

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Efecto de la luz sobre las tasas de respiración y niveles de ATP
en la bacteria fotoheterótrofa marina *Dokdonia* sp. (MED134)**

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

Presenta:

Diana Laura Vázquez Alfaro

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Diana Laura Vázquez Alfaro

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Laura Gómez Consarnau
Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Codirectora de tesis

Dr. Miguel Cuevas Cruz

Dr. Ernesto García Mendoza

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Josué Rodolfo Villegas Mendoza



Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Copyright © 2023, Todos los Derechos Reservados, CICESE
Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE

Resumen de la tesis que presenta **Diana Laura Vázquez Alfaro** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Efecto de la luz sobre las tasas de respiración y niveles de ATP en la bacteria fotoheterótrofa marina *Dokdonia* sp. MED134

Resumen aprobado por:

Dra. Laura Gómez Consarnau
Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Codirectora de tesis

Las proteorodopsinas (PR) son proteínas transmembranales que funcionan como bombas de protones impulsadas por la luz y están distribuidas ampliamente en bacterias de la superficie marina. Sin embargo, sólo unas cuantas especies de bacterias nativas fotoheterótrofas han logrado ser cultivadas. Este estudio se enfoca en la caracterización de las tasas de respiración y niveles de energía (ATP) de la cepa fotoheterótrofa *Dokdonia* sp. MED134 (phylum Bacteroidetes). El experimento de crecimiento consistió en un cultivo de siete días con agua de mar y carbono orgánico disuelto (0.39 mM) en condiciones de luz y oscuridad. Los resultados indicaron que el crecimiento durante la fase exponencial fue mayor en condiciones de luz, como se ha reportado anteriormente. En contraste, las tasas de respiración y niveles de ATP fueron más bajos en condiciones de luz con respecto de las bacterias que crecieron en oscuridad (5.41×10^{-10} vs. 5.96×10^{-10} $\mu\text{mol O}_2\text{-cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; 15.76 vs. 45.40 ag ATP·cél⁻¹). Por otro lado, las tasas de respiración en la fase estacionaria mostraron un decremento en luz contra oscuridad (2.77×10^{-10} vs. 6.69×10^{-10} $\mu\text{mol O}_2\text{-cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Los niveles de ATP fueron inesperadamente más altos en oscuridad durante la fase exponencial, pero mostraron un marcado declive en la fase estacionaria (45.40 vs. 5.23 ag ATP·cél⁻¹). Mientras tanto en luz, los niveles de ATP se mantuvieron relativamente estables en el transcurso de la fase exponencial y estacionaria (15.76 vs. 11.29 ag ATP·cél⁻¹). Los resultados sugieren que *Dokdonia* sp. MED134 alcanza una mayor abundancia en luz debido a que mantiene activamente la respiración y el uso de las PR durante la fase estacionaria, y como sugiere la literatura, el transporte activo podría mejorar el metabolismo del carbono con el transporte de sustratos como la tiamina. En conclusión, los datos sugieren que conforme el carbono se vuelve limitante en la fase estacionaria, las tasas de respiración disminuyen y la fuerza protón motriz de las PR se vuelve más importante para el mantenimiento de los niveles de ATP y el transporte de sustratos y otros requerimientos de la célula en condiciones de luz.

Palabras clave: Fotoheterotrofia, flavobacteria, proteorodopsina, respiración, ATP.

Abstract of the thesis presented by **Diana Laura Vázquez Alfaro** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

Effect of light on respiration rates and ATP levels of photoheterotrophic marine bacteria *Dokdonia* sp. MED134

Abstract approved by:

