

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



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre la
regulación fototrófica del fitoplancton y bacterias con
proteorodopsinas (PRs)**

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

Presenta:

Estefany Villarreal Peralta

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Estefany Villarreal Peralta

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Laura Gómez Consarnau

Directora de tesis

Miembros del comité

Dr. Ernesto García Mendoza

Dr. José Sandoval Gil

Dr. Josué Rodolfo Villegas Mendoza

Dra. María Asunción Lago Lestón



Dr. Jorge Adrián Rosales Casián

Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Estefany Villarreal Peralta © 2021

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

Resumen de la tesis que presenta **Estefany Villarreal Peralta** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre la regulación fototrófica del fitoplancton y bacterias con proteorodopsinas (PRs).

Resumen aprobado por:

Dra. Laura Gómez Consarnau
Directora de tesis

Las proteorodopsinas son proteínas transmembranales que capturan luz para generar energía bioquímica, la cual puede ser utilizada para crecimiento y supervivencia en bacterias marinas. Las mayores concentraciones de proteorodopsina se han observado generalmente en ambientes oligotróficos donde las concentraciones de clorofila-*a* y nutrientes inorgánicos son bajas. Sin embargo, en un estudio reciente en la zona de surgencia de la cuenca del Sur de California se observó que las máximas concentraciones de proteorodopsina coincidieron con concentraciones de clorofila-*a* altas durante las proliferaciones algales de primavera. Para comprender mejor la dinámica de comunidades fotótrofas, en este estudio investigamos las relaciones entre la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento del fitoplancton y microorganismos con proteorodopsinas, y la estructura de las comunidades microbianas asociadas al desarrollo de proliferaciones algales en un ambiente controlado. Con ese objetivo se realizó un experimento de incubación de mesocosmos durante 20 días con agua de mar colectada en la cuenca del Sur de California, induciendo el crecimiento fitoplanctónico con la adición de nutrientes inorgánicos. Se cuantificó la clorofila-*a*, proteorodopsina, abundancia bacteriana y se secuenciaron amplicones de las regiones V4-V5 del gen 16S de ARNr. Las máximas concentraciones de clorofila-*a* se presentaron entre los 8 y 12 días después del inicio del experimento, mientras que los niveles más altos de proteorodopsina y abundancias bacterianas se presentaron entre los 14 y 20 días. Bacterias en los órdenes Flavobacteriales y Rhodobacterales dominaron la estructura de las comunidades bacterianas, sugiriendo la utilización de proteorodopsinas en miembros de estos grupos. Estos datos sugieren que, a diferencia de lo observado en sistemas oligotróficos, en sistemas productivos la asimilación activa de nutrientes y materia orgánica por parte del bacterioplancton está acoplada a la obtención de energía solar mediante proteorodopsinas.

Palabras clave: proteorodopsina, retinal, bacterias marinas, bacterioplancton

Abstract of the thesis presented by **Estefany Villarreal Peralta** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Effect of nutrient availability on the phototrophic regulation of phytoplankton and bacterial with proteorhodopsins (PRs)

Abstract approved by:

Dra. Laura Gómez Consarnau
Thesis Director

Proteorhodopsins are transmembrane proteins that capture light to generate biochemical energy, which can be used for growth and survival in marine bacteria. By quantifying retinal, as a proxy for this photosystem, the highest concentrations of proteorhodopsin have generally been observed in oligotrophic environments where the concentrations of chlorophyll-*a* and inorganic nutrients are low. However, in a recent study in the upwelling region of the Southern California basin, maximum proteorhodopsin concentrations coincided with those of chlorophyll-*a* during spring algal bloom seasons. To better understand the dynamics of phototrophic communities, in this study we investigated the relationships between the availability of nutrients, the growth of phytoplankton and microorganisms with proteorhodopsins, and the structure of the microbial communities associated with the development of algal blooms in a controlled environment. With this objective, we carried out a mesocosm incubation experiment for 20 days with seawater collected in the Southern California basin, inducing phytoplankton growth with the addition of inorganic nutrients. We quantified chlorophyll-*a*, proteorhodopsin and bacterial abundances, and also sequenced and analyzed amplicons of the V4-V5 regions of the 16S rRNA gene. The highest concentrations of chlorophyll-*a* occurred between 8 and 12 days after the start of the experiment, while the highest levels of proteorhodopsin and bacterial abundances were found between days 14 and 20. Bacteria in the orders Flavobacteriales and Rhodobacterales dominated the structure of bacterial communities, suggesting the use of proteorhodopsins in members of these groups. These data suggest that, unlike what is observed in oligotrophic systems, in productive systems the active assimilation of nutrients and organic matter by bacterioplankton is coupled with obtaining solar energy through proteorhodopsins.

Keywords: proteorhodopsin, retinal, marine bacterial, bacterioplankton.

Dedicatoria

*A mis padres Rosa María y Arturo
por apoyarme en todo, gracias.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través de su Programa de Becas de Posgrados de Calidad.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y en particular al 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 directora de tesis, la Dra. Laura Gómez- Consarnau, quien me aceptó en su laboratorio y me brindó opciones para desarrollarme académicamente, además de ser una mentora paciente.

A mis profesores de quienes pude adquirir y reforzar conocimientos.

Al Departamento de Embarcaciones Oceanográficas de CICESE, quienes ayudaron a realizar el muestreo.

Al personal del Instituto de Oceanología de UABC, quienes prestaron las instalaciones y colaboraron para llevar a cabo las incubaciones.

A mis sinodales, quienes ayudaron a llevar a cabo mi tesis, prestando tiempo e infraestructura.

A Martin y Carmen, quienes me apoyaron en mis primeros experimentos, además de prestarme espacio para guardar mis muestras.

Al personal del Laboratorio de Metagenómica de la Dra. Asunción, en particular Yam, por apoyarme en todas las metodologías.

A mi compañero de laboratorio Abdiel, quien me ayudó siempre, además de batallar juntos en los comienzos del laboratorio de ecología microbiana.

A mis hermanos por apoyarme en todo momento y ser uno de los pilares de mi vida.

Un agradecimiento especial a Carlos, quien me brindó su amor incondicional, además de ayudarme en los momentos difíciles.

Tabla de contenido

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
1.2.1 Proteorodopsinas.....	2
1.2.2 Experimento de mesocosmos con nutrientes.....	6
1.2.3 Dinámica de comunidades microbianas y su estudio a través del gen 16S ribosomal	8
1.3 Justificación	11
1.4 Hipótesis.....	12
1.5 Objetivos	12
1.5.1 Objetivo general.....	12
1.5.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	13
2.1 Colecta de agua de mar.....	13
2.2 Preparación de experimento de mesocosmos.....	13
2.3 Monitoreo de parámetros de estudio.....	14
2.3.1 Cuantificación de clorofila- <i>a</i> en filtros de fibra de vidrio GFF.....	17
2.4 Microscopía de epifluorescencia.....	17
2.5 Citometría de flujo	18
2.6 Cuantificación de pigmentos.....	18
2.6.1 Extracción de Pigmentos	18
2.6.2. Análisis de clorofila- <i>a</i> en distintas fracciones microbianas.....	19
2.6.3. Extracción y cuantificación de retinal en distintas fracciones microbianas.....	19

2.7 Análisis de estructura de la comunidad microbiana mediante secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr.....	20
2.7.1 Extracción de DNA genómico.....	20
2.7.2 Preparación de bibliotecas.....	20
2.7.3 Desnaturalización y dilución de PhiX	21
2.7.4 Secuenciación.....	22
Capítulo 3. Resultados	23
3.1 Monitoreo	23
3.2.1 Clorofila- <i>a</i>	24
3.2.2 Proteorodopsina.....	26
3.2.3 Comparación de patrones de variación temporal de clorofila- <i>a</i> y proteorodopsina	27
3.3 Abundancia bacteriana	29
3.4 Secuenciación de Amplicones del gen 16S ARNr	32
3.4.1 Descripción de la comunidad microbiana	34
3.4.2 Estructura de las comunidades microbianas.....	36
3.5 Relación entre clorofila- <i>a</i> , proteorodopsina, abundancia bacteriana y abundancia de células de los órdenes bacterianos.....	42
Capítulo 4. Discusión.....	44
Capítulo 5. Conclusiones	49
Anexos	57

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de rodopsina. A) Proteína con siete α -hélices a través de la membrana celular. B) Esquema de la disposición helicoidal de una rodopsina microbiana con la molécula de retinal (imagen tomada de Ernst et al., 2013).....	3
Figura 2. (1) Asimilación de luz solar por la proteorodopsina, (2) bombeo de protones hacia el espacio periplasmático de la célula, (3) captura de protones por la ATPasa, 4 y 5) formación de ATP como consecuencia del gradiente de protones inducido por la luz (imagen modificada de DeLong y Béjà, 2010).....	3
Figura 3. (A) Concentración de proteorodopsina (retinal); (B) concentración de clorofila- <i>a</i> y (C) concentración de nitratos a lo largo del Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico Oriental Norte (Gómez-Consarnau et al., 2019).....	5
Figura 4. (A) Concentración de proteorodopsina (retinal), (B) concentración de clorofila- <i>a</i> en Pacífico Norte (SPOT) (Hassanzadeh et al., 2021).....	6
Figura 5. Concentración de clorofila- <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en dos diferentes mesocosmos experimentales (barras sombreadas). Control: sin modificaciones y +P: adición de fosfatos y nitratos (imagen modificada de Allers et al., 2007).....	8
Figura 6. Implementación de experimento de mesocosmos. A) Preparación de botellas con nutrientes inorgánicos. B) Sistema de circulación de tanques de incubación. C) Tanques de incubación con malla. D) Sensores de temperatura e irradiancia.....	14
Figura 7. Diagrama ilustrativo del diseño experimental. Se inició el experimento con 3 botellas control (sin nutrientes) y 28 botellas con nutrientes (N, P y Si). Cada 48 horas después del inicio del experimento, se retiraron dos botellas de tratamiento con nutrientes para estimar la abundancia bacteriana, analizar clorofila- <i>a</i> , retinal y DNA de la comunidad microbiana.....	16
Figura 8. Sistema de filtración línea con bomba peristáltica. Los filtros de diferente tamaño permiten capturar biomasa de acuerdo con el tamaño de los organismos.	17
Figura 9. Concentración de clorofila- <i>a</i> durante el monitoreo de experimento de mesocosmos (líneas verdes). Irradiancia diaria incidente en los tanques de incubación (barras blancas). Las barras de error indican el error estándar entre duplicados.....	24
Figura 10. Variación de la concentración de clorofila- <i>a</i> total a través del tiempo. El valor de clorofila- <i>a</i> total en esta figura se calculó mediante la suma de las tres fracciones microbianas. Las barras de error muestran el error estándar entre duplicados.	25
Figura 11. Variación de la concentración de clorofila- <i>a</i> total a través del tiempo, analizada en filtros con tamaño de poro de 0.2 μm , 3 μm y 10 μm	25
Figura 12. Variación de la concentración de proteorodopsina total (retinal) a través del tiempo. El valor de proteorodopsina total en esta figura se calculó mediante la suma de las tres fracciones microbianas. Las barras de error muestran el error estándar entre duplicados.	26
Figura 13. Variación de la concentración de proteorodopsina (retinal) a través del tiempo, analizada en filtros con tamaño de poro de 0.2 μm , 3 μm y 10 μm	27

Figura 14. Patrones de variación temporal: clorofila-a vs proteorodopsina.	28
Figura 15. Análisis de clústeres con método k-medoids: formación de tres grupos de acuerdo con las concentraciones de clorofila-a y proteorodopsina estimadas a través del tiempo.....	29
Figura 16. Abundancia bacteriana mediante dos métodos. Barras blancas: microscopía de epifluorescencia y barras negras: citometría de flujo.	30
Figura 17. Abundancia bacteriana cuantificada mediante citometría de flujo, durante experimento de mesocosmos. Barras blancas: células·mL ⁻¹ . Línea azul: concentración de proteorodopsina en filtros de tamaño de poro de 0.2 µm.....	31
Figura 18. Modelo de regresión lineal entre abundancia bacteriana estimada con citometría de flujo y la concentración de proteorodopsina en filtros de tamaño de poro de 0.2 µm.	31
Figura 19. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 0.2 µm.	32
Figura 20. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 3 µm.	33
Figura 21. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 10 µm.	33
Figura 22. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 0.2 µm: índice de Shannon-Weaver.....	34
Figura 23. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 3 µm: índice de Shannon-Weaver.....	35
Figura 24. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 10 µm: índice de Shannon-Weaver.....	35
Figura 25. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de tamaño de poro de 0.2 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.	37
Figura 26. Abundancia de <i>Synechococcus</i> cuantificada mediante citometría de flujo en experimento de mesocosmos.....	38
Figura 27. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de 3 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.....	39
Figura 28. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de tamaño de poro de 10 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.	41
Figura 29. Modelo de regresión lineal entre las células de flavobacteriales en filtros de tamaño poro de 0.2 µm y la concentración de proteorodopsina en filtros de 0.2 µm, en experimento de mesocosmos.	43
Figura 30. Matriz de correlación significativa de Pearson entre las células de órdenes bacterianos, concentración de clorofila-a, concentración de proteorodopsina y abundancia bacteriana. Los valores de correlación se encuentran entre -1 con colores cálidos y 1 con colores fríos.....	43
Figura 31. Gráfico de estimación de clústeres: método Average.	57

Figura 32. Gráfico de estimación de clústeres: método Elbow.57

Figura 33. Gráfico de estimación de clústeres: método GAP.58

Lista de tablas

- Tabla 1.** Tabla de datos de secuencias obtenidas en cada muestra: filtradas (inferidas), emparejadas (unión de forward y reverse) y libres de quimeras (tomadas en cuenta para asignación taxonómica). ...59
- Tabla 2.** Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la concentración de proteorodopsina (filtros con poro de 0.2 μm). Valores significativos en rojo. ..61
- Tabla 3.** Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la concentración de clorofila-a (filtros con poro de 0.2 μm). Valores significativos en rojo.62
- Tabla 4.** Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la abundancia bacteriana. Valores significativos en rojo.63

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción general

En los océanos, los microorganismos son la fracción dominante de las comunidades marinas, tanto en biomasa como en actividad metabólica (Pomeroy, 1974; Valiela et al., 1979). Tienen un papel central en los ciclos biogeoquímicos, soportan la productividad oceánica, capturan y transforman la energía solar, participan en la regulación de los gases de efecto invernadero, y representan una gran reserva de variabilidad genética. Sin embargo, su diversidad, fisiología y ecología sigue estando poco entendida (DeLong y Karl, 2005; Karl, 2007; Karl y Church, 2014).

Uno de los principales cuestionamientos dentro de la ecología microbiana se centra en cómo los microorganismos, tanto procariontes como eucariontes, se relacionan, compiten por la disponibilidad de nutrientes y transforman la energía (Handelsman, 2004). Para esta última actividad, se sabe que existen dos mecanismos que permiten a las bacterias, arqueas y microalgas recolectar la abundante energía solar: i) fotosíntesis a través de pigmentos como la clorofila-*a* y la bacterioclorofila-*a*, y ii) rodopsinas microbianas (Béjà et al., 2000; Niel, 1932; Woodward et al., 1990), presentes en el 80% de bacterias marinas (Dubinsky et al., 2017; Sieradzki et al., 2018; Olson et al., 2018).

La importancia de la fotosíntesis impulsada por clorofila-*a* en la fisiología y ecología de fitoplancton es indiscutible (Falkowski, 1994; Fuhrman y Hagstro, 2008; Zbigniew y Falkowski, 1993). Sin embargo, la comprensión del flujo de energía mediada por las rodopsinas microbianas y el papel ecológico que juegan las bacterias con dichas funciones en el océano es aún limitada (Pinhassi et al., 2016).

Las proteorodopsinas son un tipo de rodopsinas microbianas que funcionan como bomba de protones impulsadas por luz (Béjà et al., 2000). Se ha estimado que estas funciones están ampliamente distribuidas en el plancton microbiano, estando presentes en más de un del 80% del bacterioplancton en la superficie del océano (Dubinsky et al., 2017; Olson et al., 2018; Sieradzki et al., 2018) principalmente en los grupos de Flavobacteriales, Pelagibacterales (e.g., clado SAR11), Alteromonadales, Vibrionales y clado SAR86. Este trabajo se centra en el rol ecológico de las comunidades de bacterias con proteorodopsinas usando un sistema experimental cerrado y controlado con alta disponibilidad de nutrientes.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Proteorodopsinas

Las rodopsinas son proteínas transmembranales unidas por un enlace covalente a una molécula del cromóforo retinal (o aldehído de vitamina A). La cadena polipeptídica está formada por siete estructuras helicoidales unidas por bucles cortos a cada lado de la membrana celular (opsina) (figura 1) (Béjà et al., 2000; Oesterhelt y Stoeckenius, 1971; Stoeckenius, 1994). Esta estructura se conserva en las rodopsinas de todos los dominios de la vida. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos y nucleótidos pueden ser muy diferentes entre los diversos organismos, ya que posiblemente son producto de distintos orígenes evolutivos; y pueden realizar distintas funciones biológicas: bombeo de protones, bombeo de otros iones, detección de luz y regulación génica, fototaxis y visión (Foster et al., 1984; Oesterhelt y Stoeckenius, 1971; Spudich et al., 2000). De acuerdo con lo anterior, el conjunto de rodopsinas conocidas hasta hoy se clasifican en dos grandes familias: rodopsinas tipo I, (reportadas en bacterias, arqueas, fitoplancton y hongos) y rodopsinas tipo II, las cuales contribuyen a la capacidad de visión de los animales (Ernst et al., 2013).

Las primeras rodopsinas se identificaron en arqueas de ambientes hipersalinos por Oesterhelt y Stoeckenius (1971). La proteína fotosensible fue nombrada bacteriorodopsina y su descubrimiento inició una nueva línea de investigación que durante décadas ha llevado a una mejor comprensión de las estructuras, interacciones y actividades de estas proteínas de membrana, así como estudios bioquímicos, biofísicos y biotecnológicos usando como referencia este sistema (Brock y Petersen, 1976; Grote y O'Malley, 2011; Johnson et al., 2010; Oesterhelt y Krippahl, 1983; Spudich y Bogomolni, 1984). Estructuras similares a las bacteriorodopsinas de arqueas se han encontrado en organismos eucariontes (algas, hongos y animales) (Bieszke et al., 1999; Foster et al., 1984; Spudich et al., 2000); y más tarde en bacterias (Béjà et al., 2000), identificándose así como los mecanismos de fototrofia más abundantes en los tres dominios de la vida (Finkel et al., 2013).

Las proteorodopsinas son rodopsinas de tipo I que funcionan como bomba de protones. Utilizan la energía lumínica para bombear protones hacia el espacio periplasmático de la célula, que después son tomados por la ATPasa hacia el citoplasma de la célula para unir un fosfato al ADP y generar así ATP, energía suplementaria a la obtenida por respiración o fosforilación (DeLong y Béjà, 2010) (figura 2). La energía obtenida mediante este proceso puede sustentar un mayor crecimiento, aumentar la capacidad de

sobrevivencia en estados de inanición y/o aumentar la tasa de toma de sustratos (Gómez-Consarnau et al., 2007, 2010, 2016; Palovaara et al., 2014; Wang et al., 2012).

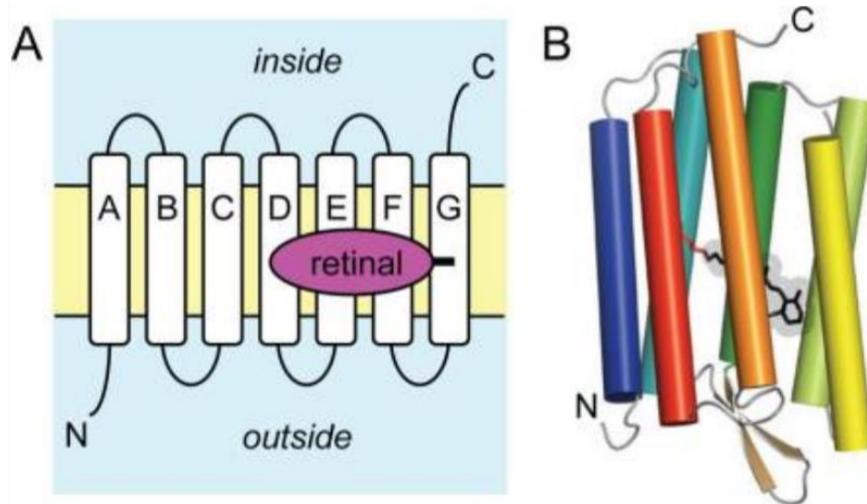


Figura 1. Estructura de rodopsina. A) Proteína con siete α -hélices a través de la membrana celular. B) Esquema de la disposición helicoidal de una rodopsina microbiana con la molécula de retinal (imagen tomada de Ernst et al., 2013)

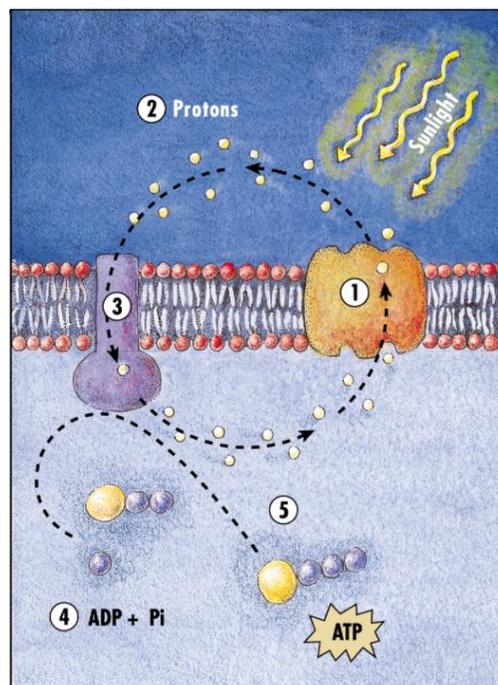


Figura 2. (1) Asimilación de luz solar por la proteorodopsina, (2) bombeo de protones hacia el espacio periplasmático de la célula, (3) captura de protones por la ATPasa, 4 y 5) formación de ATP como consecuencia del gradiente de protones inducido por la luz (imagen modificada de Delong y Bèjà, 2010).

En un transecto a lo largo del Mar Mediterráneo y la costa este del Atlántico Norte, Gómez-Consarnau et al. (2019) realizaron la primera cuantificación de retinal en las bacterias marinas como una aproximación de la síntesis de proteorodopsina, también midieron las concentraciones de clorofila-*a* y nutrientes. Los resultados de este trabajo mostraron que las proteorodopsinas puede llegar a captar la misma cantidad de energía solar que la clorofila-*a*. Además, observaron que en las zonas donde se detectaron las mayores concentraciones de proteorodopsina, las concentraciones de clorofila-*a* y de nutrientes (nitratos y fosfatos) fueron más bajas (figura 3). Por lo contrario, Hassanzadeh et al. (2021) aplicando el mismo método de cuantificación de proteorodopsina, muestra una tendencia inversa en el Pacífico Norte, es decir, las zonas con mayores concentraciones de clorofila-*a* coincidieron con las altas concentraciones de proteorodopsina (figura 4).

