exchange	Kovac <i>et al.</i> (2004); Mecozzi <i>et al.</i> (2005); Le Moigne <i>et al.</i> (2013)
	Adsorption and desorption Adsorption and plankton decomposition	Abiotic Both	Mentioned in adsorption/desorption Mentioned in adsorption/desorption and organisms-involved exchange	Benetoli <i>et al.</i> (2007); Liang <i>et al.</i> (2011) Grossart and Simon (1998); Hwang <i>et al.</i> (2006)

Anexo B. Valores de viscosidad del agua experimentales y recomendados por Collings y Bajenov (1983).

Table 2. Experimental and recommended values for the viscosity of water, mPa · s

Temp. °C	Experimental			Recommended			
	[12]	[13]	[14]*	[17]	[16]	[15]	[21]
0	1.7916	1.7919		1.7865	1.787	1.7888	1.792
5	1.5192	1.5190	1.5184	1.5177	1.519	1.5142	
10	1.3069	1.3067		1.3061	1.307	1.3038	
15	1.1382	1.1380		1.1381	1.139	1.1370	
20	1.0020	1.0020	1.0020	1.0020	1.0020	1.0020	1.002
25	0.8903	0.8902		0.8903	0.8904	0.8911	
30	0.7975	0.7972		0.7976	0.7975	0.7983	
35	0.7195	0.7191			0.7194	0.7203	
40	0.6532	0.6527	0.6531	0.6531	0.6529	0.6540	0.656
50	0.5471			0.5471	0.5468		
60	0.4666		0.4665	0.4666	0.4665		0.469
70	0.4039				0.4042		

* Values in this column were originally expressed relative to an assigned value at 20 °C of 1.0050 mPa · s and have been corrected

Anexo C. Comparación de COP, PET y p-PET en términos de carbono ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en muestras de agua de mar de diferentes profundidades.

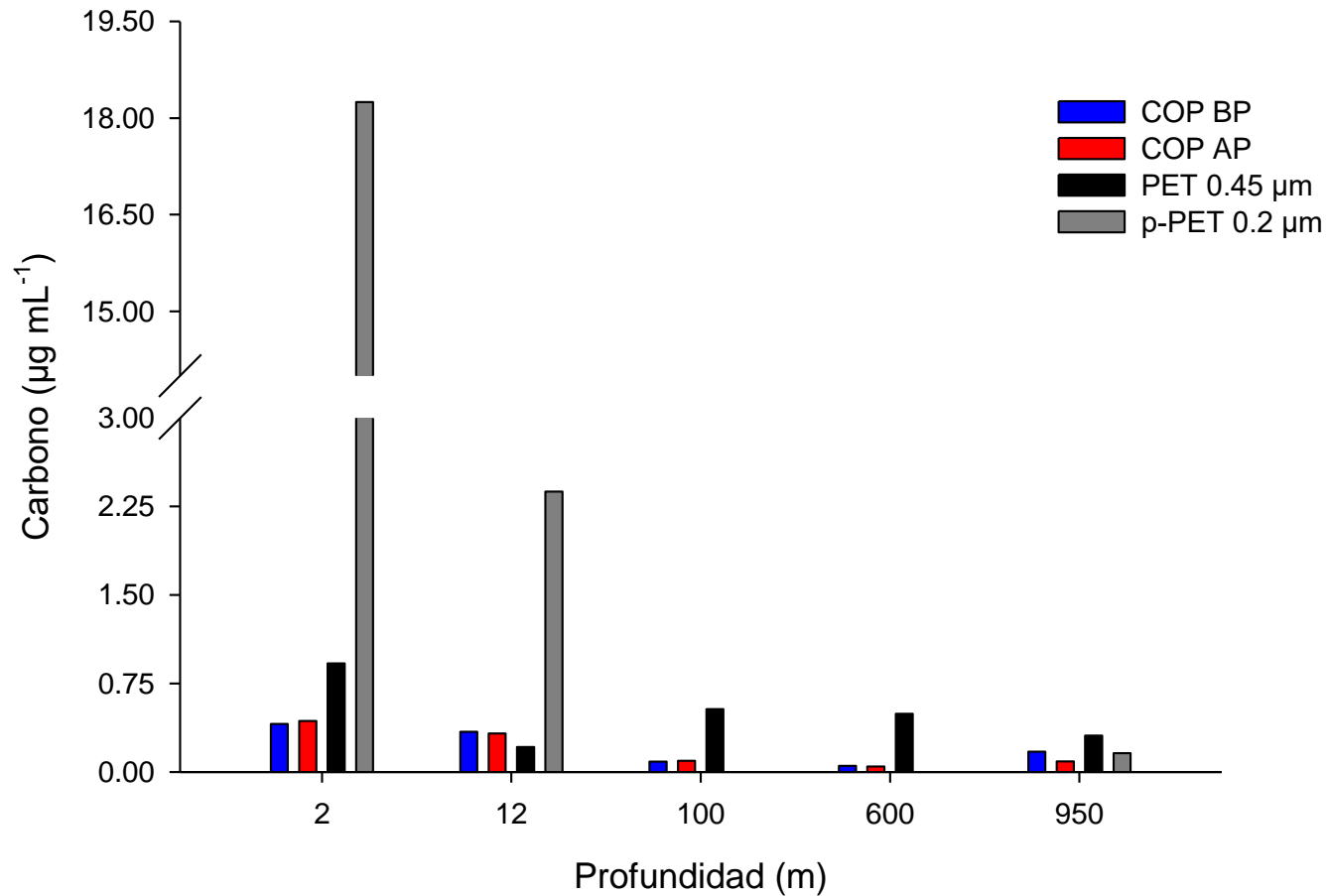


Figura 29. Contenido de carbono ($\mu\text{g mL}^{-1}$) presente en muestras de COP obtenidas a partir de filtraciones de agua de mar con baja y alta presión (BP y AP, respectivamente) y en muestras de PET y p-PET colectadas a partir de muestras de agua de mar. El contenido de carbono en muestras de PET y p-PET se calculó con el factor de conversión f' con un valor promedio de 0.63 (Engel, 2004).