PhD. Laura Gómez Consarnau
Thesis Co-Director

PhD. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Thesis Co-Director

Proteorhodopsins (PR) are transmembrane proteins that function as light-driven proton pumps, PR are widely distributed in marine surface bacteria. However, only a few species of native photoheterotrophic bacteria have been cultured. This study focuses on the respiration rates and energy (ATP) levels characterization of the photoheterotrophic strain *Dokdonia* sp. MED134 (phylum Bacteroidetes). The growth experiment consisted in a seven-day culture with seawater and dissolved organic carbon (0.39 mM) under light and dark conditions. The results showed that growth during the exponential phase was higher under light conditions, as previously reported. In contrast, respiration rates and ATP levels were lower in light conditions compared to bacteria that grew in the dark (5.41×10^{-10} vs. 5.96×10^{-10} $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 15.76 vs. 45.40 ag ATP $\cdot\text{cell}^{-1}$). On the other hand, respiration rates in the stationary phase showed a decrease in light vs. dark (2.77×10^{-10} vs. 6×10^{-10} $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). ATP levels were unexpectedly higher in the dark during the exponential phase but showed a marked decrease in the stationary phase (45.40 vs. 5.23 ag ATP $\cdot\text{cell}^{-1}$). Meanwhile, ATP levels in light remained relatively stable through exponential and stationary phase (15.76 vs. 11.29 ag ATP $\cdot\text{cell}^{-1}$). Results suggest that *Dokdonia* sp. MED134 reaches a higher abundance in light because it maintains an active respiration and PR use during stationary growth, and as the literature suggests, active transport could enhance carbon metabolism with the transport of substrates such as thiamine. In conclusion, the data suggest that as carbon becomes limiting in the stationary phase, respiration rates decrease, and the proton-motive force of PRs becomes more important for the maintenance of ATP levels and the transport of substrates and other cell requirements under light conditions.

Keywords: Photoheterotrophy, flavobacteria, proteorhodopsin, respiration, ATP.

Dedicatoria

A mi familia,

Quienes trabajaron activamente en poder brindarme educación y siguen apoyándome en cada paso.

A Carlos,

Por su amor y compañía en esta etapa.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. A todo el personal que lo conforma, por abrirme las puertas desde el 2016 y permitirme ampliar mi estancia como estudiante de maestría. Agradezco todas las enseñanzas por parte de los investigadores que tuve el placer de conocer.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico brindado durante el ciclo 2020 – 2022.

A todo mi comité de tesis por su constante apoyo durante este proyecto de tesis; a la Dra. Laura Gómez por introducirme al mundo de las rodopsinas microbianas. Al Dr. Miguel Cuevas, por su valiosa amistad, su apoyo en el laboratorio y por las interesantes discusiones que surgían tras alguna corrección; gracias por cuestionarme tanto. Al Dr. Josué Villegas, por sus observaciones durante el transcurso del experimento, por brindarme acceso al laboratorio de la Facultad de Ciencias Marinas y por siempre tener sus puertas abiertas para revisar dudas. A la Dra. Meritxell Riquelme, por su empatía e inmensa paciencia con los avances del proyecto. Al Dr. Ernesto García, por su paciencia con los cambios de proyecto y apoyo con el material de laboratorio. A la Dra. Lucila Lares, por su rápida respuesta, atención y apoyo en la recta final.

A Carmen Elvira Vargas, por hacer hincapié respecto a las buenas prácticas, todas las enseñanzas me ayudaron durante los días solitarios en el laboratorio.

A mi familia Vázquez - Gutiérrez, por su inmenso cariño y apoyo económico en esta etapa.

A mis compañeros del grupo de rodopsinas, Netzahualcóyotl, Isis, Andrés, Carolina y Ángeles. Por ofrecerme su ayuda durante mis experimentos y sus observaciones.

A mis amigos del alma, Carolina, Viry, Mary Mar, Felipe, Alejandro Domínguez y Alejandro Osuna. Por su valiosa amistad y siempre estar presentes.

A todas aquellas personas que se tomaron el tiempo de hacerme compañía y brindarme una cálida sonrisa. ¡Gracias!