Ambos estudios consistieron en observaciones puntuales realizadas "*in situ*", por lo cual no fue posible establecer si la relación de la regulación de la síntesis de esta proteína es consecuencia de los nutrientes inorgánicos, así como el material orgánico disuelto (DOM, por sus siglas en inglés); y/o la relación que existe con la abundancia fitoplanctónica, ya que la síntesis de proteorodopsina puede estar influenciada por múltiples factores ambientales. En este sentido, los experimentos de incubación de agua de mar en sistemas de mesocosmos son útiles para estudiar los efectos de diferentes cambios ambientales (e.g., temperatura, concentración de nutrientes, pH) en comunidades microbianas naturales (Pinhassi et al., 2004).

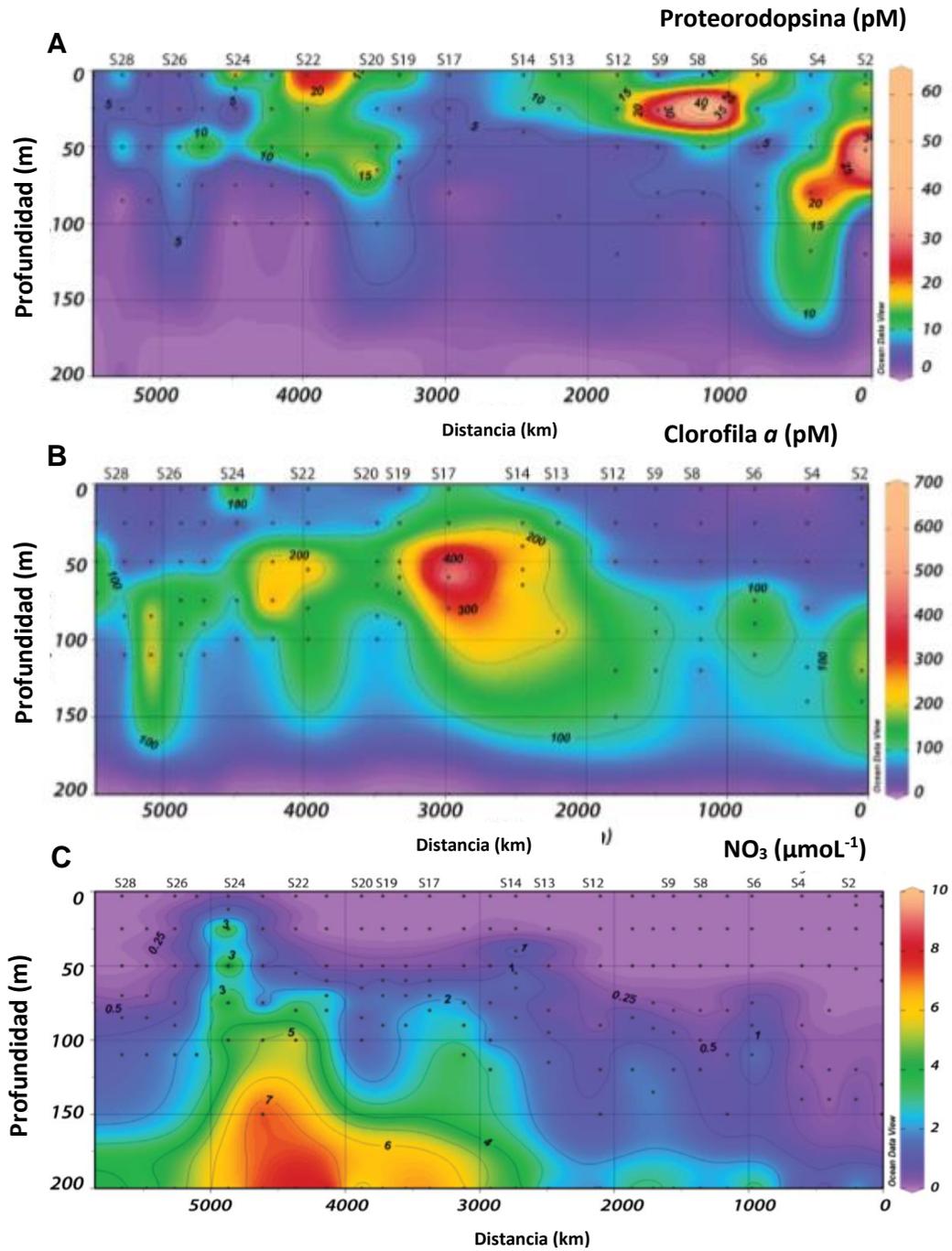


Figura 3. (A) Concentración de proteorodopsina (retinal); (B) concentración de clorofila- α y (C) concentración de nitratos a lo largo del Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico Oriental Norte (Gómez-Consarnau et al., 2019).

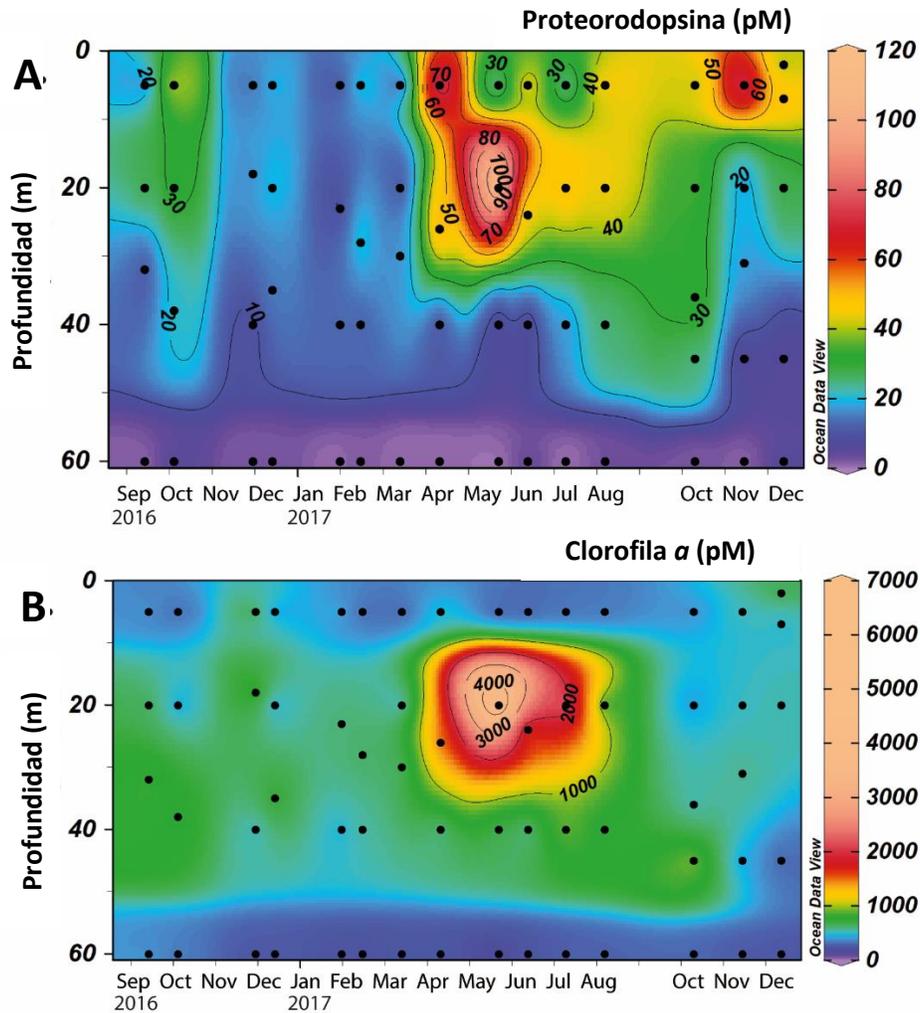


Figura 4. (A) Concentración de proteorodopsina (retinal), (B) concentración de clorofila-*a* en Pacífico Norte (SPOT) (Hassanzadeh et al., 2021).

1.2.2 Experimento de mesocosmos con nutrientes

Uno de los principales retos en oceanografía biológica es el poder identificar cómo los diferentes factores ambientales abióticos (p. ej. temperatura, disponibilidad de nutrientes, etc.) influyen en las comunidades microbianas naturales. Una posible solución para observar más claramente la dinámica de las comunidades microbianas es realizar experimentos de incubación de agua de mar en condiciones de laboratorio, las cuales permiten controlar varios de estos factores ambientales (Allers et al., 2007; Lekunberri, 2008; Pinhassi et al., 2004). Los experimentos de incubación de agua difieren de acuerdo al volumen utilizado, algunos autores como Bloesch (1988) definen microcosmos aquellos con volumen <1

m³, mesocosmos los que contienen volúmenes de 1 m³ hasta 1000 m³ y macrocosmos los que contienen volúmenes > 1000 m³. Esta división es arbitraria, puesto que otros trabajos toman distintos criterios de volumen a la hora de definir el concepto mesocosmos, aun así, todos coinciden en su caracterización como un experimento de incubación de agua con un objetivo de estudio claro, donde se simulan los factores ambientales. Aquí se toma la definición de mesocosmos como cualquier sistema artificial capaz de contener y aislar a las comunidades de organismos acuáticos con el propósito de someterlas a experimentación (Petersen y Englund, 2005).

Se sabe que los florecimientos de fitoplancton ocurren cuando además de la luz, hay una gran disponibilidad de nutrientes en el agua (Smayda, 1991). Los florecimientos algales o *blooms* han sido simulados artificialmente en numerosos experimentos de mesocosmos mediante la adición de algún nutriente inorgánico en particular, o la combinación de varios. Esto permite observar la sucesión de los distintos grupos de microorganismos autótrofos y con ello el cambio en las comunidades del bacterioplancton a lo largo del tiempo. Por ejemplo, Allers et al. (2007) a través de incubaciones de agua de mar en mesocosmos de más de 200 litros describieron como en aguas superficiales del Mar Mediterráneo, la adición de nitrato y fosfato estimuló el crecimiento del fitoplancton, representado como un incremento de la concentración de clorofila-*a* (figura 5). A través de este experimento fue posible identificar de manera más directa el desarrollo de las comunidades bacterianas a lo largo del experimento. El agua muestreada en el oeste del Mediterráneo fue incubada con periodos de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz y la temperatura se ajustó a la registrada en el sitio de muestreo. Como resultado se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de clorofila-*a*, entre los tratamientos control y los tratamientos a los que se les adicionó nutrientes y se determinó la sucesión de distintos grupos bacterianos a lo largo del tiempo.

Otro ejemplo claro de la importancia de este tipo de experimentos, donde aumenta la concentración de clorofila-*a* con la adición de nutrientes es el de Bunse et al. (2016), donde el factor de estudio fue la respuesta del bacterioplancton ante el cambio del pH. Colectaron agua con baja concentración de nutrientes cerca de la costa de Cataluña y la dividieron en cuatro tratamientos: 1) mesocosmos control, sin adición de otro factor, 2) mesocosmos con burbujeo constante de CO₂, 3) mesocosmos con exceso de nutrientes inorgánicos y 4) mesocosmos con exceso de nutrientes inorgánicos y burbujeo de CO₂. Sus resultados mostraron que la concentración de clorofila-*a* aumento de forma significativa en aquellos tratamientos donde se agregaron nutrientes inorgánicos y que el bacterioplancton favoreció la expresión de genes de homeostasis de pH en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes.

Estudios similares (Pinhassi et al., 2006, 2004; Scha et al., 2001) demuestran que los experimentos de mesocosmos son factibles para la simulación de proliferaciones algales y el estudio de las comunidades microbianas asociadas a estos eventos.

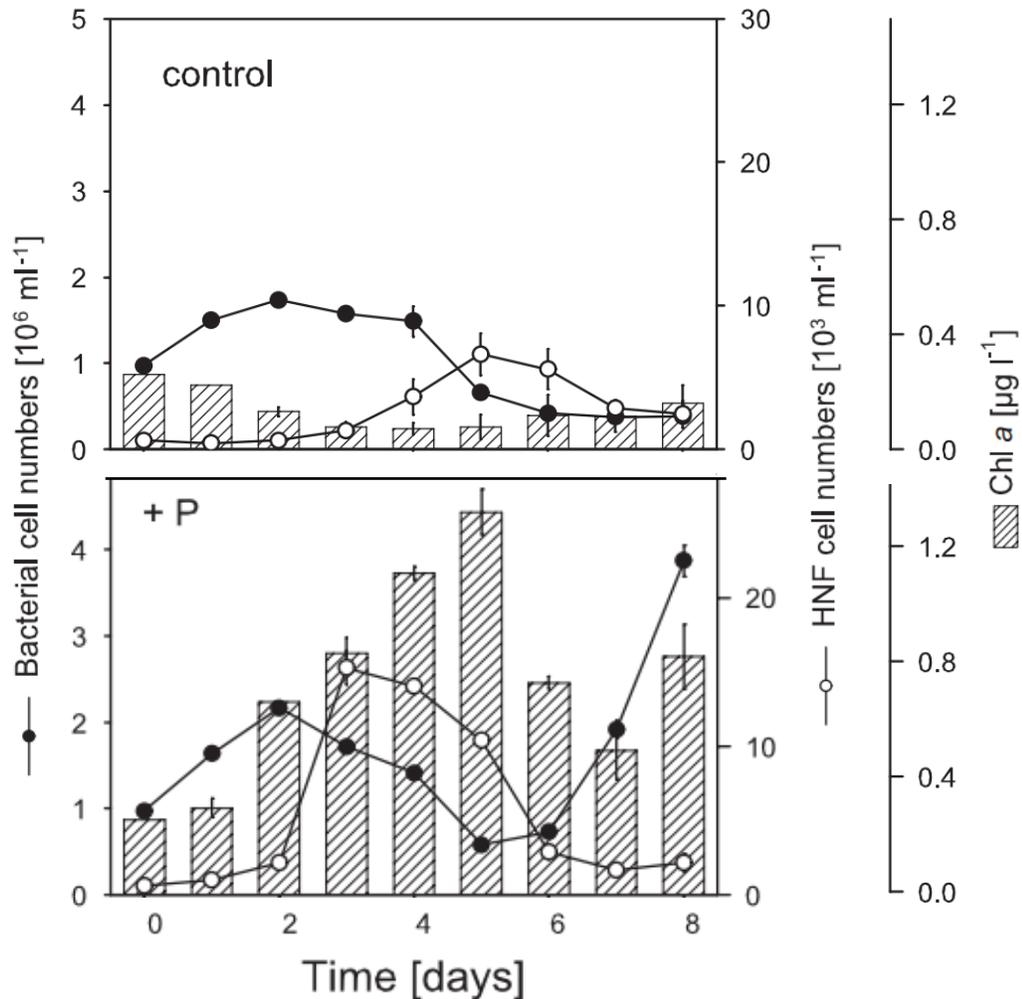


Figura 5. Concentración de clorofila-*a* ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en dos diferentes mesocosmos experimentales (barras sombreadas). Control: sin modificaciones y +P: adición de fosfatos y nitratos (imagen modificada de Allers et al., 2007).

1.2.3 Dinámica de comunidades microbianas y su estudio a través del gen 16S ribosomal

En los ambientes marinos, habitan aproximadamente 3.6×10^{28} microorganismos a una densidad promedio de 5×10^5 células mL^{-1} (Cock et al., 2010). Sin embargo, estimar la diversidad microbiana había resultado difícil ya que menos del 1% de los microbios son cultivables (Torsvik y Øvreås, 2002). Por lo tanto, los métodos de cultivo de bacterias, resultan inadecuados para establecer el rol ecológico de los microbios

(Salazar y Sunagawa, 2017). Por lo anterior, para los análisis de diversidad bacteriana se ha utilizado el gen 16S ribosomal (16S ARNr) como marcador molecular, ya que contiene una variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie, posee sitios conservados adyacentes para su amplificación por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y tiene una longitud adecuada que permite la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa, así como una baja frecuencia de transferencia horizontal (Caumette et al., 2015; Woese y Fox, 1977).

De las nueve regiones del gen 16S ARNr, las primeras cinco (V1-V5) son las que se consideran para el diseño de cebadores o *primers*, ya que su variabilidad permite diferenciar los distintos grupos de bacterias. El par de *primers* 515F-Y/ 926R, que amplifica las regiones V4-V5, ha demostrado mejores resultados comparado con otros *primers*, ya que reduce el sesgo de sobrestimación o subestimación de algunos grupos bacterianos (Parada et al., 2015; Walters et al., 2015).

Las particularidades del gen 16S ARNr han permitido la secuenciación de miles de millones de fragmentos y generar información genómica para la identificación de especies bacterianas y asignación de especies en todo el mundo (Salazar y Sunagawa, 2017) y con ello establecer la estructura de las comunidades microbianas que a su vez permiten entender la importancia de cada grupo en los distintos ambientes.

Como resultado del estudio del gen 16S ARNr en distintas zonas del océano a lo largo de los años, se han identificado patrones de distribución de ciertos grupos taxonómicos asociados a distintas características del agua, dentro de los cuales destacan por su abundancia y función ecológica: SAR11, SAR86, Flavobacterias, Rhodobacterales y las Cianobacterias (Buchan et al., 2005, 2014; Fuhrman y Hagstro, 2008; Moran et al., 2007; Morris et al., 2002)

Dentro de las Alfarproteobacterias se encuentra el grupo más abundante de los océanos, el Clado SAR11. Constituyen aproximadamente el 33% de las comunidades microbianas presentes en la zona eufótica y aunque se considera un grupo diverso y cosmopolita, sus mayores abundancias se han reportado en los ambientes oligotróficos (Fuhrman y Hagstrom, 2008; Morris et al., 2002; Steindler et al., 2011). Además, las especies de este grupo poseen genes de proteorodopsinas, lo cual ofrece una ventaja ecológica en ambientes con poca disponibilidad de nutrientes (Gómez-Consarnau et al., 2010).

El orden Rhodobacterales, perteneciente también a las Alfarproteobacterias, compone el 20% del bacterioplancton costero y el 15% de las comunidades bacterianas en ambientes oceánicos (Buchan et al., 2014; Moran et al., 2007). Son clave en la transformación de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre y se ha propuesto que establecen relaciones con el fitoplancton de tipo mutualista y patógena (Buchan et al., 2014; Moran et al., 2007; Newton et al., 2010; Seyedsayamdost et al., 2011). Dentro de este orden también

se encuentran géneros que contienen la bacterioclorofila-*a*, pigmento que les permite la asimilación de energía solar a través de la fototrofia aeróbica anoxygenica (Newton et al., 2010; Shiba, 1991).

Del clado SAR86 perteneciente a las Gamaproteobacterias, debido a que no es cultivable, se conoce poco sobre su fisiología, pero diversos estudios identifican a este grupo como uno de los más abundantes en las superficies oceánicas y costeras (Dupont et al., 2012).

En el grupo de los Bacteroidetes, el orden Flavobacteriales es el mejor estudiado, por su presencia en los florecimientos algales, ya que tienen la capacidad de degradar compuestos complejos derivados del decaimiento fitoplanctónico. También disponen de bombas de protones (proteorodopsinas) que se sintetizan durante los florecimientos de fitoplancton e impulsa el crecimiento bacteriano (Riemann et al., 2000; Williams et al., 2013). Se encuentran distribuidos principalmente en zonas costeras y océanos templados (Buchan et al., 2014; Fuhrman y Hagstrom, 2008).

Finalmente, uno de los grupos más abundantes y del cual existe un mayor conocimiento en diversos aspectos como genética y fisiología, son las cianobacterias marinas. Forman parte del fitoplancton por su contenido de clorofila-*a*, lo que les permite realizar fotosíntesis oxigenica. Son organismos cosmopolitas y tienden a formar florecimientos con el incremento de la temperatura y exceso de nutrientes (Fuhrman y Hagstro, 2008; Partensky et al., 1999).

De los grupos descritos, solo algunos son cultivables, por lo que no se tiene un panorama completo de las funciones ecológicas de cada uno, recalando así la importancia del uso de técnicas de biología molecular para determinar sus patrones de distribución en el océano. Sin embargo, la secuenciación del gen 16S ARNr no proporciona por sí sola un medio para probar hipótesis ecológicas, pero es una herramienta confiable para la estimación y caracterización de las diferentes comunidades procariontas que permite plantear hipótesis ecológicas que involucran microorganismos no cultivables (Handelsman, 2004).

1.3 Justificación

Este trabajo toma como base el reciente estudio de Gómez-Consarnau et al. (2019) y el trabajo de Hassanzadeh et al. (2021). En el primero se observó que en el mar Mediterráneo las zonas con mayor abundancia de proteorodopsina presentan las concentraciones más bajas de clorofila-*a* y de nutrientes (nitratos y fosfatos). Esto sugiere que sistemas más productivos (i.e. con mayor disponibilidad de nutrientes inorgánicos y mayor productividad primaria) estarán mayormente dominados por clorofila-*a*, y la fototrofia mediante proteorodopsina se verá limitada a aguas con baja disponibilidad de sustratos. Sin embargo, Hassanzadeh et al. (2021) mostraron que, en un ambiente con alta disponibilidad de nutrientes como es la región de la cuenca del Sur de California, las mayores concentraciones de clorofila-*a* coincidieron con las mayores concentraciones de proteorodopsina. Ante estas observaciones surgió la pregunta: ¿cuál es la dinámica de las comunidades microbianas con proteorodopsinas en relación con la disponibilidad de nutrientes y qué procesos biológicos entre el fitoplancton y las bacterias con proteorodopsinas, regulan la síntesis de estos fotosistemas?

Debido a que los estudios mencionados consistieron en observaciones puntuales realizadas *in situ*, no fue posible establecer una relación directa entre la regulación de la síntesis de esta proteína y la dinámica de presencia de nutrientes inorgánicos, y/o la relación que existe con la abundancia fitoplanctónica o de otros factores ambientales. En este sentido, los experimentos de mesocosmos son una herramienta ideal para inferir la dinámica entre la disponibilidad de nutrientes y la presencia del fitoplancton y las bacterias con proteorodopsinas, permitiendo su estudio en un ambiente controlado.

1.4 Hipótesis

En un ambiente controlado, el aumento de la concentración de nutrientes estimulará el crecimiento del fitoplancton aumentando la concentración de clorofila-*a* a lo largo del tiempo. Durante este aumento de la biomasa de fitoplancton y su sucesiva disminución, estarán asociadas diferentes comunidades microbianas con distintas capacidades fototróficas mediante proteorodopsinas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- Exponer la dinámica entre la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento de microorganismos con clorofila-*a* y microorganismos con proteorodopsinas, así como describir la estructura de las comunidades microbianas asociadas al desarrollo del fitoplancton en un ambiente controlado.

1.5.2 Objetivos específicos

- Examinar la relación entre la concentración de proteorodopsina (retinal) y de clorofila-*a* durante el crecimiento y disminución de la abundancia del fitoplancton en un ambiente controlado a través del tiempo.
- Caracterizar las comunidades microbianas presentes a lo largo del experimento.
- Estimar la abundancia bacteriana.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Colecta de agua de mar

Se realizó una colecta de agua fuera de Bahía de Todos Santos, región noroeste de la península de Baja California (México), localizada entre los 31°40' y 31°56' N y 116°36' y 116°55' W, la cual cuenta con dos bocas por las que establece comunicación con el Océano Pacífico (Pavía y Reyes, 1983). El agua fue tomada el dos de octubre de 2019, en las coordenadas 31°53.580' W, -116°57.240' N, a una profundidad de dos metros, con ayuda de una bomba manual localizada en la cubierta de la embarcación "Rigel" (propiedad de CICESE). Con el objetivo de inducir el crecimiento fitoplanctónico, la estación y la fecha de muestreo fueron elegidas de acuerdo con los resultados de los monitoreos mensuales del Laboratorio FICOTOX, los cuales reportan la concentración más baja de clorofila-*a* en la localidad elegida y durante este periodo (Horta García, 2020).

El agua se colectó en botellas de plástico de 20 L, previamente lavadas con HCl al 1%, y se transportaron al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California, donde se implementó inmediatamente el experimento que se llevó a cabo durante 30 días.

2.2 Preparación de experimento de mesocosmos

Se transfirieron 10 L de agua de mar en cada una de las 33 botellas de polietileno de baja densidad (LPD) (figura 6A), previamente enjuagadas con HCl al 1%. Tomando como referencia las concentraciones de nutrientes de la Bahía de Todos Santos durante esta temporada ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2 = 4.67 \mu\text{M}$, $\text{PO}_4^{-3} = 1.09 \mu\text{M}$ y $\text{SiO}_2 = 8.49 \mu\text{M}$) reportadas por Fimbres (2019), se añadieron nutrientes inorgánicos para alcanzar concentraciones finales ($20 \mu\text{M NaNO}_3$, $2 \mu\text{M NaH}_2\text{PO}_4$, $20 \mu\text{M SiOH}_4$) y así estimular un crecimiento artificial microalgal en 30 botellas marcadas como R1 hasta R30. Las tres botellas restantes se utilizaron como control sin nutrientes y fueron marcadas como C1, C2 y C3.

Todas las botellas fueron colocadas en tanques de exterior con recirculación de agua que mantenían una temperatura constante similar a la reportada en Bahía de Todos Santos ($18^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$) (Pavía y Reyes, 1983) (figura 6B).

Con el propósito de simular la exposición de radiación solar en el océano a la profundidad donde se colectó el agua, se colocaron mallas negras encima de los tanques (figura 6C), reduciendo de este modo la cantidad

de luz incidente. Se instalaron dos sensores HOBO contrapuestos, que permitieron el monitoreo de la temperatura y la irradiancia, tanto incidente en el tanque como la reflejada en las paredes (figura 6D).



Figura 6. Implementación de experimento de mesocosmos. A) Preparación de botellas con nutrientes inorgánicos. B) Sistema de circulación de tanques de incubación. C) Tanques de incubación con malla. D) Sensores de temperatura e irradiancia.

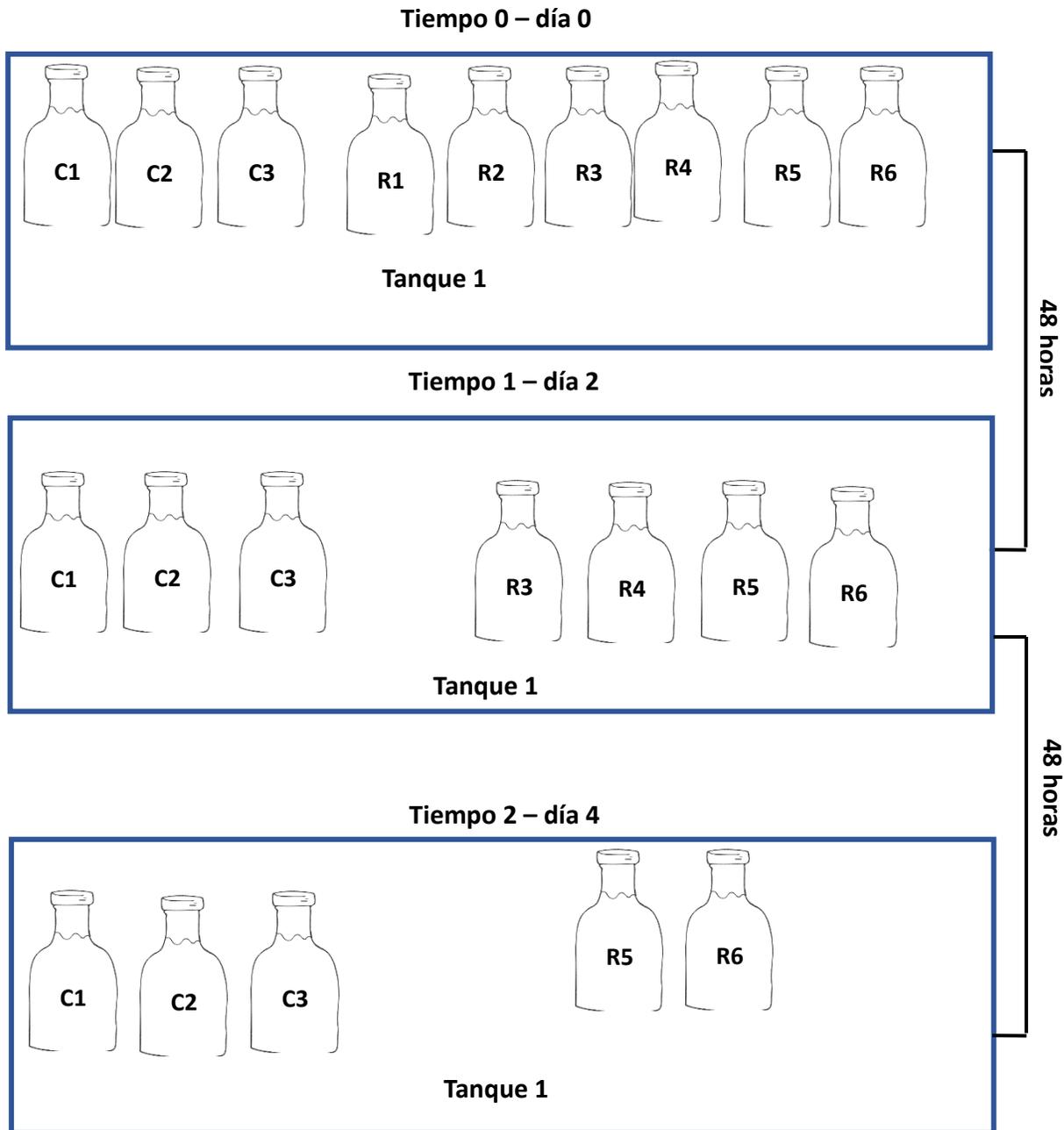
2.3 Monitoreo de parámetros de estudio

La radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) se midió durante todo el experimento con sensores HOBO (n/s: 20376135, 20376138) colocados de manera contrapuesta dentro de los tanques de incubación permitiendo el monitoreo de la temperatura y la irradiancia, tanto incidente en el tanque como la reflejada en las paredes. Los datos de los sensores fueron sumados para obtener la irradiancia

total del tanque y con el objetivo de conocer la PAR total, se usó un factor de conversión de 0.0189 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) obtenido previamente mediante la calibración de los sensores con un irradiómetro plano LICOR 2 π .

En la figura 7 se muestra el diseño experimental del estudio. Con el propósito de seguir el desarrollo del crecimiento fitoplanctónico durante el experimento, desde el día de inicio del mesocosmos (tiempo 0) y cada 48 horas (tiempo 1 al 14), se tomaron 100 mL de agua de los controles y se midió la clorofila-*a* mediante fluorescencia (Welschmeyer, 1994). Estas mediciones permitieron comparar el incremento de clorofila-*a* en los tratamientos con nutrientes y así conocer el desarrollo del crecimiento fitoplanctónico. También, cada 48 horas, se retiraron dos réplicas del tratamiento de nutrientes en su totalidad y se transportaron en oscuridad (evitando así afectar los pigmentos) a las instalaciones del CICESE (figura 7). Con el fin de diferenciar los distintos tipos de organismos por tamaño el agua se filtró usando una bomba peristáltica, fraccionando en línea a través de tres filtros de diferente tamaño de poro: 10 μm (microplancton), 3 μm (nanoplancton) y 0.2 μm (picoplancton), utilizando para las primeras dos fracciones filtros de policarbonato (PC) de 47 mm de diámetro y cartuchos Sterivex™ para la fracción de 0.2 μm (figura 8). Se filtraron 2 L para el estudio de las comunidades microbianas mediante análisis 16S ARNr y 6 L (o hasta la saturación de los filtros) para la medición de proteorodopsina mediante la cuantificación de retinal (Gómez-Consarnau et al., 2019) y clorofila-*a* en esas fracciones concretas. Los filtros fueron transferidos a tubos crioviales de 2 mL y conservados en nitrógeno líquido al igual que los cartuchos Sterivex™, hasta su procesamiento.

Además, para cada botella retirada se tomaron 15 mL de agua para análisis de microscopía de epifluorescencia (fijando al instante con 200 μL de formalina) y preservada a una temperatura de -20° C hasta su procesamiento y se colectaron muestras de 1.8 mL para análisis de citometría de flujo, las cuales se fijaron con 36 μL de formalina y se preservaron a -80° C, hasta el momento de su lectura.



(Se retiraron 2 botellas cada 48 horas hasta el día 28, obteniendo un total de 15 puntos de muestreo en el tiempo)

Figura 7. Diagrama ilustrativo del diseño experimental. Se inició el experimento con 3 botellas control (sin nutrientes) y 28 botellas con nutrientes (N, P y Si). Cada 48 horas después del inicio del experimento, se retiraron dos botellas de tratamiento con nutrientes para estimar la abundancia bacteriana, analizar clorofila-*a*, retinal y DNA de la comunidad microbiana.

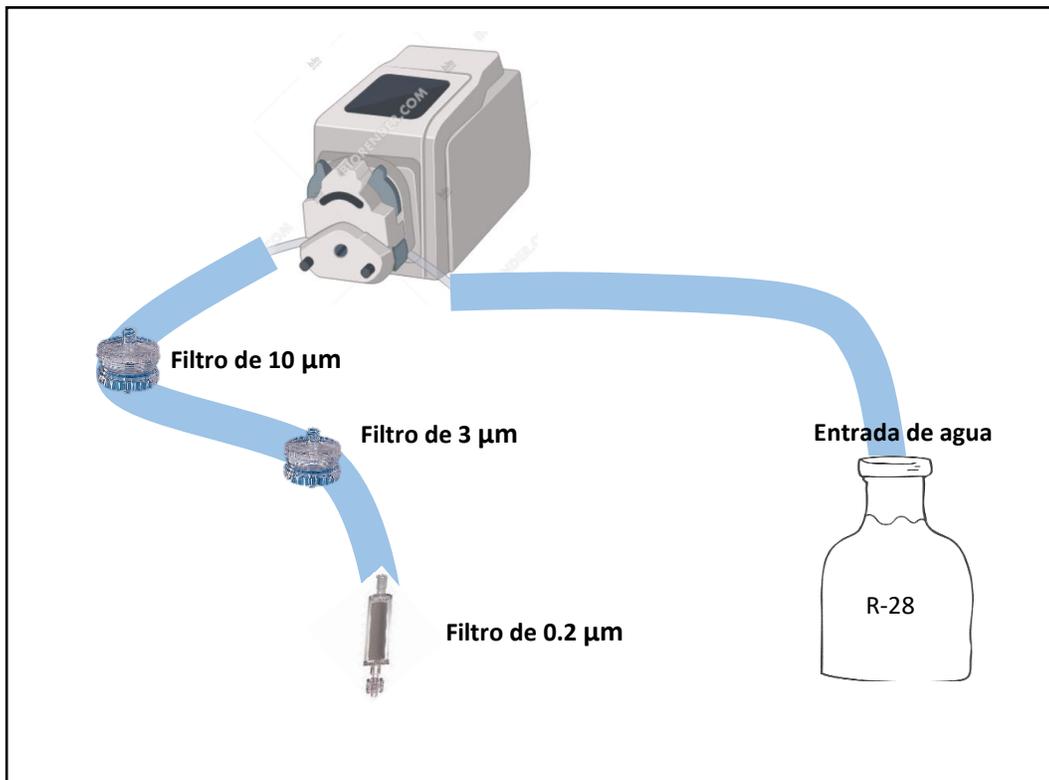


Figura 8. Sistema de filtración línea con bomba peristáltica. Los filtros de diferente tamaño permiten capturar biomasa de acuerdo con el tamaño de los organismos.

2.3.1 Cuantificación de clorofila- α en filtros de fibra de vidrio GFF

Se filtraron los 100 mL de muestra a través de filtros de fibra de vidrio GF/F de 25 mm de diámetro (Whatman) usando una bomba de vacío para su análisis durante el transcurso del experimento. Posteriormente, se introdujo cada filtro en un vial oscuro con 10 mL de acetona 90%. Los viales se pusieron a una temperatura de 4° C, durante 24 horas para la extracción del pigmento. Las concentraciones de clorofila- α fueron estimadas en oscuridad con un fluorómetro Turner Designs mediante el método de Welschmeyer (1994).

2.4 Microscopía de epifluorescencia

Las muestras preservadas para microscopía fueron descongeladas a temperatura ambiente y posteriormente fueron procesadas de acuerdo con la metodología de Hobbie et al. (1977): se tomaron 2 mL de la muestra y se le agregaron 50 μ L del colorante naranja de acridina 0.01%, dentro de una torre de

filtrado. Se filtró con una bomba de vacío a través de un filtro de Nucleopore de polycarbonato (NP) con tamaño de poro de 0.2 μm y 25 mm de diámetro, preteñido con colorante de irgalán negro y debajo de este se colocó un filtro GFF Whatman® de 25 mm de diámetro humedecido previamente con agua Milli-Q®, evitando así el rompimiento del filtro NP. Una vez filtrado el volumen de la muestra y sin dejar secar completamente, se colocó el filtro de NP sobre una gota de aceite de inmersión no fluorescente y de baja viscosidad en un portaobjetos de vidrio. Se añadió una segunda gota de aceite en el filtro y se colocó un cubreobjetos de vidrio.

Se observó en el microscopio de epifluorescencia Nikon Ti Eclipse Inverted Microscope con un aumento de 100X y se tomaron fotos para realizar posteriormente el conteo directo de células. Se contaron 20 campos para tener un 95% de confiabilidad en un área determinada de 120X60 μm . La abundancia bacteriana fue estimada usando la fórmula de Hobbie et al. (1977) (ecuación 1):

$$N_t = ((N * A_t) / (V * A_g)) \quad (1)$$

N_t (células mL⁻¹); **N**, total de células contadas/número de campos contados; **A_t** (mm²) área del de filtración efectiva; **V** (mL) volumen filtrado; **A_g**, (mm²) área determinada para conteo de células.

2.5 Citometría de flujo

Las muestras designadas para citometría de flujo fueron analizadas en el Instituto de Oceanografía de Scripps en San Diego California, EE. UU. Las muestras se descongelaron y se tiñeron con SYBR® Green I (ThermoFisher Scientific). Posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences) como lo describen Gasol y Giorgio (2000).

2.6 Cuantificación de pigmentos

El procedimiento de extracción y cuantificación de pigmentos se llevó a cabo en la Universidad del Sur de California en Los Ángeles California, EE. UU. mediante el método de Gómez-Consarnau (2019).

2.6.1 Extracción de Pigmentos

La extracción de pigmentos en las distintas fracciones microbianas (10 μm , 3 μm y 0.2 μm) para obtener las concentraciones de retinal y clorofila-*a* se realizó mediante una extracción inicial con metanol. Los

filtros designados para pigmentos fueron descongelados y transferidos a tubos Falcon de 15 mL cubiertos con papel aluminio, evitando así la exposición de luz, a los cuales se les adicionó previamente 3 mL de metanol de grado LC-MS (BAKER ANALYZED® LC-MS) y 250 µL de hidroxitolueno butilado metanólico al 0.1% (Sigma-Aldrich). Las muestras se sonificaron por 30 segundos a 400 Watts (Branson Ultrasonics 450 Digital Sonifier) en hielo usando un accesorio de micropunta de 1/8". Posteriormente las muestras fueron agitadas con un vortex y se mantuvieron a -20 °C en oscuridad por 24 horas. Después las muestras se centrifugaron por 10 minutos a una temperatura de 4° C y 4300 g.

2.6.2. Análisis de clorofila-*a* en distintas fracciones microbianas

A continuación, las muestras para el análisis fluorimétrico de clorofila-*a* se diluyeron en acetona. Se tomaron 100 µL de cada extracto metanólico y se diluyeron en 4.9 mL de acetona al 90% (v:v) y se realizaron por triplicado la cuantificaciones fluorométricas de clorofila-*a* usando el método de no acidificación (Knap et al., 1996). Se tomaron alícuotas de 3-100 µL para las mediciones y se utilizó un fluorómetro de laboratorio 10AU (Turner Designs).

2.6.3. Extracción y cuantificación de retinal en distintas fracciones microbianas

Al extracto sobrante de cada muestra del apartado anterior, se le adicionó 100 µL de *all-trans-retinal* metanólico deuterado ($C_{20}H_{23}D_5O$, Santa Cruz Biotechnology Inc., (CAS 116-31-4 unlabeled)) para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 nM como estándar interno para la cuantificación del retinal con el uso de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para desplazar el retinal unido covalentemente de la proteína rodopsina, se agregaron 100 µL de hidrocloreuro de hidroxilamina acuosa en exceso (Sigma-Aldrich) obteniendo así una concentración final de 34 mM $NH_2OH \cdot HCl$. La extracción del retinal (ahora en forma de retinal oxima, después de su extracción con hidroxilamina) se llevó a cabo incubando los productos por dos horas a 4° C en condiciones de luz. Posteriormente se centrifugaron los extractos durante 10 minutos a 4300 g. El pigmento fue cuantificado por LC-MS/MS, tomando 1.5 mL del sobrenadante y suponiendo que cada fotosistema funcional contiene únicamente un cromóforo de retinal.

2.7 Análisis de estructura de la comunidad microbiana mediante secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr

2.7.1 Extracción de DNA genómico

Las muestras designadas para extracción de DNA genómico (colectadas en cartuchos Sterivex™ y filtros de policarbonato de distinto tamaño de poro) fueron retirados del nitrógeno líquido y puestos a -20° C, posteriormente se acondicionaron a 4° C durante aproximadamente 10 minutos para su descongelación paulatina. Los filtros de PC se sacaron de los tubos crioviales con pinzas estériles y en el caso de los Sterivex™ fueron rotos para la obtención del filtro de acuerdo con la metodología de (Cruaud et al., 2017), en ambos casos los filtros se colocaron en un tubo de perlas (PowerWater DNA Bead Tube) para efectuar la lisis mecánica. Toda la extracción se realizó utilizando el kit “DNeasy PowerWater” de QIAGEN® y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del DNA se estimó por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®), usando como blanco la solución EB del kit de extracción. Para la verificación de la integridad del DNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 4% durante 10 minutos a 50 volts y después por 45 minutos a 80 volts con Buffer TBE, usando como referencia un marcador de peso molecular 6 Kb para visualizar y determinar el tamaño del DNA. Las imágenes se obtuvieron utilizando el programa IMAGELAB (BIO-RAD) y las muestras fueron preservadas a -20° C, hasta la preparación de las bibliotecas de secuenciación.

2.7.2 Preparación de bibliotecas

La construcción de las bibliotecas del gen 16S ARNr se realizó en las siguientes etapas:

1. Se amplificó la región V4-V5 del gen 16S del ARNr mediante PCR, utilizando los *primers* 515F-Y/926R (Parada et al., 2015). Las reacciones de PCR, se prepararon con 1, 5, 7.5 o 12.5 ng de DNA y las condiciones en el termociclador fueron las propuestas por Parada et al. (2016). Se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% durante 10 minutos a 50 volts y 35 minutos a 100 volts que permitió verificar la amplificación de la región de interés.
2. Los productos PCR se purificaron con el kit SequalPrep™ Normalization Plate (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3. Se realizó una segunda reacción de PCR, que permitió adjuntar los índices duales y adaptadores de secuencia de Illumina, los cuales permitirán asignar las secuencias o lecturas a las diferentes muestras. Se verificó dicho proceso con una electroforesis de gel de agarosa al 1% durante 10 minutos a 50 volts y 35 minutos a 100 volts. Las condiciones del termociclador fueron las sugeridas por la compañía Illumina.
4. Los productos PCR se purificaron y normalizaron sus concentraciones utilizando el kit SequalPrep™ Normalization Plate (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.
5. La cuantificación del DNA se realizó mediante un fluorómetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific) y el kit labeling detection (Thermo Fisher Scientific). Para la determinación de DNA en nM se utilizó la ecuación 2, propuesta en el manual de Illumina que considera el tamaño del amplicón.

(2)

$$\text{Concentración en nM} = ((\text{Concentración en ng}/\mu\text{L}) / (660\text{g/mol} \times \text{el tamaño del amplicón})) \times 10^6$$

6. Se realizaron cuatro *pools* diferentes, los cuales fueron estandarizados a 900 pM y mezclados, concluyendo en un *pool* final de 931.1 pM.
7. Con el fin de desnaturalizar, se mezclaron 10 μL del *pool* final y 10 μL de NaOH, 0.2 N y se mantuvo a temperatura ambiente por cinco minutos.
8. Se agregó 20 μL de Tris-HCl que contrastarrestó el NaOH 0.2 N y balanceo el pH. Este último procedimiento se repitió dos veces y permitió obtener una concentración final de DNA de 230.7 pM.
9. Finalmente, se tomaron 25.4 μL del *pool* desnaturalizado y se combinó con 724.6 μL del buffer de hibridación (HT1), obteniéndose como producto final un *pool* con todas las bibliotecas listas para el proceso de secuenciación.

2.7.3 Desnaturalización y dilución de PhiX

PhiX es una biblioteca usada como control interno hecha con el genoma del virus *PhiX*. Este genoma es pequeño y diverso, lo que permite mitigar variaciones en las bibliotecas, es decir, su función es compensar las bases nitrogenadas de las lecturas de algunas muestras que pudieran carecer de estas y ser marcadas como error en el proceso de secuenciación. Su desnaturalización y dilución se realizó utilizando el kit v2 de Illumina siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina, 2015).

2.7.4 Secuenciación

Se preparó la solución de carga con 675uL del pool final y 75uL de la solución *PhiX*. La secuenciación se llevó a cabo con estrategia pareada (*paired-end*) en el Laboratorio de Metagenómica de CICESE usando la plataforma Miseq™ de Illumina®.

2.7.5 Análisis bioinformático

Los análisis bioinformáticos fueron realizados con las paqueterías de “R Studio”, haciendo uso de la librería DADA2 que permitió observar la calidad de las lecturas, filtrar, emparejar las lecturas, remover quimeras y hacer la asignación taxonómica. Para esta última actividad, se tomó como referencia la base de datos Silva 138 (actualización de procariontes 2020). También se utilizó la librería Phyloseq para unir los ASVs (Amplicon Sequence Variant, por sus siglas en inglés) resultantes de la asignación taxonómica de acuerdo con las muestras y así crear los gráficos de diversidad y taxonomía microbiana.

Capítulo 3. Resultados

El experimento de mesocosmos y el monitoreo se llevó a cabo, como se mencionó en los métodos, durante 30 días. Sin embargo, debido a que la variabilidad entre las réplicas de cada día aumentaron al final del experimento, se describen los resultados de los primeros 20 días.

3.1 Monitoreo

Con el objetivo de observar el desarrollo del florecimiento algal inducido mediante la adición de nutrientes inorgánicos durante el transcurso del experimento, se analizaron las concentraciones de clorofila-*a* total (mediante filtros GFF) cada 48 horas en los tratamientos con adición de nutrientes y en los controles. El propósito de medir las concentraciones de clorofila-*a* usando un método clásico de fluorescencia en el monitoreo fue verificar en tiempo real el cumplimiento del primer objetivo propuesto: observar el aumento de la concentración de clorofila-*a* como consecuencia del crecimiento fitoplanctónico, debido al aumento de la disponibilidad de nutrientes. Posteriormente, una vez terminado el experimento, se analizaron las concentraciones de clorofila-*a* y proteorodopsina de muestras colectadas durante los mismos días, pero a través de distintos tamaños de filtro de tamaño nominal (0.2 μm , 3 μm y 10 μm) para poder determinar las concentraciones de pigmento en distintos miembros de la comunidad planctónica presentes en las incubaciones (descrito en sección 3.2). Durante este monitoreo inicial utilizando filtros GFF, se observó un incremento de la concentración de clorofila-*a* solamente en los tratamientos con nutrientes. La clorofila-*a* presentó un incremento exponencial los primeros ocho días, entre los días 8 y 14 se obtuvieron las concentraciones más altas, presentándose el máximo a los 12 días. En el día 16 la concentración de clorofila-*a* disminuyó y se observó un pequeño aumento en el día 18, y seguidamente volvió a descender (figura 9). Por el contrario, en las botellas control se observaron concentraciones constantes y similares a las iniciales de clorofila-*a* a lo largo del tiempo (<100 pM). En ambos casos las concentraciones de clorofila no se relacionaron con la irradiancia dentro de los tanques (figura 9).

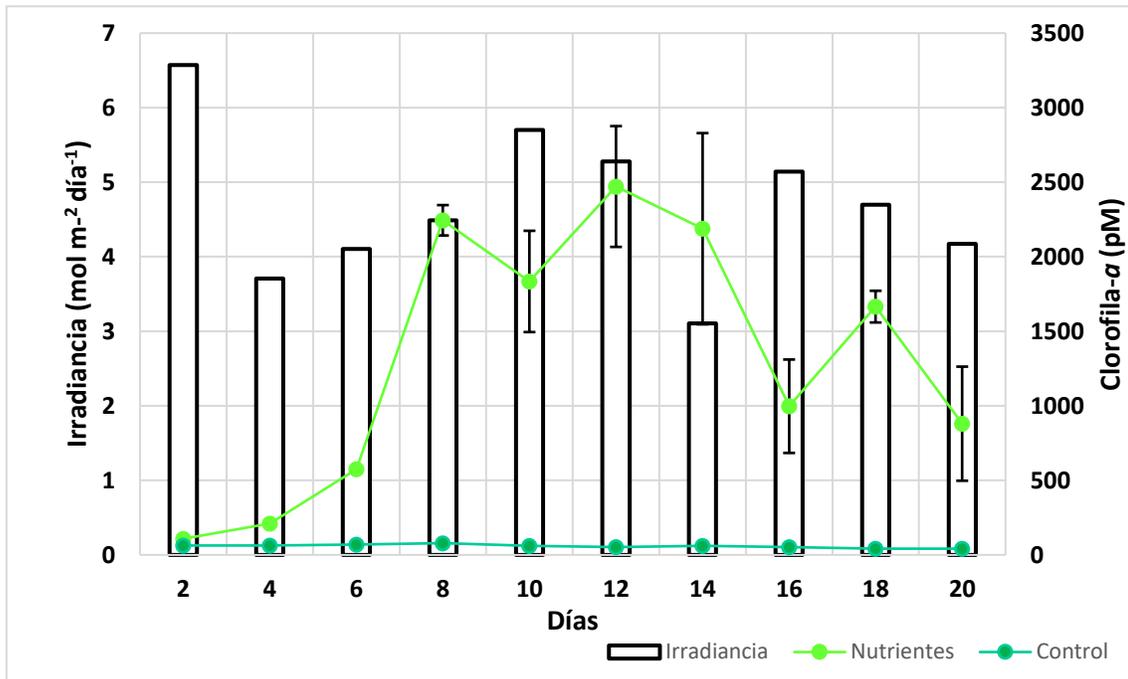


Figura 9. Concentración de clorofila-*a* durante el monitoreo de experimento de mesocosmos (líneas verdes). Irradiación diaria incidente en los tanques de incubación (barras blancas). Las barras de error indican el error estándar entre duplicados.

3.2 Variación temporal de pigmentos

3.2.1 Clorofila-*a*

La clorofila-*a* total calculada como la suma de las distintas fracciones analizadas en los filtros nominales mostró una dinámica similar a la observada durante los monitoreos con filtros GF/F (figura 10). Sin embargo, las muestras de clorofila-*a* total tomadas con los filtros GFF fueron ligeramente menores a las analizadas en filtros de tamaño nominal. Esta discrepancia puede ser atribuida a la naturaleza de los distintos filtros utilizados. Los filtros GFF no tienen un tamaño de poro específico, sino un rango de tamaños de filtración que puede variar entre 0.7 y 1 μm , mientras que los filtros de tamaño nominal proporcionan filtraciones de partículas de tamaños más precisos. En cuanto a su distribución en distintos tamaños microbianos (figura 11), las mayores concentraciones de clorofila-*a* se observaron inicialmente en la fracción de 0.2-3 μm (día 0-8), mientras que después del día 12, la fracción dominante fue la de mayor tamaño (>10 μm). El único tiempo en que la concentración de clorofila de fracción de 3-10 μm superó a las otras dos fracciones fue en el día 10.

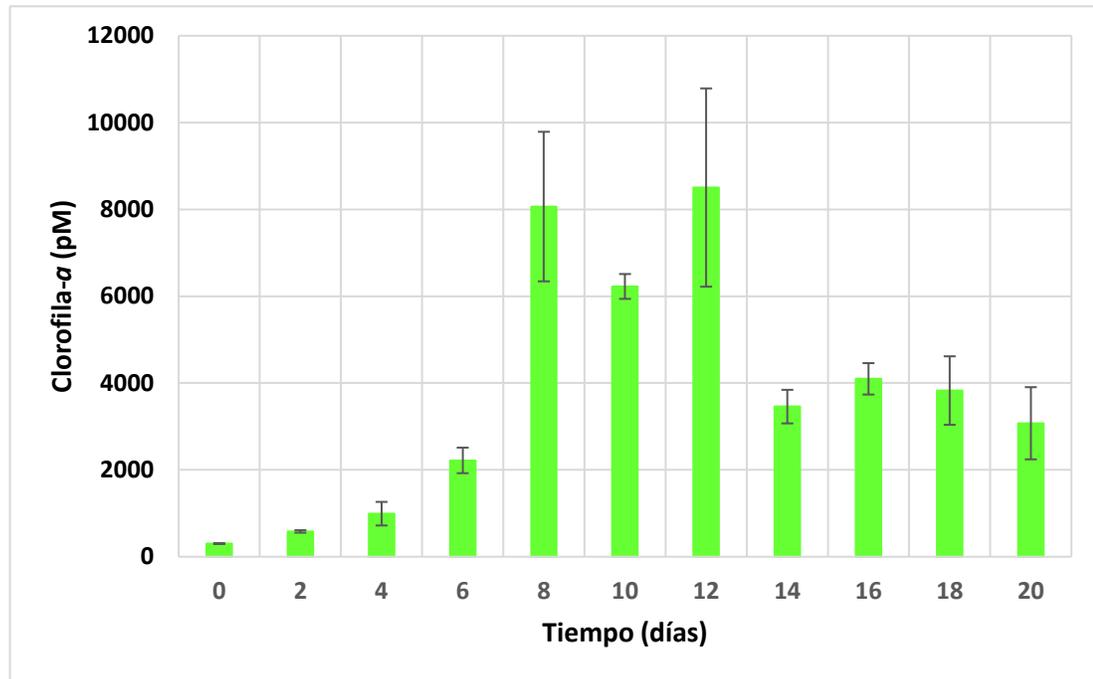


Figura 10. Variación de la concentración de clorofila-*a* total través del tiempo. El valor de clorofila-*a* total en esta figura se calculó mediante la suma de las tres fracciones microbianas. Las barras de error muestran el error estándar entre duplicados.

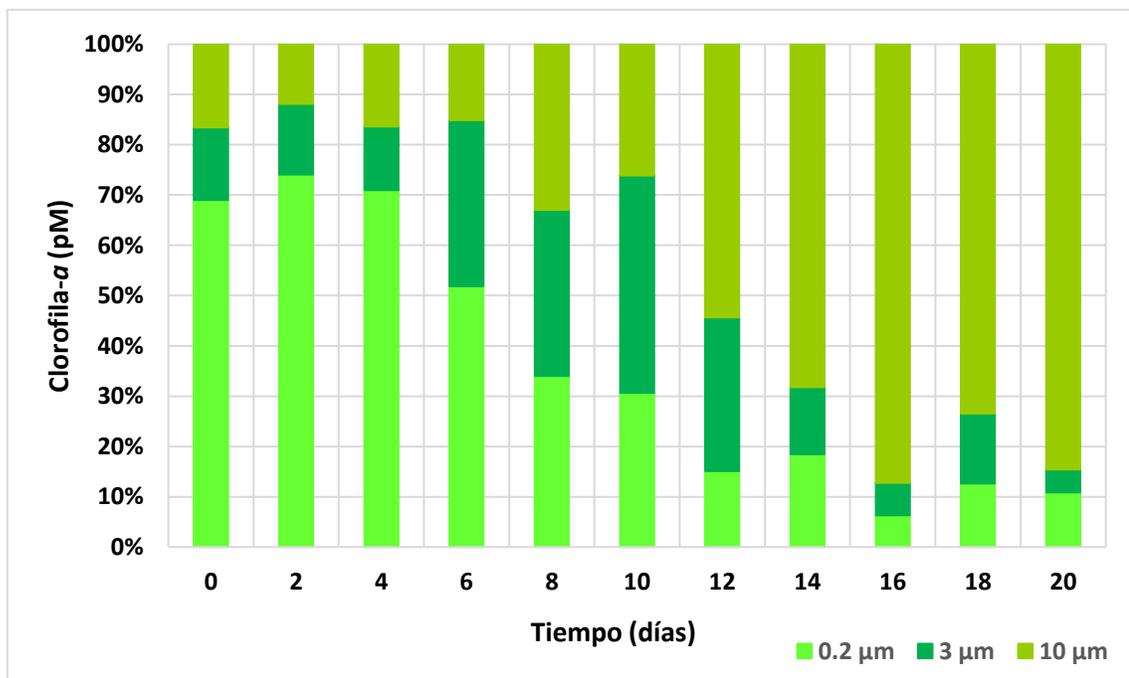


Figura 11. Variación de la concentración de clorofila-*a* total a través del tiempo, analizada en filtros con tamaño de poro de 0.2 μm, 3 μm y 10 μm.

3.2.2 Proteorodopsina

La concentración de proteorodopsina total (retinal), se obtuvo sumando las concentraciones de dicho pigmento de los tres diferentes tamaños de filtro (0.2 μm , 3 μm y 10 μm) tomada cada 48 horas. Las menores concentraciones de proteorodopsina se detectaron en el inicio del experimento (días 0-6), donde se detectó un descenso en las concentraciones durante los primeros seis días (40 pM en tiempo 0, hasta 20 pM a los 6 días; figura 12). Entre los días 8 y 12, se observó un ligero incremento en los niveles totales de proteorodopsina (58-76 pM). Entre los días 14 y 20 se observaron las mayores concentraciones de proteorodopsina del experimento (150-420 pM), el punto máximo se observó a los 14 días (150 pM) (figura 12).

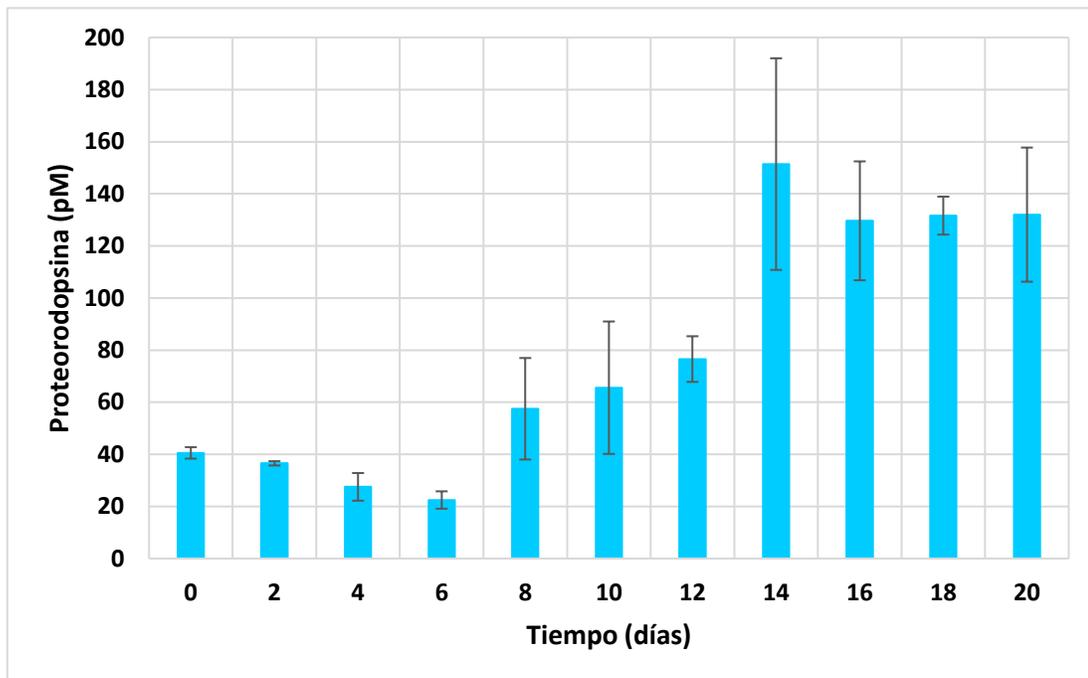


Figura 12. Variación de la concentración de proteorodopsina total (retinal) través del tiempo. El valor de proteorodopsina total en esta figura se calculó mediante la suma de las tres fracciones microbianas. Las barras de error muestran el error estándar entre duplicados.

Como se mencionó en la metodología, el objetivo de filtrar en línea en diferentes tamaños de poro fue el de separar los distintos tipos de microorganismos. Así, la figura 13 muestra los cambios en la concentración de proteorodopsina a través del tiempo en los organismos o partículas de tamaño mayores a 10 μm , organismos entre 10 μm y a 3 μm , y organismos entre 3 μm y 0.2 μm . La fracción de 0.2 μm presentó las concentraciones más altas de los tres diferentes tamaños en aproximadamente el 50% de las muestras

analizados. Durante el comienzo de la incubación (días 0-10) la fracción dominante fue la del picoplancton (0.2-3 μm) con más del 60% de la señal de proteorodopsina detectada. Sin embargo, en el día 12, las fracciones de 0.2 y 10 μm presentaron ambas un 40% de la señal de proteorodopsina. En contraste, entre los días 16 y 20, la fracción microbiana de mayor tamaño (>10 μm) pasó a ser la dominante con 60% de la señal de proteorodopsina. Cabe resaltar que se observaron bajas concentraciones de proteorodopsina durante todo el experimento en organismos entre 3 y 10 μm ($\leq 20\%$).

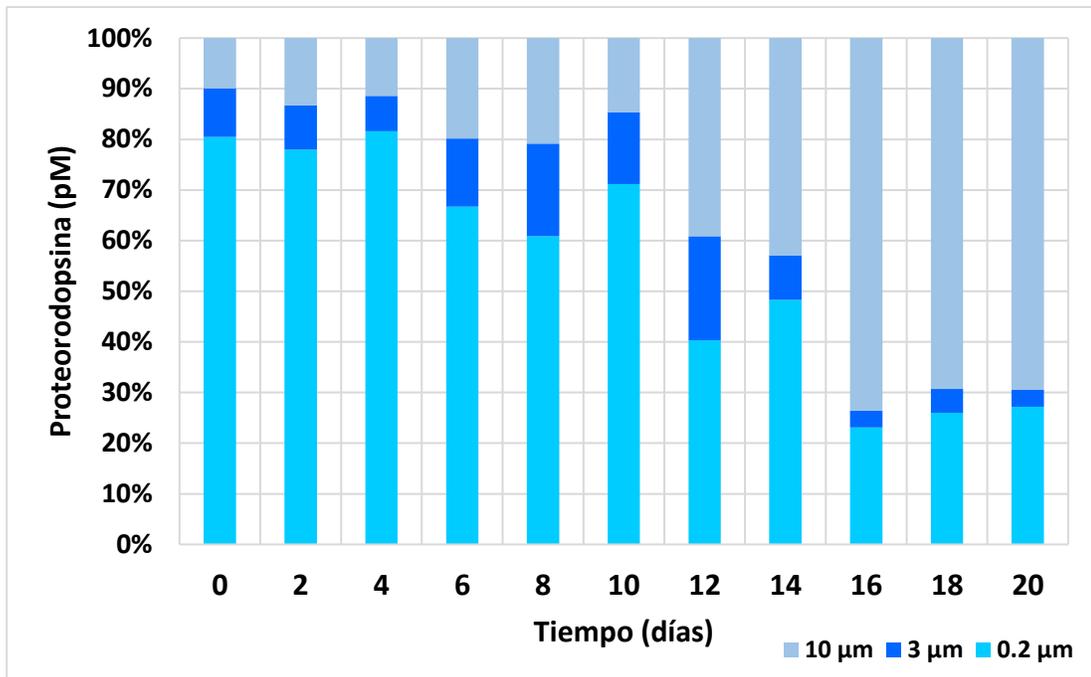


Figura 13. Variación de la concentración de proteorodopsina (retinal) a través del tiempo, analizada en filtros con tamaño de poro de 0.2 μm , 3 μm y 10 μm .

3.2.3 Comparación de patrones de variación temporal de clorofila-*a* y proteorodopsina

Si tratamos de comparar los patrones de variabilidad temporal de proteorodopsina y clorofila-*a* observamos que sus cambios en el tiempo tienden a ser opuestas en varias fases del experimento (figura 14). Entre los días 0 y 6, la concentración de clorofila-*a* aumenta mientras que la proteorodopsina disminuye. Durante los días en que la concentración de clorofila-*a* alcanza su máximo (días 8 a 12) las concentraciones de proteorodopsina empiezan a aumentar significativamente. Posterior a esto, entre los días 14 y 20, los niveles de clorofila-*a* disminuyen mientras que en los de proteorodopsina se detectan los niveles más altos (>3x a la inicial, y >2x que durante el máximo de clorofila-*a*) (figura 14). Ahora bien, la relación entre clorofila-*a* y proteorodopsina observada gráficamente no pudo ser demostrada estadísticamente, debido al escaso número de datos dentro de cada periodo definida arriba, por tal razón

se realizó un análisis de clúster utilizando el método *K-means* considerando distancia euclidiana. Este primer análisis sugirió la agrupación de clorofila-*a* y proteorodopsina en tres grupos: de cero a seis días, de ocho a doce días y de catorce a veinte días; igual a la mencionada en este apartado. Se realizó un segundo análisis de clúster utilizando un método más robusto, método *k-medoids* (figura 15), el cual verificó que ambos pigmentos se agruparon en los tres grupos mencionados, para este último análisis se hizo uso de la distancia euclidiana y se tomó de referencia el número de clústeres estimados con tres diferentes métodos: *Elbow*, *Average silhouette* y *GAP* (figuras 31-33).

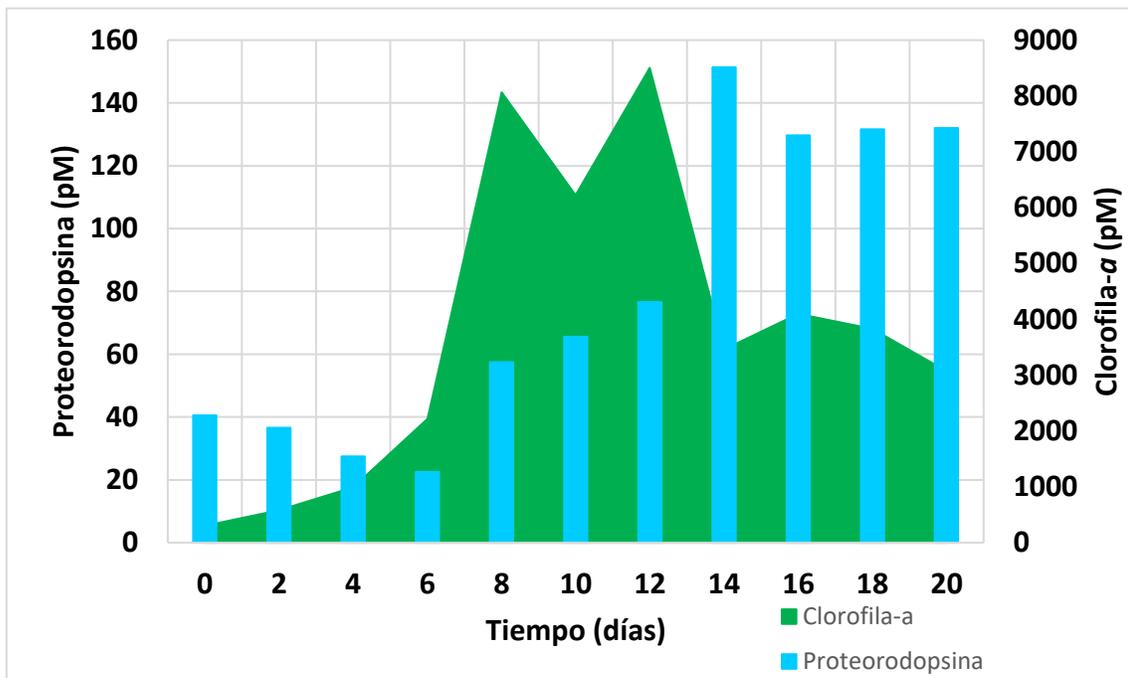


Figura 14. Patrones de variación temporal: clorofila-*a* vs proteorodopsina.

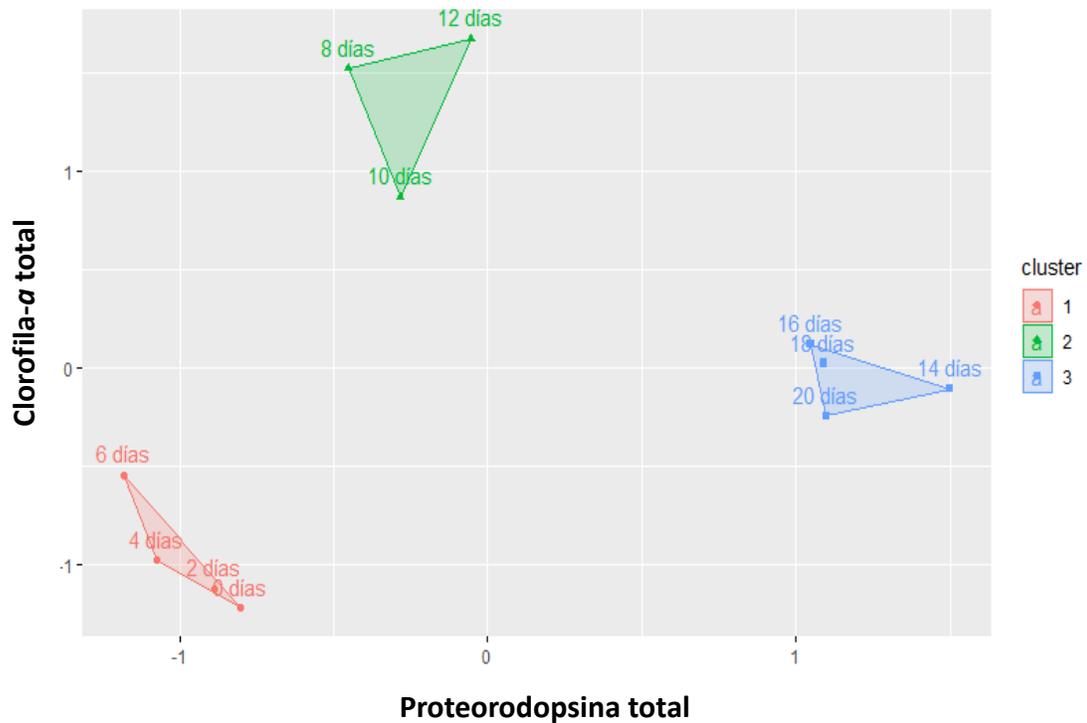


Figura 15. Análisis de clústeres con método k-medoids: formación de tres grupos de acuerdo con las concentraciones de clorofila-a y proteorodopsina estimadas a través del tiempo.

3.3 Abundancia bacteriana

La abundancia bacteriana fue obtenida mediante dos métodos, microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo. Para el método de microscopía de epifluorescencia, las muestras de los primeros seis días no se colectaron por motivos logísticos. La figura 16 muestra la cuantificación de las células bacterianas por los dos métodos de cada día para cada una de las botellas. Se observó discrepancia entre las dos técnicas a partir de los 14 días desde el inicio del experimento (muestras R15-R16), por lo que se realizó una prueba estadística t-student obteniendo un valor “p” menor a 0.05, demostrando que existe diferencia en la cuantificación de las células·mL⁻¹ entre ambos métodos. Tal diferencia pudo ser consecuencia de una subestimación por parte del observador con el método de microscopía de epifluorescencia.

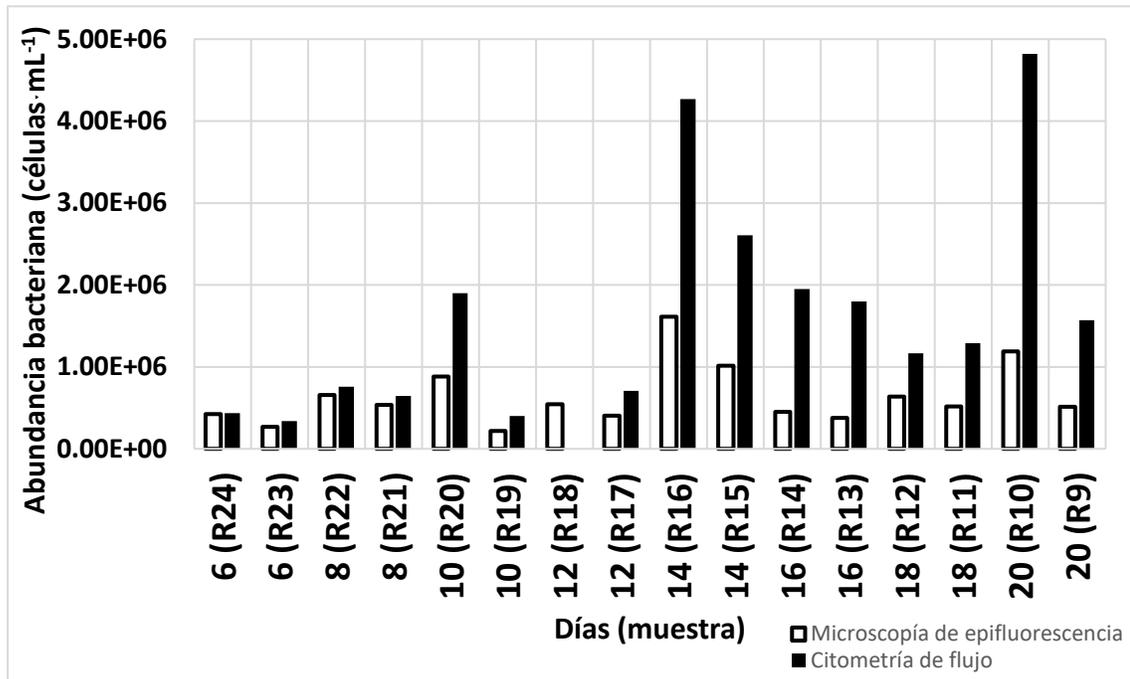


Figura 16. Abundancia bacteriana mediante dos métodos. Barras blancas: microscopía de epifluorescencia y barras negras: citometría de flujo.

La abundancia bacteriana cuantificada con citometría de flujo nos ofrece una mejor resolución en los valores de células bacterianas. Entre los 2 y 10 días se observó que los valores de células·mL⁻¹ se mantuvieron sin cambio significativo. En el día 14 el número de células·mL⁻¹ aumentaron significativamente, siendo este el máximo. En el día 16 y 18 disminuyeron las células·mL⁻¹ y en el día 20 aumentó nuevamente la abundancia bacteriana (figura 17). Se observó un patrón entre las células bacterianas y la concentración de proteorodopsina de los filtros con tamaño de poro de 0.2 μm (figura 17), por lo cual se realizó una prueba de regresión lineal, donde se observó que la muestra R10-20 días se comportó como un *outlier*, tal muestra se eliminó de un segundo análisis de regresión lineal que presentó un valor “p” menor a 0.05, mostrando una correlación significativa entre ambos parámetros (figura 18).

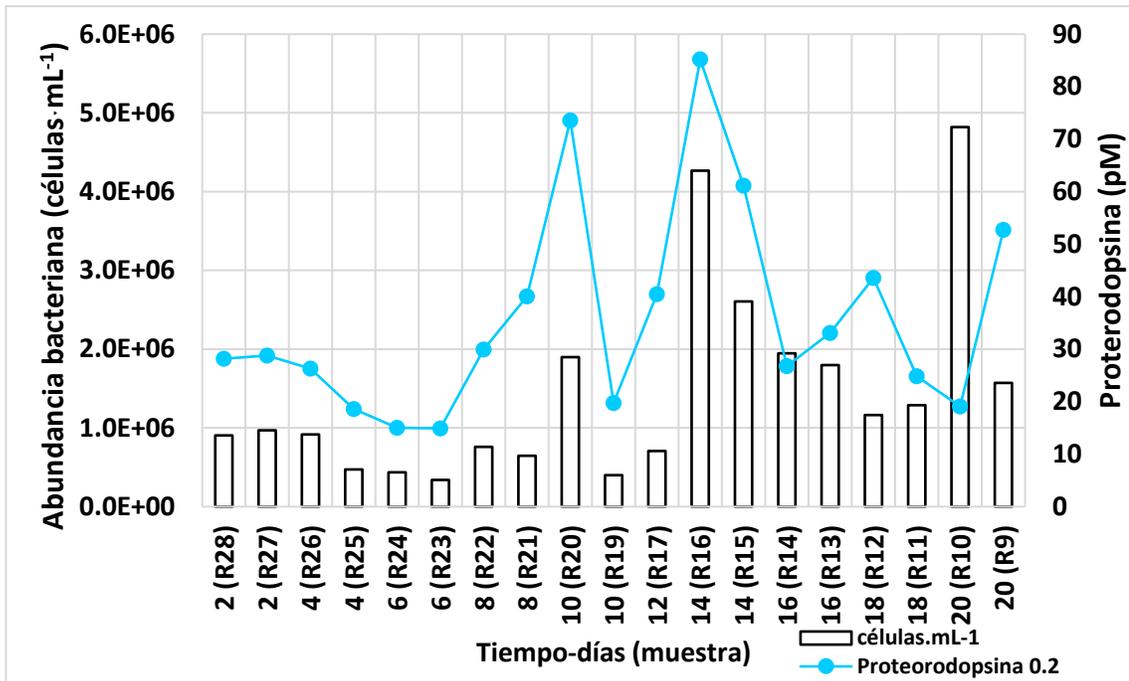


Figura 17. Abundancia bacteriana cuantificada mediante citometría de flujo, durante experimento de mesocosmos. Barras blancas: células·mL⁻¹. Línea azul: concentración de proteorodopsina en filtros de tamaño de poro de 0.2 µm.

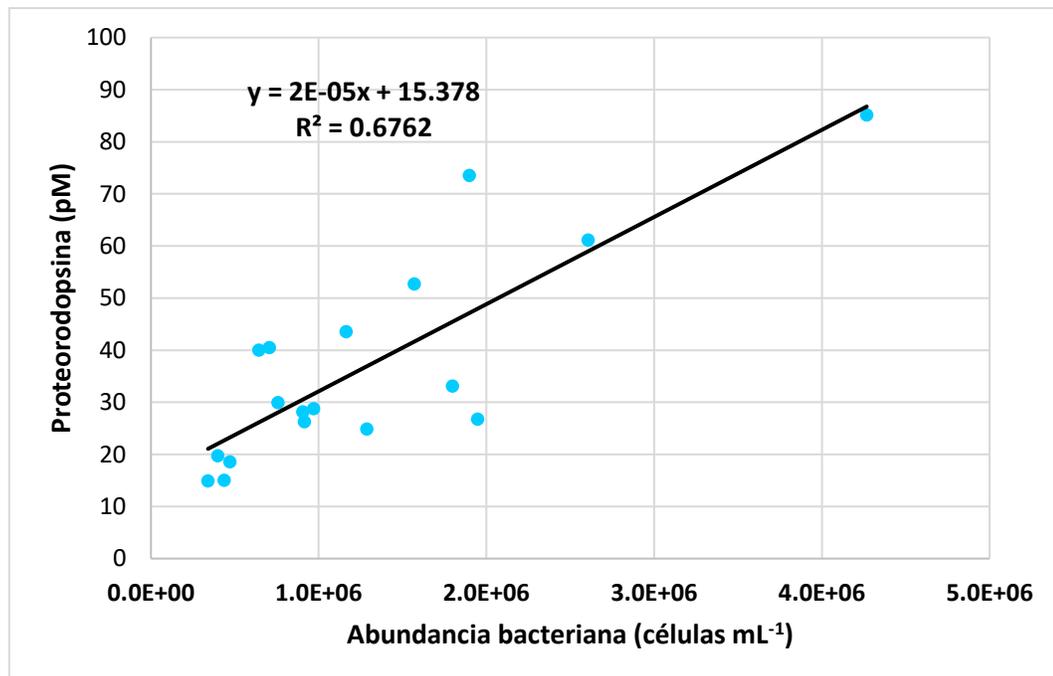


Figura 18. Modelo de regresión lineal entre abundancia bacteriana estimada con citometría de flujo y la concentración de proteorodopsina en filtros de tamaño de poro de 0.2 µm.

3.4 Secuenciación de Amplicones del gen 16S ARNr

Aunque se lograron amplificar todas las muestras, la secuenciación de los amplicones 16S ARNr presentó una baja eficiencia, ya que de las 25 000 000 secuencias *paired-end* esperadas, únicamente se obtuvieron 5 106 190 secuencias *paired-end*. De acuerdo con el protocolo de secuenciación de amplicones 16S ARNr de Illumina, el total de estas lecturas resultantes debieron ser identificadas y asignadas a algunas de las muestras mediante los *índices* añadidos. Sin embargo, solo el 40% se lograron asignar, es decir, se trabajó finalmente la parte bioinformática con aproximadamente 1 000 000 de lecturas *paired-end* (tabla 1). El problema pudo haberse derivado durante la química de la segunda reacción de PCR, donde los *índices* inversos no se indexaron con éxito, inhibiendo la identificación del código de cada muestra durante la secuenciación (Bradley et al., 2016). Aun así, se trabajó con las secuencias obtenidas, debido a que cumplieron los criterios de calidad con un Quality Score superior a 30 (buena calidad) y se limpiaron de quimeras. Además, para determinar si el número de secuencias (profundidad de secuenciación) fue suficiente para estimar los diferentes taxones microbianos en el experimento, se realizaron curvas de rarefacción para las lecturas de los tres diferentes tamaños de filtro: en el eje X se observa el número de lecturas de cada muestra y en el eje Y la riqueza de especies esperadas. A medida que se obtienen más lecturas por muestra se llega al límite de especies estimadas, en otras palabras, cuando la línea de cada muestra llega a la asíntota indica que ese valor de lecturas obtenidas es suficiente para encontrar todos los taxones en esa muestra (figuras 19-21).

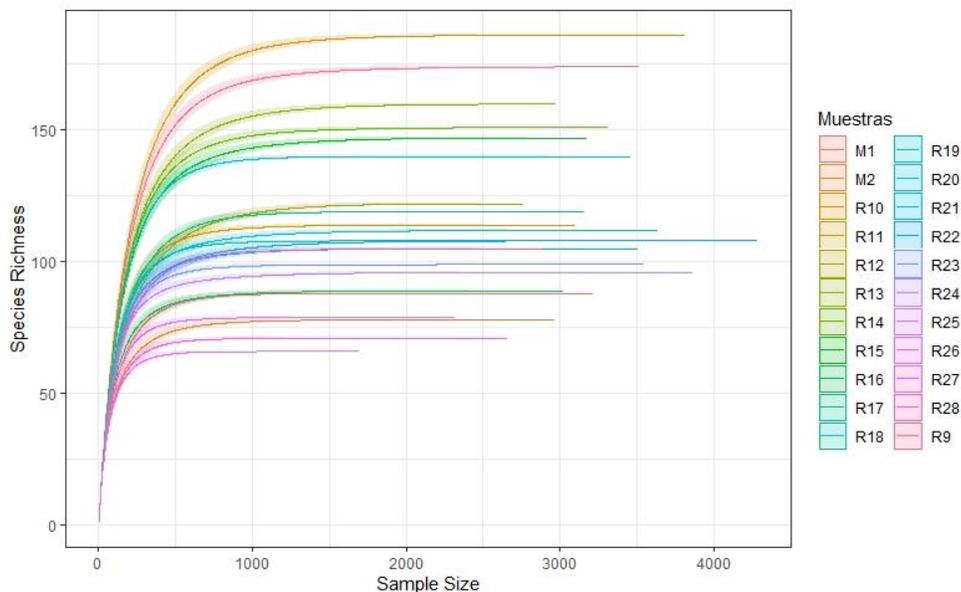


Figura 19. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 0.2 µm.

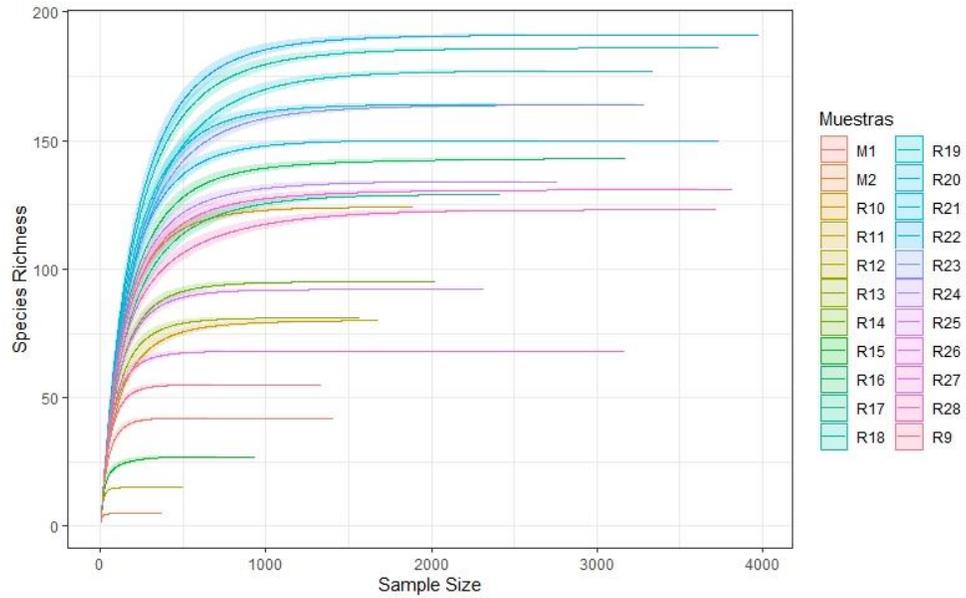


Figura 20. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 3 µm.

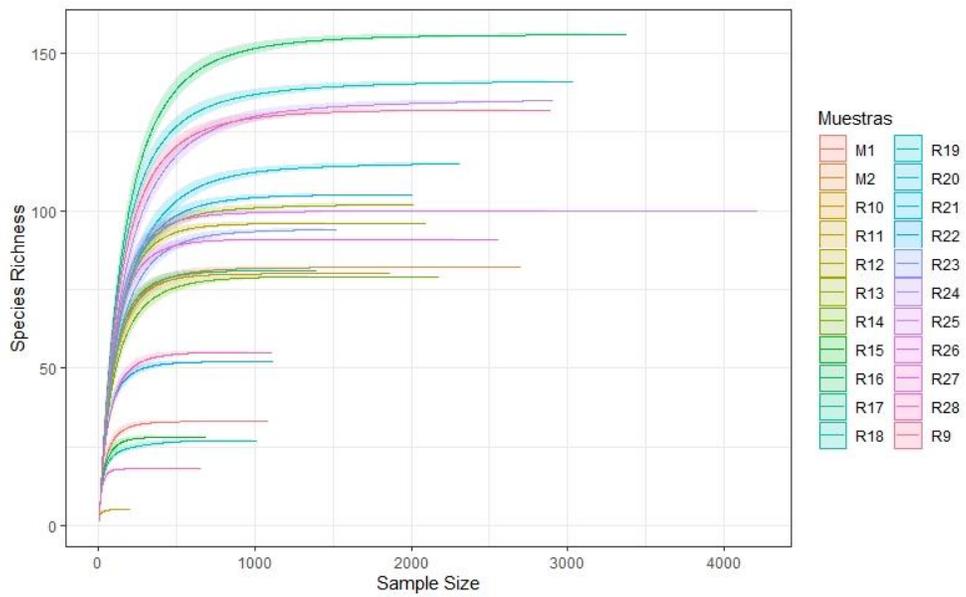


Figura 21. Curva de rarefacción de secuencias obtenidas en muestras de filtros con tamaño de poro de 10 µm.

3.4.1 Descripción de la comunidad microbiana

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se realizaron únicamente análisis de diversidad alfa utilizando el índice de Shannon Weaver, donde se contempla el número de especies presentes en las muestras (riqueza), la abundancia relativa de cada especie (uniformidad) y la profundidad de la secuenciación no es tomada como criterio.

Se observó que en las muestras de los filtros con tamaño de poro de 0.2 μm , los primeros cuatro días se obtuvieron valores menores a 4 y conforme pasaron los días, la diversidad aumentó hasta llegar a valores de cercanos a 5 en los últimos días. Esto puede ser consecuencia de la alta disponibilidad de nutrientes y la competencia generada por la limitación de recursos al final del experimento (figura 22). En las muestras de los filtros con tamaño de poro de 3 μm durante el tiempo cero, se observaron valores menores a 4, sin embargo, los valores de diversidad se mantuvieron entre 4-5 en todos los demás días, dicho de otra forma, los cambios de diversidad no fueron significativos a través del tiempo (figura 23). En los filtros con tamaño de poro de 10 μm , con excepción de los primeros dos días donde los valores fueron menores a 4, se observó un comportamiento homogéneo en la diversidad (figura 24). En general se observó que no existe diferencia sistemática entre la mayoría de las muestras (figuras 22, 23 y 24).

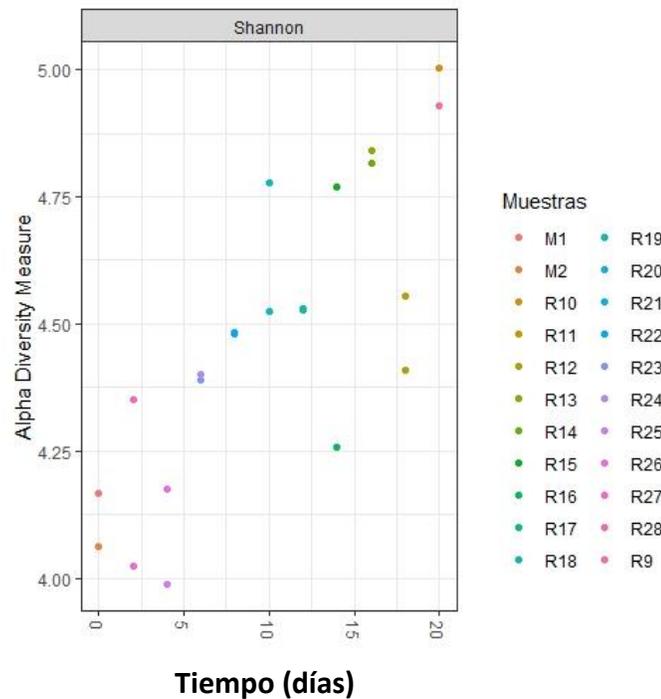


Figura 22. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 0.2 μm : índice de Shannon-Weaver.

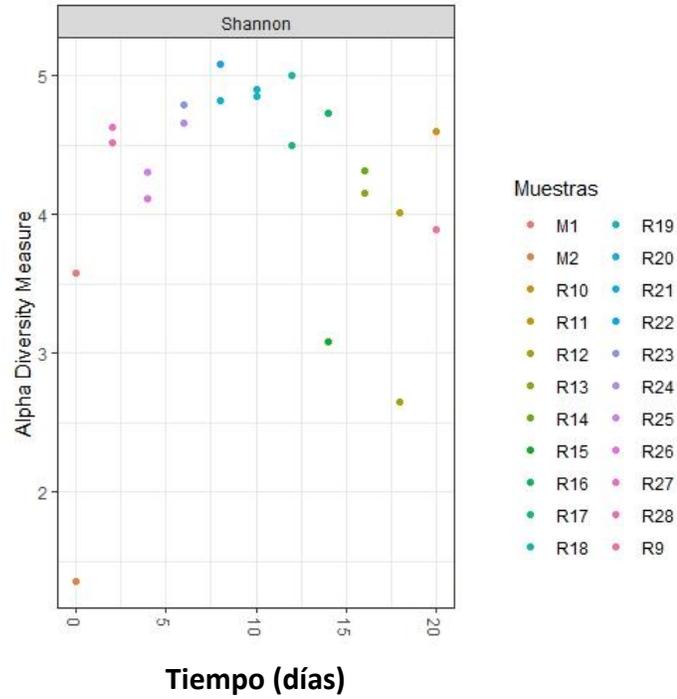


Figura 23. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 3 µm: índice de Shannon-Weaver.

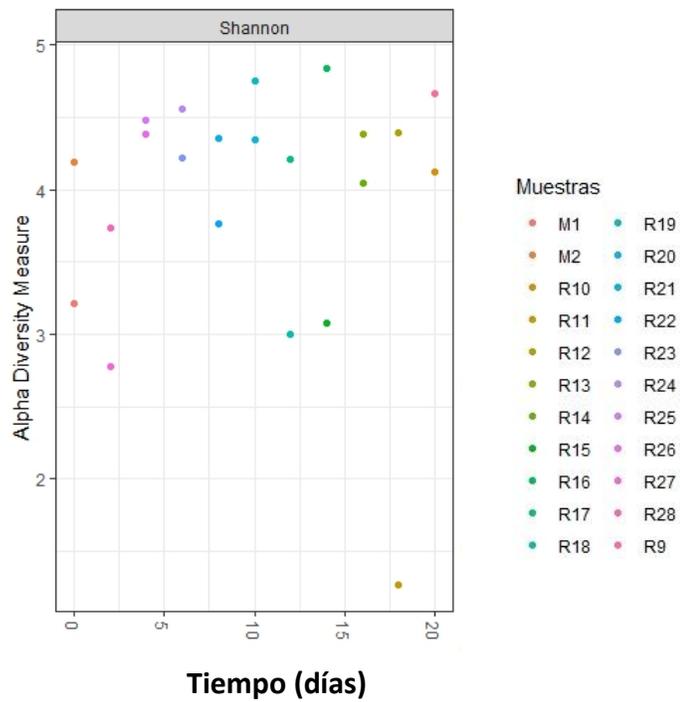


Figura 24. Alfa diversidad en filtros de tamaño de poro de 10 µm: índice de Shannon-Weaver.

3.4.2 Estructura de las comunidades microbianas

Se observó la composición y abundancia de las comunidades bacterianas a un nivel taxonómico de orden y las muestras fueron separadas por el tamaño de poro (0.2 μm , 3 μm y 10 μm).

Comunidades microbianas en filtro con tamaño de poro de 0.2 μm

Durante los primeros cuatro días de incubación, el orden Flavobacteriales presentó una abundancia entre el 16 y 20 %, en el día seis comenzó a incrementar su proporción (50%), de este día hasta el día 14, se observaron las abundancias relativas más altas de este orden y de toda la incubación, coincidiendo con los máximos de clorofila-*a* en los días 8, 12 y 14. Aunque después del día 16, los Flavobacteriales disminuyeron en proporción, continuaron siendo uno de los grupos con mayor presencia hasta el final del experimento (>15%). Los órdenes Chitinophagales y Sphingobacteriales (Bacteroidetes), se identificaron en mayores proporciones a partir de los 10 días, y su presencia perduró hasta el final del experimento (20 días). En el caso de los Chitinophagales, las concentraciones a partir del día 10 permanecieron entre el 4 y el 16% mientras que las Sphingobacteriales se mantuvieron entre el 1 y el 9%. Del filo de las Proteobacterias, la clase Alphaproteobacteria fue la más abundante, específicamente el orden Rhodobacterales, si bien, los primeros días tuvo una abundancia menor al 4%, después de los seis días fueron aumentando su abundancia, se observaron lecturas mayores al 25% después de los 14 días. Los primeros cuatro días de experimento, el clado SAR11 presentó las mayores abundancias en comparación con el resto de los grupos, sin embargo, después de los seis días su abundancia disminuyó significativamente, siendo menor al 10% (figura 25).

Dentro de la clase Gammaproteobacteria, el orden Alteromonadales fue identificado a los dos días de la incubación e incrementó su porcentaje de presencia a los cuatro días (30%), a pesar de ello, su proporción disminuyó en el resto del mesocosmos. SAR86 y Cellvibrionales no mostraron ningún cambio en sus lecturas y se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo (figura 25).

Por último, el orden Synechococcales, perteneciente al picoplancton autótrofo, estuvo presente solamente hasta el día 14, periodo en el que se observaron las mayores concentraciones de clorofila-*a*. La abundancia de este grupo se pudo observar también mediante citometría de flujo mostrando su presencia solo hasta el día 14 (figura 26).

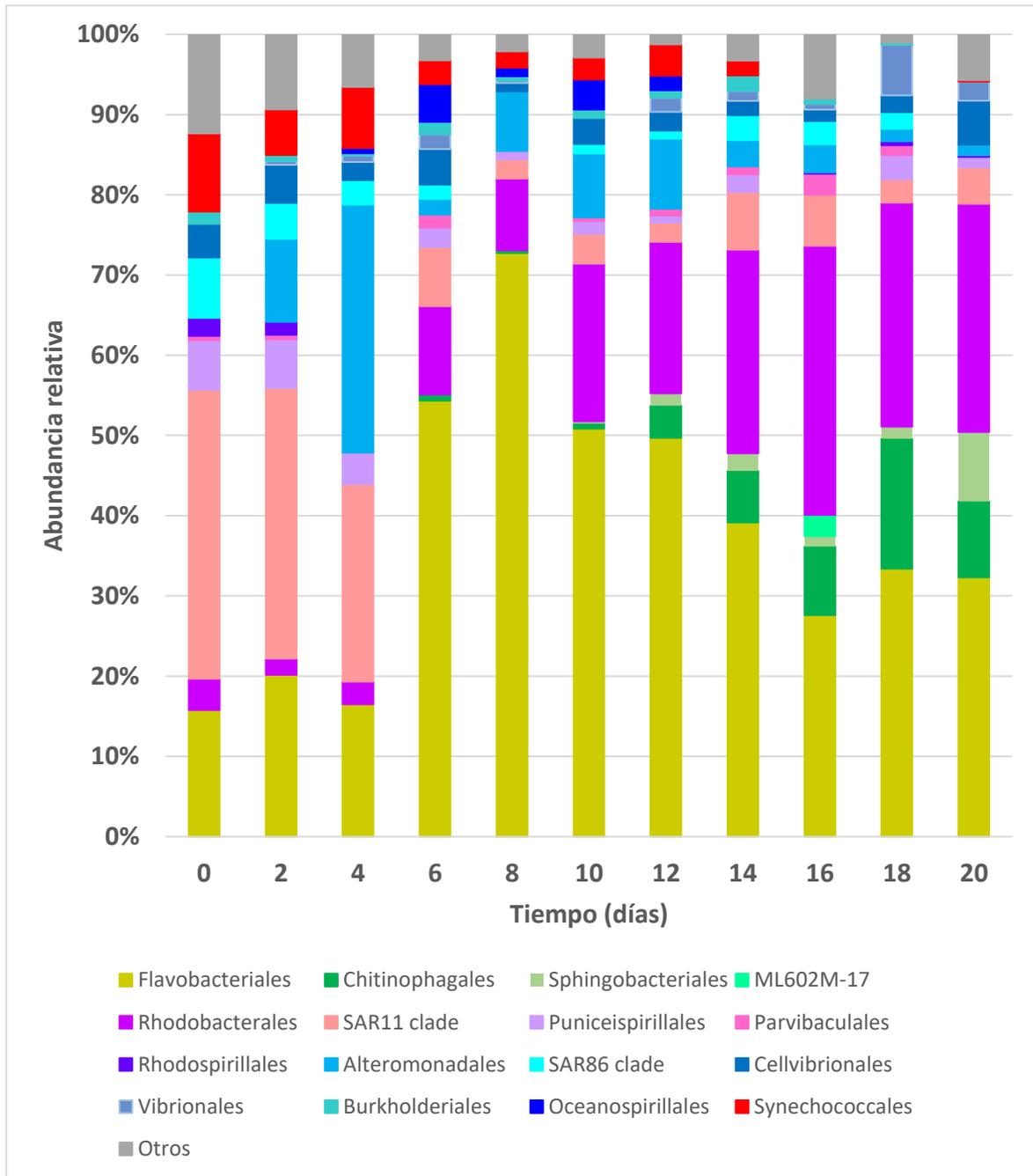


Figura 25. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de tamaño de poro de 0.2 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.

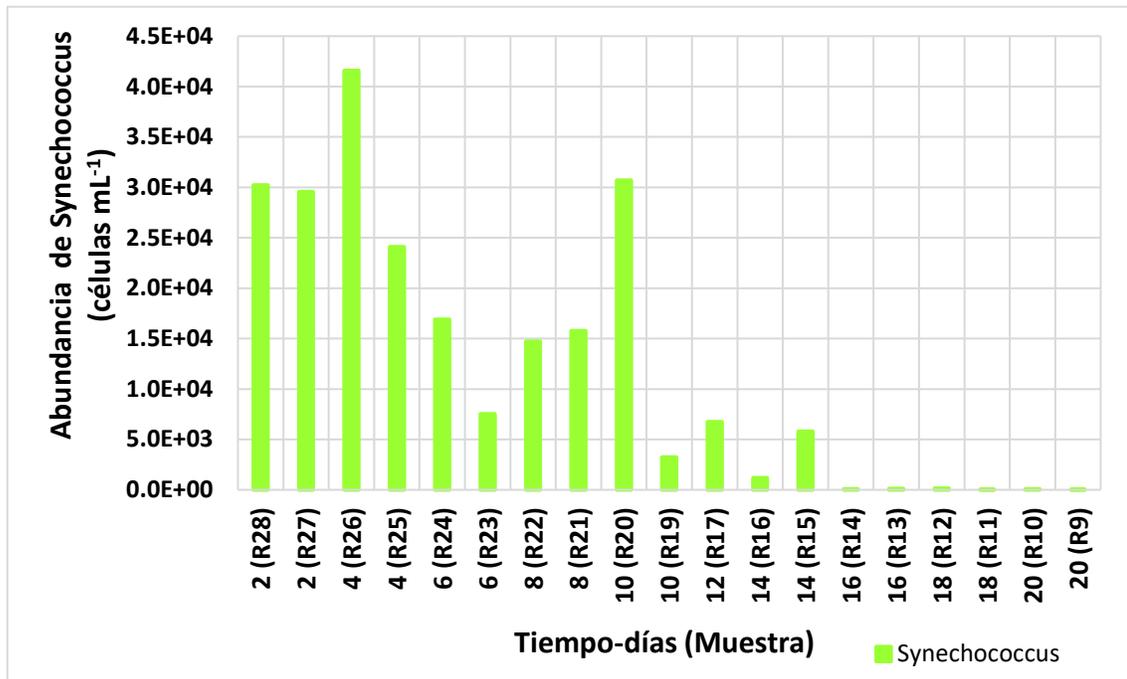


Figura 26. Abundancia de Synechococcus cuantificada mediante citometría de flujo en experimento de mesocosmos.

Comunidades microbianas en filtro con tamaño de poro de 3 μm

El orden Flavobacteriales fue el más abundante en comparación con otros órdenes a excepción del día cuatro, donde el orden Alteromonadales presentó un porcentaje del 60%, este último orden redujo significativamente sus abundancias durante el resto del experimento (<14%). El orden Chitinophagales estuvo presente durante toda la incubación, y se observaron sus mayores abundancias entre los 14 y 20 días (>25%) (figura 27).

Las altas lecturas del orden Rhodobacterales se identificaron a partir del día 6 hasta el fin de la incubación. El clado SAR11 se identificó desde el día de la implementación del experimento hasta el octavo día, se observó que cuando incrementa la clorofila-*a*, las abundancias de este orden se reducen, a partir del día 10 no se volvió a detectar (figura 27).

El grupo de los Synechococcales fue observado los primeros doce días con abundancias entre 1 y 10%. En este mismo periodo el orden Verrucomicrobiales se presentó con abundancias del 1 al 13% (figura 27).

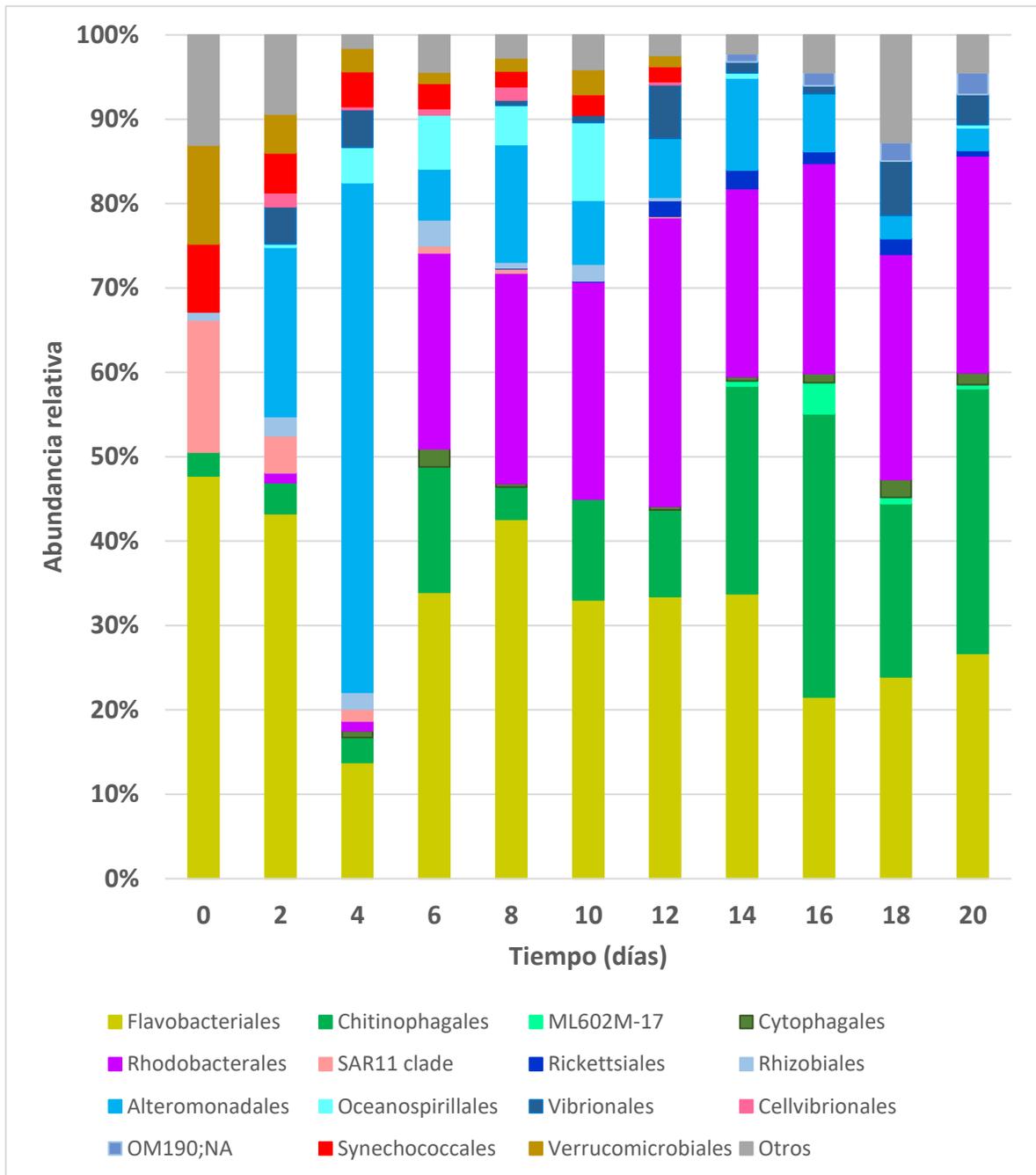


Figura 27. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de 3 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.

Comunidades microbianas en filtro con tamaño de poro de 10 μm

La mayor abundancia del orden Flavobacteriales se observó al comienzo del mesocosmos, contrario a los otros dos filtros anteriores donde los porcentajes de abundancia fueron menores durante los primeros días, este orden fue de los más abundantes en todo el experimento. Los Chitinophagales tuvieron abundancias entre 2 y 7% los primeros cuatro días, no obstante, incrementaron sus abundancias hasta ser el día 18 el orden más abundante (40%). Las altas abundancias del orden Rhodobacterales fueron observadas entre los seis días y el fin de la incubación (>10%). Cabe destacar que en las muestras de este tamaño del filtro no fue identificado el clado SAR11 (figura 28).

De la misma forma que en los filtros de 0.2 y 3 μm , el orden Alteromonadales fue el más abundante a los dos y cuatro días del experimento (52 y 63% respectivamente), sin embargo, durante los siguientes días su abundancia disminuyó (<17%). El orden Synechococcales se presentó sólo los primeros doce días, comportándose como en los filtros anteriores (abundancias entre 2 y 7%). Por último, el orden Verrucomicrobiales estuvo presente desde el día de implementación del experimento hasta el décimo día, con abundancias entre el 1 y 12% (figura 28).

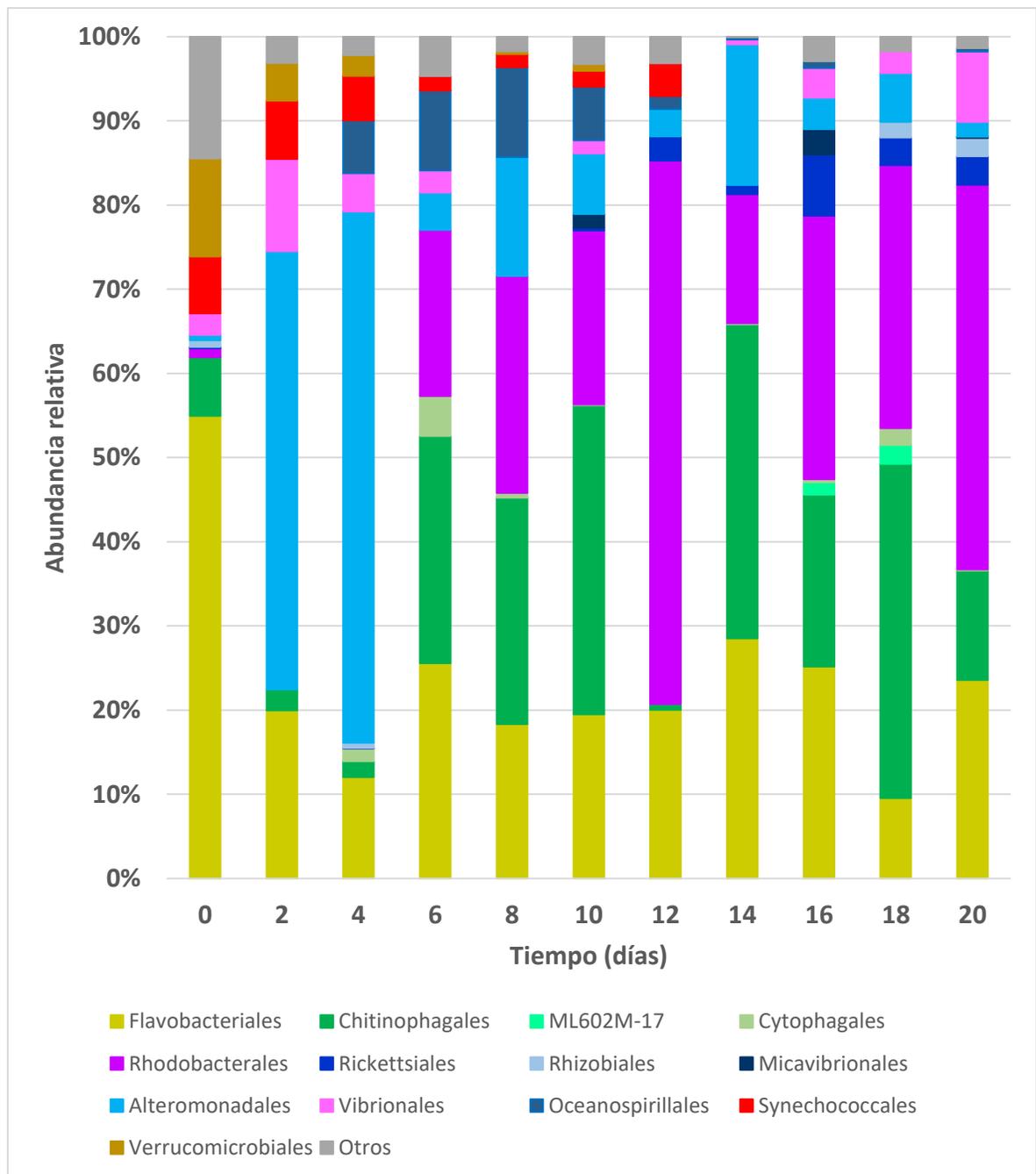


Figura 28. Composición y abundancias relativas de las comunidades microbianas en los filtros de tamaño de poro de 10 µm presentes durante el experimento de mesocosmos.

3.5 Relación entre clorofila- α , proteorodopsina, abundancia bacteriana y abundancia de células de los órdenes bacterianos

Al ser el orden Flavobacteriales el más abundante durante toda la incubación en el filtro de 0.2 μm , y considerando que bacterias de este grupo poseen fotosistemas de proteorodopsina, se realizó un análisis de regresión lineal entre su abundancia evaluado con citometría de flujo y la concentración de proteorodopsinas en los filtros de 0.2 μm . La figura 29 muestra que el 72% de los datos se pueden explicar mediante un modelo de regresión lineal, en el cual el aumento de células de Flavobacteriales está relacionado con el aumento de la concentración de proteorodopsina.

Ahora bien, considerando las células dentro de cada orden bacteriano, se realizaron análisis de correlación de Pearson, lo que permitió observar si existía correlación entre cada orden y las concentraciones de proteorodopsina, clorofila- α y la abundancia bacteriana (tablas 2-4), aquellos parámetros con correlaciones significativas (valores "p" menores a 0.05) fueron graficados en la figura 30. Así, la concentración de proteorodopsina está correlacionada de forma positiva con las células de Flavobacterias, Chitinophagales, Sphingobacteriales, Rhodobacterales, Clado SAR86, Cellvibrionales y las células totales (abundancia bacteriana). La clorofila- α está correlacionada de forma negativa con las células del Clado SAR11. La abundancia bacteriana está correlacionada positivamente con los órdenes: Flavobacteriales, Chitinophagales, Sphingobacteriales, Rhodobacterales y Clado SAR86.

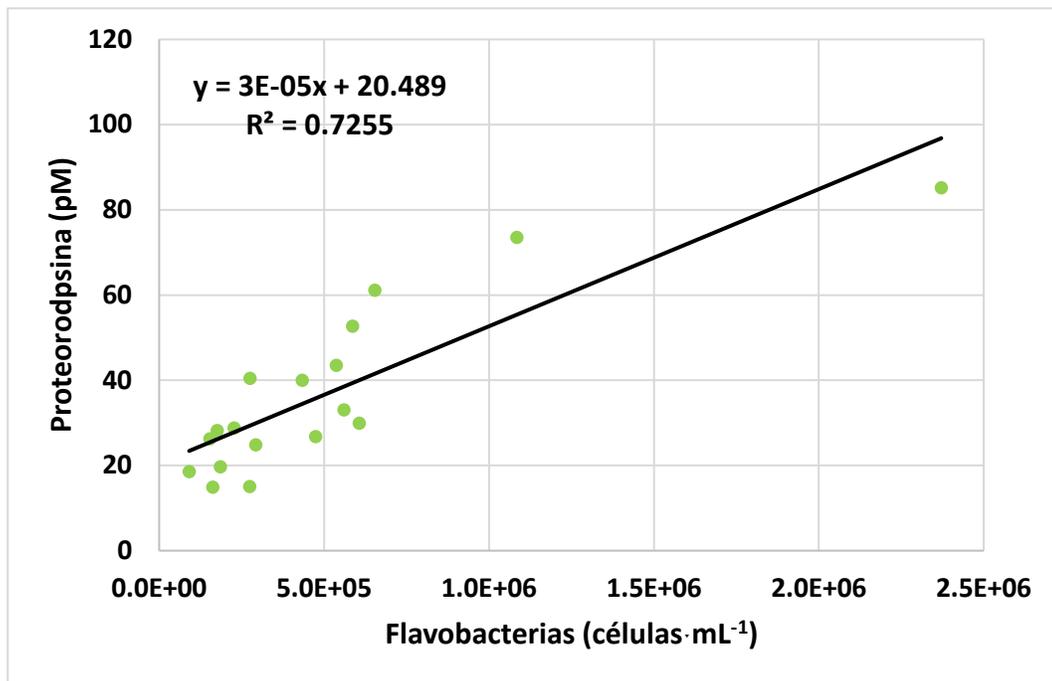


Figura 29. Modelo de regresión lineal entre las células de flavobacteriales en filtros de tamaño poro de 0.2 μm y la concentración de proteorodopsina en filtros de 0.2 μm , en experimento de mesocosmos.

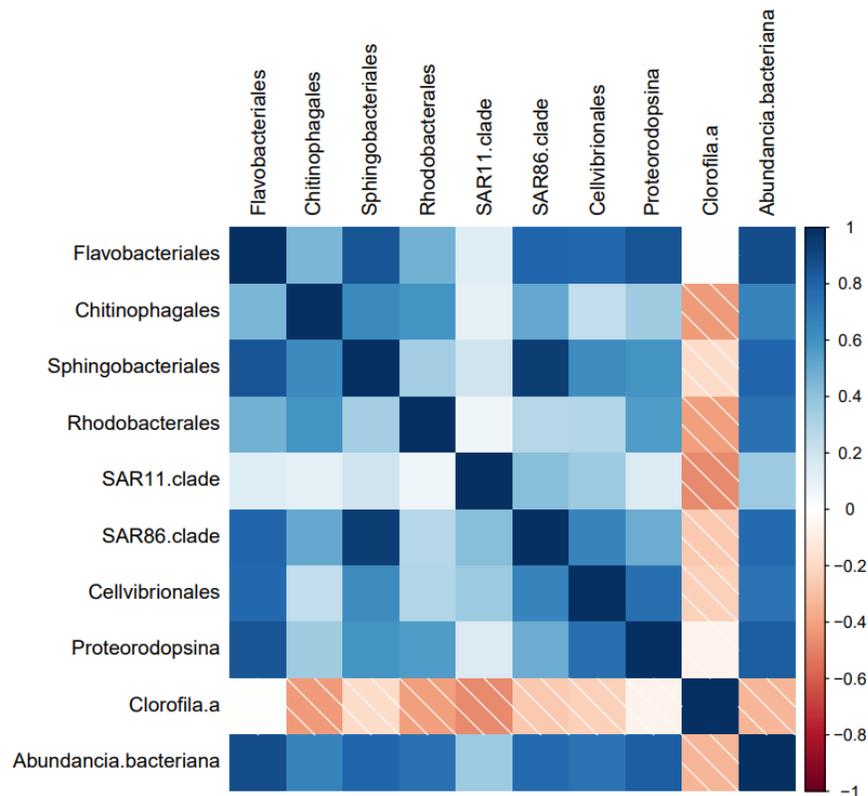


Figura 30. Matriz de correlación significativa de Pearson entre las células de órdenes bacterianos, concentración de clorofila-*a*, concentración de proteorodopsina y abundancia bacteriana. Los valores de correlación se encuentran entre -1 con colores cálidos y 1 con colores fríos.

Capítulo 4. Discusión

El experimento de mesocosmos se realizó durante 28 días, sin embargo, el análisis de datos se limitó a 20 días por las siguientes razones: 1) el crecimiento fitoplanctónico ocurrió entre los 8 y 12 días y se reflejó con las mayores concentraciones de clorofila-*a*, cumpliendo así con el objetivo principal y 2) las muestras de los últimos días tuvieron una mayor variabilidad entre réplicas, tanto en la concentración de pigmentos, como en abundancias bacterianas y las abundancias relativas de cada grupo taxonómico. Los periodos de los experimentos de mesocosmos, independientemente de los volúmenes de agua, suelen ser menores a 15 días, ya que los crecimientos microalgales inducidos por nutrientes ocurren durante los primeros días (Allers et al., 2007; Lekunberri, 2008; Pinhassi et al., 2004; Sanderson et al., 2008; Varela y Grotiuz, 2008).

En los primeros seis días del experimento, el picoplancton autótrofo (fracción retenida en el filtro de 0.2 μm) contribuyó con más del 50% de la concentración total de clorofila-*a*, a partir de los ocho días y hasta el final de la incubación comenzaron a dominar los grupos de fitoplancton mayores a 10 μm . Aunque no se analizó de forma puntual la taxonomía en los microorganismos fitoplanctónicos eucariontes, de acuerdo con la literatura, los grupos de diatomeas suelen dominar este tipo de experimentos donde se aumenta la concentración de clorofila-*a* con la adición de nutrientes (Egge y Aksnes, 1992; Pinhassi et al., 2004; Sanderson et al., 2008). Además, durante el monitoreo se observaron muestras de diferentes tiempos en el microscopio y se identificaron en su mayoría diferentes grupos de diatomeas (figuras no reportadas). Debido a ello, el aumento en la abundancia de estos microorganismos fue posiblemente la variable que más aportó al incremento de las concentraciones de clorofila-*a* que se observaron entre los 8 y 12 días.

Las mayores concentraciones de proteorodopsina, se presentaron en la fracción microbiana que contiene microorganismos de vida libre (0.2 μm -3 μm). Contrario al estudio de Gómez-Consarnau et al. (2019), se logró detectar dicho pigmento de los filtros de 3 y 10 μm (nano y microplancton), similar a la cuantificación de Hassanzadeh et al. (2021). Se observó que las concentraciones de proteorodopsina en los filtros de 10 μm fueron mayores entre los 16 y 20 días sugiriendo que esta señal se debe a bacterias con proteorodopsina adheridas a partículas del fitoplancton.

Durante los primeros seis días, las concentraciones de proteorodopsina total fueron disminuyendo, siendo inversa a la clorofila-*a* en esta parte del experimento, lo que sugiere que las altas concentraciones de nutrientes inorgánicos fueron aprovechadas por el fitoplancton y algunos miembros de la comunidad bacteriana. En este periodo la abundancia bacteriana no aumentó significativamente debido a la competencia que se generó entre los diferentes microorganismos. Entre los 8 y 12 días desde el inicio de la incubación, se identificaron las mayores concentraciones de clorofila-*a*, la proteorodopsina también

aumentó gradualmente y con ello la cantidad de células bacterianas, sugiriendo un intercambio de nutrientes entre las microalgas y las bacterias (Pinhassi et al., 2004; Riemann et al., 2000; Teeling et al., 2012). Dicho de otra forma, durante este periodo, el aumento de las concentraciones de proteorodopsina es resultado del crecimiento de las comunidades bacterianas, las cuales aumentaron su abundancia como respuesta a la materia orgánica proporcionada por el fitoplancton, así como por la disponibilidad de nutrientes inorgánicos añadidos al agua de mar. Esta tendencia es similar a la monitoreada por Hassanzadeh et al. (2021) en los diferentes meses del año en el Norte del Pacífico.

El máximo de proteorodopsina total y de abundancia bacteriana se presentaron en el día 14, mientras que la concentración de clorofila-*a* total disminuyó repentinamente. Así, la cuantificación más alta de proteorodopsina coincidió con una de las cuantificaciones más bajas de clorofila-*a*, patrón similar al reportado en el mar Mediterráneo (Gómez-Consarnau et al., 2019). En este punto posiblemente la disponibilidad de nutrientes era ya menor (debido a su consumo) y por esa razón la clorofila-*a* comenzó a decaer. Sin embargo, el DOM liberado por el fitoplancton es aprovechado por las bacterias aumentando su abundancia (Bratbak et al., 1998) y siendo más eficientes en la obtención de energía a través de un mecanismo alternativo como es la luz mediante los fotosistemas de proteorodopsina. La tendencia se comporta de forma similar los siguientes días: en el día 16 la concentración de clorofila-*a* aumenta, pero no significativamente, y se mantiene constante los otros cuatro días como resultado del proceso de remineralización de nutrientes. Las relaciones entre la dinámica de clorofila-*a* y la proteorodopsina sugeridas en este trabajo no pudieron ser establecidas mediante regresiones lineales porque el comportamiento es diferente en cada etapa del experimento. Sin embargo, los análisis de clúster verificaron tales relaciones dividiendo ambos pigmentos en los tres grupos propuestos: cuando la clorofila-*a* comienza a aumentar la concentración de proteorodopsina disminuye; en el periodo de la concentración más alta de clorofila-*a*, la proteorodopsina comienza a aumentar y al final cuando la concentración de proteorodopsina tiene sus máximos, la concentración de clorofila-*a* desciende.

La dinámica de comunidades bacterianas se analizó mediante la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr. Sin embargo, la profundidad de la secuenciación fue menor a la esperada (~10%), el motivo no es claro, pero como se mencionó en los resultados, el problema pudo haber surgido durante la segunda PCR, al generar las bibliotecas de secuenciación, al no ser añadidos por completo los *índices*. Los protocolos de “Earth Microbiome Project” recomiendan utilizar estos *primers* diseñados con los índices (“The Microbial Earth Project,” 2021), lo que evita tener que realizar una segunda reacción de PCR. A pesar de esto, los datos obtenidos fueron de buena calidad. Además, de acuerdo con las curvas de rarefacción obtenidas, (las cuales llegan a la asíntota indicando que el número de taxones es similar al esperado) el número de

lecturas fue suficiente para cumplir con el objetivo particular de observar la dinámica de las comunidades bacterianas a través del tiempo en nuestro experimento de mesocosmos.

Para evaluar la riqueza de especies dentro de cada muestra, se estimó la diversidad alfa usando el índice de Shannon-Weaver. Este análisis no es afectado por la profundidad de la secuenciación, permitiendo observar que de forma general la diversidad fue homogénea dentro de la incubación en las tres fracciones microbianas estudiadas. Aunque los valores de diversidad estimados para cada muestra son subjetivos, ya que depende de cada autor lo que considera alto y bajo, los cambios de diversidad tuvieron lugar los primeros cuatro días y los últimos cuatro días.

La asignación taxonómica se limitó hasta la clasificación de orden, lo que permitió comparar con otros trabajos de las comunidades bacterianas con genes de proteorodopsinas (Dubinsky et al., 2017; Olson et al., 2018; Sieradzki et al., 2018). Los órdenes Flavobacteriales y Rhodobacterales fueron los grupos más abundantes en todo el experimento y en los distintos filtros. Se sabe que bacterias de estos grupos se encuentran presentes durante las proliferaciones algales o en experimento de crecimiento fitoplanctónico inducido (Allers et al., 2007; Pinhassi et al., 2004; Riemann et al., 2000), estableciendo distintas relaciones simbióticas, parasitarias, mutualistas o patógenas con el fitoplancton (Amin et al., 2015, 2012; Buchan et al., 2014; Teeling et al., 2012).

El orden Rhodobacterales es uno de los más abundantes geográficamente y versátil en los sistemas marinos (Buchan et al., 2005; González y Moran, 1997), debido a las relaciones que comparte con los productores primarios, ya sea tomando los sustratos liberados por el fitoplancton (DOM) (Chen, 2012; Moran et al., 2007; Newton et al., 2010) o ejerciendo patogenicidad en el final de los florecimientos algales con la limitación de nutrientes (Seyedsayamdost et al., 2011). Aunque no se encontró correlación estadística entre este orden y la clorofila-*a*, tal grupo de bacterias incrementó su abundancia relativa a partir del sexto día cuando la clorofila-*a* aumentó sus concentraciones, reflejando de esta forma, la interacción con las microalgas y este grupo de bacterias. Su alta abundancia en este trabajo también es atribuida a otras estrategias tróficas de algunas especies como lo es la capacidad de generar ATP a través de la bacterioclorofila-*a*, usando como fuente de energía la luz solar o la asimilación de nitrógeno, azufre, fósforo y carbono (Buchan et al., 2014; Newton et al., 2010; Shiba, 1991). El orden Rhodobacterales mostró correlación con la concentración de proteorodopsina, pero no se han reportado genes de proteorodopsinas en este grupo y la correlación fue menor a 0.60 (Lázaro García, 2020; Newton et al., 2010), por lo cual esta relación puede ser consecuencia solo de la alta abundancia de células.

En los días en que se observó una mayor concentración de clorofila-*a*, el orden Flavobacteriales presentó sus mayores abundancias relativas, pero al estimar la correlación entre las células de este orden y dicho pigmento, la correlación no fue significativa. Estudios previos reportan que la abundancia de este grupo está relacionada con los florecimientos algales, su incremento suele ser mayor sobre todo en la senescencia del florecimiento microalgal, ya que aprovechan el DOM liberado por el fitoplancton (Teeling et al., 2012; Williams et al., 2013). Estas observaciones en la literatura difieren con lo reportado aquí, ya que las Flavobacterias estuvieron presentes con altas abundancias desde el inicio del crecimiento fitoplanctónico, sugiriendo una estrategia trófica donde los Flavobacteriales toman la materia orgánica liberada por el fitoplancton que está creciendo activamente o los nutrientes inorgánicos. Por otra parte, la abundancia bacteriana también coincidió con las altas abundancias relativas de los Flavobacteriales y la correlación entre ambas variables fue significativa. Considerando solo el orden Flavobacteriales, quienes en otros estudios se han visto correlacionados con la concentración de clorofila-*a* (Pinhassi et al., 2004; Teeling et al., 2012), se observó una correlación positiva con las concentraciones de proteorodopsina. Esto sugiere que la regulación de la síntesis de proteorodopsina está regulada por diferentes factores como: la disponibilidad de nutrientes, el DOM liberado (no solo su concentración sino posiblemente también su calidad y labilidad) y la comunidad bacteriana con mejor estrategia trófica.

El tercer grupo más abundante durante la incubación fueron los Alteromonadales del cual se sabe tiende a crecer rápidamente en experimentos de incubación con enriquecimiento nutritivo como respuesta a la agitación de partículas, pero solo durante los primeros días de incubación (Allers et al., 2007; Beardsley et al., 2003; Eilers et al., 2000; Newton et al., 2010). En algunos Alteromonadales también se han identificado genes de proteorodopsina, pero la regulación específica de estos genes todavía no está estudiada debido a la falta de trabajos fisiológicos. Además, en nuestro estudio los Alteromonadales no mostraron una correlación significativa con la concentración de proteorodopsina.

El análisis de correlación de Pearson entre el Clado SAR11 y la concentración de proteorodopsina no fue significativa. Este orden solo presentó altas abundancias los primeros días y al compararlo con la abundancia bacteriana no mostró correlación. Por otra parte, estuvo correlacionado de forma negativa con la concentración de clorofila-*a*, confirmando que este grupo tiene una mejor adaptación en los ambientes oligotróficos donde la productividad primaria está limitada (Giovannoni et al., 2005; Morris et al., 2002).

Rickettsiales, Rhizobiales, Vibrionales, Cellvibrionales, Cytophagales y Sphingobacteriales fueron órdenes que se encontraron en este experimento y algunos de sus miembros contienen genes de proteorodopsina (Lázaro-García, 2020). Sin embargo, la falta de conocimiento acerca de la regulación de proteorodopsina

en estos grupos no permitió establecer la relación ecológica en el sistema. Además, se encontró que las células de los órdenes Sphingobacteriales, Cellvibrionales y Clado SAR86 estuvieron correlacionados positivamente con las concentraciones de proteorodopsina.

Capítulo 5. Conclusiones

En ambientes productivos, el bacterioplancton con proteorodopsina sintetiza estos fotosistemas de acuerdo con el aumento y disminución de la biomasa del fitoplancton (el cual depende de la disponibilidad de nutrientes), así como del crecimiento bacteriano.

En ambientes productivos, el orden Flavobacteriales es el principal grupo bacteriano contribuyente de las altas concentraciones de proteorodopsina. Esto contrasta con hipótesis anteriores que sugerían que las bacterias marinas del grupo SAR11 eran los principales fotoheterótrofos a través de proteorodopsinas en el mar.

Dentro de las comunidades microbianas, las bacterias de vida libre (tamaño menor a 3 μm) son los principales microorganismos fotoheterótrofos productores de proteorodopsinas.

Literatura citada

- Allers, E., Gómez-Consarnau, L., Pinhassi, J., Gasol, J. M., Šimek, K., Pernthaler, J. 2007. Response of Alteromonadaceae and Rhodobacteriaceae to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2417–2429.
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., Morales, R. L., Berthiaume, C. T., Parker, M. S., Djunaedi, B., Ingalls, A. E., Parsek, M. R., Moran, M. A., Armbrust, E. V. 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*, 522(7554), 98–101.
- Amin, S. A., Parker, M. S., Armbrust, E. V. 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 667–684.
- Beardsley, C., Pernthaler, J., Wosniok, W., Amann, R. 2003. Are readily cultured bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Appl Environ Microbiol*, 69, 2624–2630.
- Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., DeLong, E. F. 2000. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 289(5486), 1902–1906.
- Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O., Borkovich, K. A. 1999. The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 8034–8039.
- Bloesch, J. 1988. Mesocosm studies. *Hydrobiologia*. Institute of Aquatic (EWAG), Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Ueberlandstrasse 133, CH-8600 Dübendorf, Switzerland. Recuperado de <https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag%3A8453/datastream/pdf/bloesch-1988-mesoco>, 222, 221–222.
- Bradley, I. M., Pinto, A. J., Guest, J. S. 2016. Gene-Specific Primers for Improved Characterization of Mixed Phototrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 5878–5891.
- Bratbak, G., Jacobsen, A., Høvdal, M. 1998. Viral lysis of *Phaeocystis pouchetii* and bacterial secondary production. *Aquatic Microbial Ecology*, 16(1), 11–16.
- Brock, T. D., Petersen, S. 1976. Some effects of light on viability of rhodopsin-containing Halobacteria. *Arch Microbiol.*, 109, 199–200.
- Buchan, A., González, J. M., Moran, M. A. 2005. Overview of the marine Roseobacter lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5665–5677.
- Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A., González, J. M. 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(10), 686–698.

- Bunse, C., Lundin, D., Karlsson, C. M. G., Akram, N., Vila-Costa, M., Palovaara, J., Svensson, L., Holmfeldt, K., González, J. M., Calvo, E., Pelejero, C., Marrasé, C., Dopson, M., Gasol, J. M., Pinhassi, J. 2016. Response of marine bacterioplankton pH homeostasis gene expression to elevated CO₂. *Nature Climate Change*, 6(5), 483–487.
- Caumette, P., Brochier-Armanet, C., Philippe, N. 2015. Taxonomy and phylogeny of prokaryotes. In C. Bertrand J., P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, & P. Normand (Eds.), *Environmental microbiology: fundamentals and applications* (2015th ed.). Université de Pau et des Pays de l'Adour: Université de Pau et des Pays de l'Adour, France. pp. 145–190.
- Chen, Y. 2012. Comparative genomics of methylated amine utilization by marine *Roseobacter* clade bacteria and development of functional gene markers (*tmm*, *gmaS*). *Environmental Microbiology*, 14(9), 2308–2322.
- Cock, J. M., Tessmar-Raible, K., Boyen, C., & Viard, F. (Eds.). 2010. *Introduction to Marine Genomics*. Springer Netherlands.
- Cruaud, P., Vigneron, A., Fradette, M. S., Charette, S. J., Rodriguez, M. J., Dorea, C. C., Culley, A. I. 2017. Open the Sterivex™ casing: An easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(12), 1015–1020.
- DeLong, E. F., Béjà, O. 2010. The light-driven proton pump proteorhodopsin enhances bacterial survival during tough times. *PLoS Biology*, 8(4), 1–6.
- DeLong, E. F., Karl, D. M. 2005. Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature*, 437(7057), 336–342.
- Dubinsky, V., Haber, M., Burgsdorf, I., Saurav, K., Lehahn, Y., Malik, A., Sher, D., Aharonovich, D., Steindler, L. 2017. Metagenomic analysis reveals unusually high incidence of proteorhodopsin genes in the ultraoligotrophic Eastern Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology*, 19(3), 1077–1090.
- Dupont, C. L., Rusch, D. B., Yooseph, S., Lombardo, M. J., Alexander Richter, R., Valas, R., Novotny, M., Yee-Greenbaum, J., Selengut, J. D., Haft, D. H., Halpern, A. L., Lasken, R. S., Nealson, K., Friedman, R., Craig Venter, J. 2012. Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME Journal*, 6(6), 1186–1199.
- Egge, J. K., Aksnes, D. L. 1992. Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Marine Ecology Progress Series*, 83(2–3), 281–289.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Amann, R. 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look on cultivation-induced shifts. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4634–4640.
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, J. Peter, Brown, L. S., Kandori, H. 2013. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1), 126–163.

- Falkowski, P. G. 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth*, 39, 235–258.
- Fimbres, M. M. 2019. Distribución y abundancia de microalgas ictiotóxicas en la costa noroeste de Baja California, México. Tesis de Maestría. CICESE. México., 39–45.
- Finkel, O. M., Bèjà, O., Belkin, S. 2013. Global abundance of microbial rhodopsins. *ISME Journal*, 7(2), 448–451.
- Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Masami, O., Kline, T., Nakanishi, K. 1984. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, 311, 756–759.
- Fuhrman, J. A., Hagstro, A. 2008. Microbial Ecology of the Oceans. In D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans* (2nd ed.).
- Gasol, J. M., Giorgio, P. A. Del. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64(May), 197–224.
- Giovannoni, S. J., Bibbs, L., Cho, J. C., Stapels, M. D., Desiderio, R., Vergin, K. L., Rappé, M. S., Laney, S., Wilhelm, L. J., Tripp, H. J., Mathur, E. J., Barofsky, D. F. 2005. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature*, 438(7064), 82–85.
- Gómez-Consarnau, L., Akram, N., Lindell, K., Pedersen, A., Neutze, R., Milton, D. L., González, J. M., Pinhassi, J. 2010. Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. *PLoS Biol*, 8.
- Gómez-Consarnau, Laura, Raven, J. A., Levine, N. M., Cutter, L. S., Wang, D., Seegers, B., Arístegui, J., Fuhrman, J. A., Gasol, J. M., Sañudo-Wilhelmy, S. A. 2019. Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea. *Science Advances*, 5(8), 1–8.
- González, J. M., Moran, M. A. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4237–4242.
- Grote, M., O'Malley, M. A. 2011. Enlightening the life sciences: The history of halobacterial and microbial rhodopsin research. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(6), 1082–1099.
- Handelsman, J. 2004. Magnetic resonance in $Pb_x Nb_y O_z$ -ceramics as a system containing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 1477–1481.
- Hassanzadeh, B., Thomson, B., Deans, F., Wenley, J., Lockwood, S., Currie, K., Morales, S. E., Steindler, L., Sañudo-wilhelmy, S. A., Baltar, F., Gomez-Consarnau, L. 2021. Microbial rhodopsins are increasingly favoured over chlorophyll in High Nutrient Low Chlorophyll waters. *Environmental Microbiology Reports*, 00(00–00).

- Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1225–1228.
- Horta García, M. de los A. 2020. Variación espacio-temporal de ácido domoico disuelto (ADd) en la Bahía Todos Santos, Baja California. Tesis de Maestría. CICESE. México., 01(3918), 22860.
- Johnson, E. T., Baron, D. B., Naranjo, B., Bond, D. R., Schmidt-Dannert, C., Gralnick, J. A. 2010. Enhancement of survival and electricity production in an engineered bacterium by light-driven proton pumping. *Appl Environ Microbiol*, 76, 4123–4129.
- Karl, D. 2007. Microbial oceanography: Paradigms, processes and promise. *Nature Rev. Microbiol.*, 5, 759–769.
- Karl, D., Church, M. 2014. Microbial oceanography and the Hawaii Ocean time-series programme. *Nature Rev. Microbiol.*, 12, 699–713.
- Lázaro García, J. A. 2020. Identificación de bacterias fotoheterótrofas cultivables productoras de rodopsinas en la cuenca del sur de California y en bases de datos genómicas globales. Tesis de Maestría. CICESE. México.
- Lekunberri, I. 2008. Effects of different allochthonous carbon sources on marine bacterioplankton diversity and function. Tesis de Doctorado. Universitat Politècnica de Catalunya., 1–224.
- Moran, M. A., Belas, R., Schell, M. A., González, J. M., Sun, F., Sun, S., Binder, B. J., Edmonds, J., Ye, W., Orcutt, B., Howard, E. C., Meile, C., Palefsky, W., Goesmann, A., Ren, Q., Paulsen, I., Ulrich, L. E., Thompson, L. S., ... Buchan, A. 2007. Ecological genomics of marine roseobacters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4559–4569.
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A., Giovannoni, S. J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 420(6917), 806–810.
- Newton, R. J., Griffin, L. E., Bowles, K. M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C. E., Howard, E. C., King, E., Oakley, C. A., Reisch, C. R., Rinta-Kanto, J. M., Sharma, S., Sun, S., Varaljay, V., Vila-Costa, M., Westrich, J. R., Moran, M. A. 2010. Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME Journal*, 4(6), 784–798.
- Niel, C. B. 1932. On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria". *Archiv Fur Mikrobiologie*, 3, 1–112.
- Oesterhelt, D., Krippahl, G. 1983. Phototropic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Pasteur Microbiol. Ann Inst*, 134(B), 137–150.
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. 1971. Rhodopsin-like protein from purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology*, 233, 149–152.
- Olson, D. K., Yoshizawa, S., Boeuf, D., Iwasaki, W., Delong, E. F. 2018. Proteorhodopsin variability and

- distribution in the North Pacific Subtropical Gyre. *ISME Journal*, 12(4), 1047–1060.
- Palovaara, J., Akram, N., Baltar, F., Bunse, C., Forsberg, J., Pedrós-Alió, C., González, J. M., J., P. 2014. Stimulation of growth by proteorhodopsin phototrophy involves regulation of central metabolic pathways in marine planktonic bacteria. *PNAS*, 111(E3650–E3658).
- Parada, A. E., Needham, D. M., Fuhrman, J. A. 2015. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414.
- Partensky, F., Hess, W. R., Vaultot., D. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 106–127, 63(106–127).
- Petersen, J. E. ., Englund, G. 2005. 'Dimensional approaches to designing better experimental ecosystems: a practitioners guide with examples.' *Oecologia*, 145(216–224).
- Pinhassi, J., DeLong, E. F., Bèjà, O., González, J. M., Pedrós-Alió, C. 2016. Marine Bacterial and Archaeal Ion-Pumping Rhodopsins: Genetic Diversity, Physiology, and Ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4), 929–954.
- Pinhassi, J., Gómez-consarnau, L., Alonso-sáez, L., Pedrós-alió, C., Gasol, J. M. 2006. Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. 44, 241–252.
- Pinhassi, J., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., Pinhassi, J., Havskum, H., Peters, F., Malits, A. 2004. Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens †. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6753–6766.
- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, 24(9), 499–504.
- Riemann, L., Steward, G. F., Azam, F. 2000. Erratum: Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom (*Applied and Environmental Microbiology* (2000) 66:2 (578-587)). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2282.
- Salazar, G., Sunagawa, S. 2017. Marine microbial diversity. *Current Biology Magazine*, 27.
- Sanderson, M. P., Bronk, D. A., Nejstgaard, J. C., Verity, P. G., Sazhin, A. F., Frischer, M. E. 2008. Phytoplankton and bacterial uptake of inorganic and organic nitrogen during an induced bloom of *Phaeocystis pouchetii*. *Aquatic Microbial Ecology*, 51(2), 153–168.
- Scha, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms : changes in the genetic diversity of bacterial populations. 34, 243–253.
- Seyedsayamdost, M. R., Case, R. J., Kolter, R. & Clardy, J. 2011. The Jekyll-and-Hyde chemistry of

Phaeobacter gallacensis. *Nature Chem.*, 3, 331–335.

Shiba, T. 1991. *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., Aerobic Pink-Pigmented Bacteria which Contain Bacteriochlorophyll a. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(2), 140–145.

Sieradzki, E. T., Fuhrman, J. A., Rivero-Calle, S., Gómez-Consarnau, L. 2018. Proteorhodopsins dominate the expression of phototrophic mechanisms in seasonal and dynamic marine picoplankton communities. *PeerJ*, 2018(10).

Smayda, T. J. 1991. *Novel and Nuisance*. 40, 206.

Spudich, J. L., Bogomolni, R. A. 1984. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, 312, 509–513.

Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H., Spudich, E. N. 2000. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 365–392.

Steindler, L., Schwabach, M. S., Smith, D. P., Chan, F., Giovannoni, S. J. 2011. Energy starved candidatus pelagibacter ubique substitutes light-mediated ATP production for endogenous carbon respiration. *PLoS ONE*, 6(5), 1–10.

Stoeckenius, W. 1994. From membrane structure to bacteriorhodopsin. *Membrane Biol*, 139, 139–148.

Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., Kassabgy, M., Huang, S., Mann, A. J., Waldmann, J., Weber, M., Klindworth, A., Otto, A., Lange, J., Bernhardt, J., Reinsch, C., Hecker, M., Peplies, J., ... Amann, R. 2012. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 336(6081), 608–611.

The Microbial Earth Project. 2021. from <https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>

Torsvik, V., Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240–245.

Valiela, J., Koumjian, L., Swain, T., Hobbie, J. E. 1979. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *Nature*, 280.

Varela, G., Grotiuz, G. 2008. Fisiología y metabolismo bacteriano Metabolismo productor de energía. In *Temas De Bacteriología Y Virología Médica*. pp. 43–57.

Walters, W., Hyde, E. R., Berg-lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. a, Jansson, J. K. 2015. Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *MSystems*, 1(1), e0009-15.

Wang, Z., O'Shaughnessy, T. J., Soto, C. M., Rahbar, A. M., Robertson, K. L., Lebedev, N., Vora, G. J. 2012.

Function and regulation of *Vibrio campbellii* proteorhodopsin: acquired phototrophy in a classical organoheterotroph. *PLoS ONE*, 7, e38749.

Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnology, Oceanographic*, 39(8).

Williams, T. J., Wilkins, D., Long, E., Evans, F., Demaere, M. Z., Raftery, M. J., Cavicchioli, R. 2013. The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1302–1317.

Woese, C., Fox, G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *PNAS.*, 74(11), 5088–5090.

Woodward, R. B., Ayer, W. A., Beaton, J. M., Bickelhaupt, F., R., B., Buchschacher, P. 1990. "The total synthesis of chlorophyll a". *Tetrahedron*, 46(22), 7599–7659.

Zbigniew, K., Falkowski, P. G. 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnology and Oceanography*, 38(8), 1646–1665.

Anexos

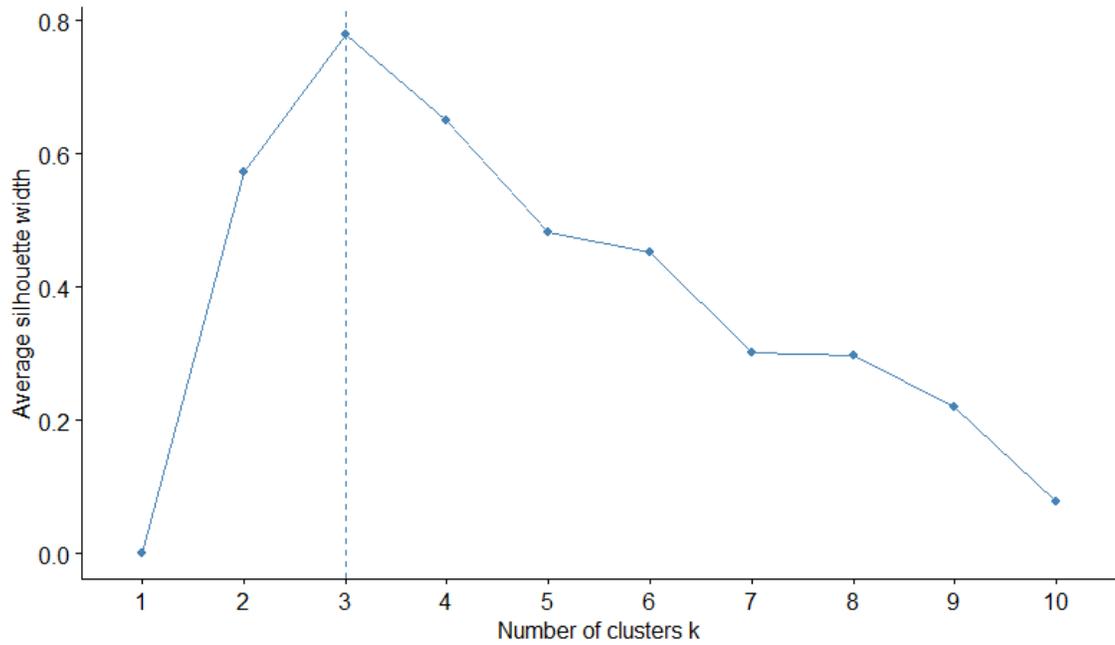


Figura 31. Gráfico de estimación de clústeres: método Average.

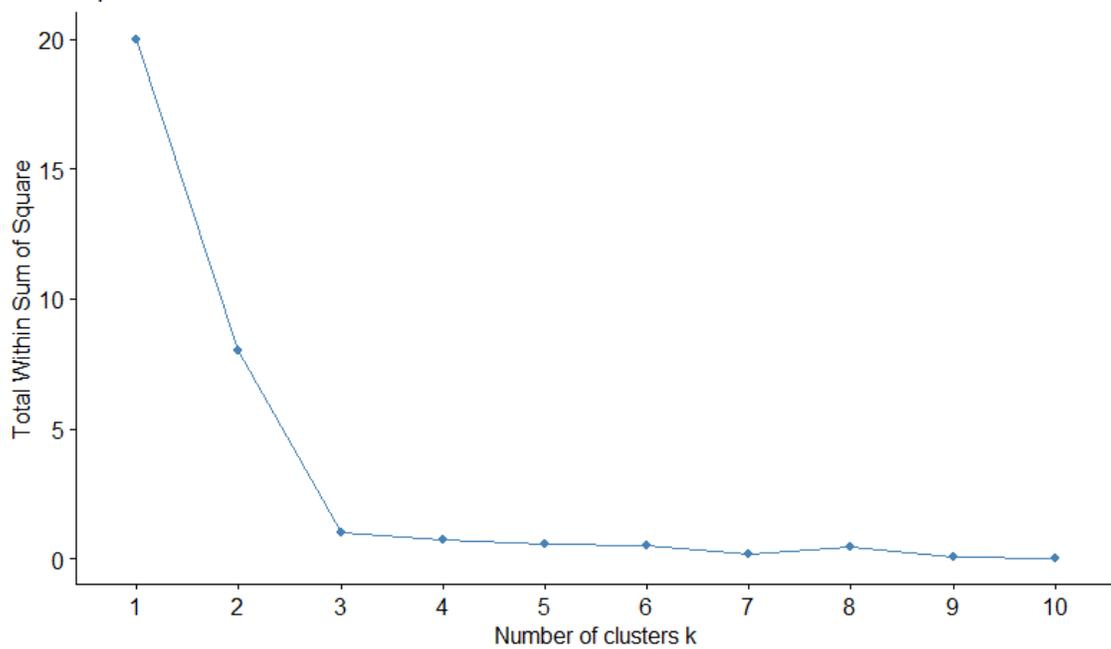


Figura 32. Gráfico de estimación de clústeres: método Elbow.

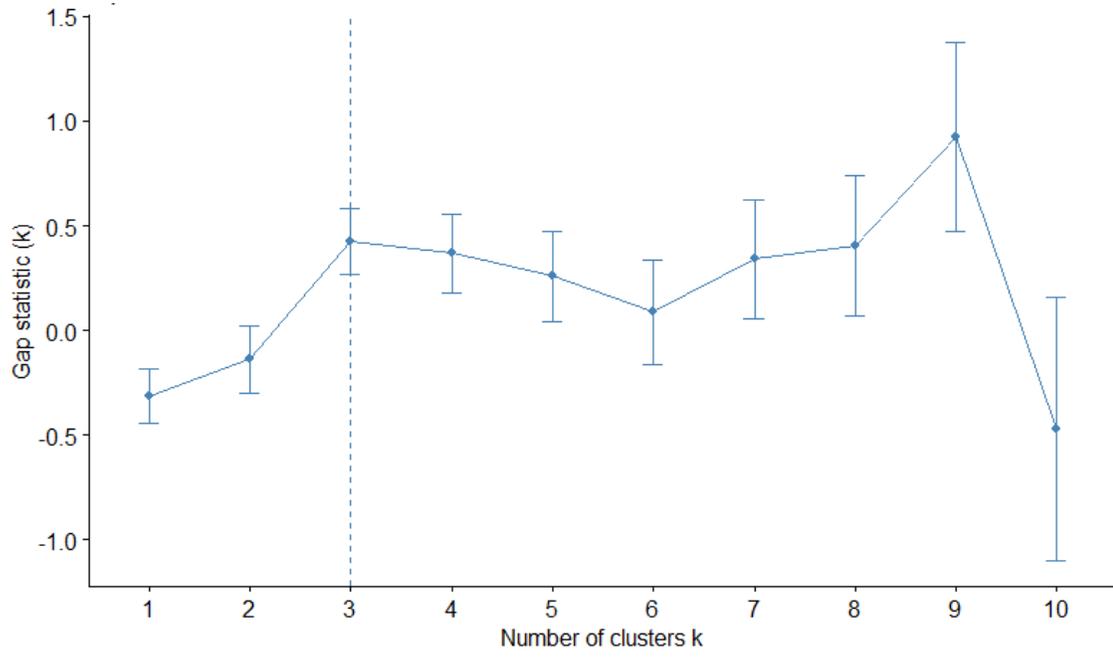


Figura 33. Gráfico de estimación de clústeres: método GAP.

Tabla 1. Tabla de datos de secuencias obtenidas en cada muestra: filtradas (inferidas), emparejadas (unión de forward y reverse) y libres de quimeras (tomadas en cuenta para asignación taxonómica).

Muestra	Filtro (micras)	Días de experimento	Secuencias forward inferidas	Secuencias reverse inferidas	Secuencias emparejadas	Secuencias libres de quimeras
M1	0.2	0	6351	6284	4838	3389
M1	3	0	5448	5470	2385	1877
M1	10	0	5569	5349	1779	1396
M2	0.2	0	6182	6294	4418	3252
M2	3	0	2108	1685	480	289
M2	10	0	6544	6415	3898	2910
R28	0.2	2	5847	5841	4496	3270
R28	3	2	7075	6984	4927	4076
R28	10	2	3936	3840	1451	1291
R27	0.2	2	5277	5188	3872	2730
R27	3	2	9944	9840	6440	5142
R27	10	2	3812	3684	913	853
R26	0.2	4	4789	4708	3976	3380
R26	3	4	8458	8240	6620	5260
R26	10	4	6788	6596	3935	3271
R25	0.2	4	4992	4837	3072	2535
R25	3	4	6787	6591	4904	3990
R25	10	4	7567	7451	6107	4679
R24	0.2	6	7064	7051	6045	4542
R24	3	6	6018	5884	4823	3606
R24	10	6	5634	5467	4217	3278
R23	0.2	6	5325	5190	4353	3817
R23	3	6	8327	8086	7002	5097
R23	10	6	4481	4465	2905	2298
R22	0.2	8	6458	6370	5749	4869
R22	3	8	7205	7105	6411	5222
R22	10	8	3866	3882	2180	1859
R21	0.2	8	5533	5462	4995	4141
R21	3	8	6431	6363	5369	4621
R21	10	8	4867	4757	3267	2883
R20	0.2	10	6229	6148	5527	4627
R20	3	10	7276	7137	6394	4971
R20	10	10	5254	5150	3903	3325
R19	0.2	10	5650	5610	5158	3872
R19	3	10	6304	6041	5520	4269
R19	10	10	6421	6369	5170	4124
R18	0.2	12	5380	5329	4886	3768

R18	3	12	8181	7989	7392	5093
R18	10	12	5380	5329	4886	3768
R17	0.2	12	5314	5147	4636	3638
R17	3	12	8751	8624	8137	5746
R17	10	12	5023	4911	2892	2103
R16	0.2	14	4546	4350	3779	3124
R16	3	14	7584	7471	6663	5103
R16	10	14	7813	7579	6189	4287
R15	0.2	14	6414	6232	5737	3790
R15	3	14	4491	4324	2106	1833
R15	10	14	5275	5179	1612	1372
R14	0.2	16	7154	6899	5927	4331
R14	3	16	6217	5924	5205	3739
R14	10	16	4649	4625	3113	2489
R13	0.2	16	6324	5986	5314	3542
R13	3	16	6594	6406	3927	3003
R13	10	16	4639	4586	3212	2525
R12	0.2	18	5075	4975	4218	3241
R12	3	18	6036	5914	3053	2211
R12	10	18	4455	4251	3275	2306
R11	0.2	18	6509	6377	5816	3959
R11	3	18	5013	4864	4127	3038
R11	10	18	4375	4370	634	378
R10	0.2	20	7512	7269	6664	4379
R10	3	20	5616	5476	4756	3453
R10	10	20	6899	6866	3663	2318
R9	0.2	20	7808	7659	6810	4706
R9	3	20	4618	4507	3602	2715
R9	10	20	6381	6257	5494	3633
Total			395843	387509	295224	224602

Tabla 2. Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la concentración de proteorodopsina (filtros con poro de 0.2 μm). Valores significativos en rojo.

Parámetro	Grado de correlación de Pearson con concentración proteorodopsina	Valor p (valor de significancia)
Flavobacteriales	0.85	0.0
Chitinophagales	0.35	0.15
Sphingobacteriales	0.59	0.01
ML602M-17	0.12	0.64
Rhodobacterales	0.56	0.01
SAR11 clade	0.16	0.53
Puniceispirillales	0.31	0.21
Parvibaculales	0.39	0.337
Rhodospirillales	0.06	0.81
Alteromonadales	0.12	0.63
SAR86 clade	0.49	0.03
Cellvibrionales	0.76	0.0
Vibrionales	0.25	0.32
Burkholderiales	0.4	0.09
Oceanospirillales	0.37	0.12
Synechococcales	0.15	0.56
Clorofila- α	-0.06	0.81
Abundancia bacteriana	0.82	0

Tabla 3. Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la concentración de clorofila-*a* (filtros con poro de 0.2 μm). Valores significativos en rojo.

Parámetro	Grado de correlación de Pearson con concentración de clorofila- <i>a</i>	Valor p (valor de significancia)
Flavobacteriales	0.0	0.99
Chitinophagales	-0.42	0.08
Sphingobacteriales	-0.19	0.45
ML602M-17	-0.33	0.18
Rhodobacterales	-0.41	0.08
SAR11 clade	-0.47	0.04
Puniceispirillales	-0.35	0.15
Parvibaculales	-0.39	0.11
Rhodospirillales	-0.38	0.12
Alteromonadales	-0.16	0.53
SAR86 clade	-0.27	0.28
Cellvibrionales	-0.24	0.33
Vibrionales	-0.38	0.11
Burkholderiales	-0.12	0.62
Oceanospirillales	0.23	0.36
Synechococcales	0.1	0.68
Proteorodopsina	-0.06	0.81
Abundancia bacteriana	-0.34	0.17

Tabla 4. Tabla de valores de correlación de Pearson entre células de órdenes bacterianos y la abundancia bacteriana. Valores significativos en rojo.

Parámetro	Grado de correlación de Pearson con abundancia bacteriana	Valor p (valor de significancia)
Flavobacteriales	0.88	0.0
Chitinophagales	0.63	0.0
Sphingobacteriales	0.79	0.0
ML602M-17	0.21	0.39
Rhodobacterales	0.74	0.0
SAR11 clade	0.37	0.13
Puniceispirillales	0.33	0.18
Parvibaculales	0.31	0.21
Rhodospirillales	-0.07	0.77
Alteromonadales	0.06	0.81
SAR86 clade	0.77	0.0
Cellvibrionales	0.73	0.0
Vibrionales	0.46	0.05
Burkholderiales	0.36	0.14
Oceanospirillales	0.04	0.86
Synechococcales	-0.32	0.19
Proteorodopsina	0.82	0.0
Clorofila- <i>a</i>	-0.34	0.17