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Fototrofia bacteriana	1
1.1.1 Heterotrofia bacteriana	2
1.1.2 Rodopsinas	5
1.2 Antecedentes.....	6
1.2.1 Respiración y proteorodopsinas	6
1.3 Justificación.....	9
1.4 Hipótesis	9
1.5 Objetivos	10
1.5.1 Objetivo general.....	10
1.5.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Descripción de la cepa	11
2.2 Preparación del cultivo	11
2.2.1 Siembra y cultivo inicial.....	11
2.2.2 Cultivo intermedio.....	12
2.2.3 Cultivo final.....	12
2.3 Crecimiento bacteriano	13

2.4	Tasas de respiración.....	14
2.4.1	Cuantificación de oxígeno	14
2.4.2	Cálculo de tasas de consumo de oxígeno	15
2.4.3	Tasa de consumo de O ₂ por célula.....	15
2.5	Determinación de niveles de ATP	15
2.5.1	Método de bioluminiscencia.....	16
2.5.2	Cuantificación de ATP en los cultivos.....	16
2.5.3	Curva de calibración	17
Capítulo 3.	Resultados	19
3.1	Caracterización del crecimiento	19
3.2	Tasas de respiración.....	20
3.2.1	Fase exponencial	¡Error! Marcador no definido.
3.3	Niveles de ATP celular.....	24
Capítulo 4.	Discusión	25
4.1	Crecimiento.....	25
4.2	Tasas de respiración.....	27
4.3	Niveles de ATP	28
Capítulo 5.	Conclusiones.....	31
Literatura citada.....		32
Anexos		35

Lista de figuras

Figura	Página
1. Tipos de fototrofía, pigmentos o proteínas para la utilización de luz y mecanismo empleado para transformar la luz en energía química.	2
2. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Metabolitos principales en color negro; las reacciones de oxidación y reducción se muestran en color gris. El oxaloacetato es un producto intermedio que puede ser utilizado para biosíntesis celular. Modificado de Prescott <i>et al.</i> , 2004.	4
3. Mecanismo simplificado de las proteorodopsinas (PR). A partir de la captura de fotones se genera una fuerza protón-motriz en la membrana que activa la ATP sintasa. Membrana citoplasmática (interna), el espacio periplasmático corresponde al color blanco y el citoplasma al color naranja. Diagrama modificado de DeLong y Béjà (2010).	5
4. Rendimiento del crecimiento celular <i>Dokdonia</i> sp. MED134 en luz vs. oscuridad en diferentes concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD); proporción de crecimiento luz/oscuridad (barras), abundancia celular (círculos). Gómez-Consarnau <i>et al.</i> , 2016.	7
5. Nivel de expresión de genes correspondientes a procesos generados por la FPM en <i>Dokdonia</i> sp. MED134 y DSW-1. El tratamiento en luz muestra fondo blanco y en oscuridad se muestra con un fondo gris. Las muestras del transcriptoma se colectaron a las 120 h de la fase de crecimiento. Gómez-Consarnau <i>et al.</i> , 2016.	7
6. Respiración de <i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> (SAR11) en condiciones limitadas de carbono. Concentración de oxígeno y densidad celular en cultivos en oscuridad constante (barras y círculos negros) y luz: oscuridad (12:12 h); barras y triángulos en blanco. Steindler <i>et al.</i> , 2011.	8
7. Morfología de SAR11 durante la fase estacionaria en condiciones de inanición. Cultivos en condiciones constantes de luz ($70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u oscuridad. Los días en la parte superior indica los días transcurridos en la fase estacionaria, las fotos correspondientes a 5 días de crecimiento se muestran en dos ampliaciones ($\approx 30000\times$ (B y F) y $105000\times$ (C y G)). Modificado de Steindler <i>et al.</i> , 2011.	9
8. Diseño experimental desde la siembra hasta el cultivo final.	12
9. Preparación de placas con marcador fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para conteos mediante microscopía de epifluorescencia. El cuadro gris representa el tiempo que se mantuvo en oscuridad.	13
10. Representación de la cuantificación de la concentración de oxígeno con el equipo PreSens (Fibox 4).	14
11. Método de extracción y cuantificación de ATP en muestras del cultivo final. El procedimiento se repitió durante las 72 h y 120 h.	17
12. Curva de calibración de ATP.	18

13. Promedios y desviación estándar de la abundancia bacteriana (triplicados) de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz (amarillo) y oscuridad (negro). No se determinó la abundancia a las 96 h debido a problemas técnicos. Características del medio; concentración de carbono orgánico inicial (0.39 mM C, Zobell), luz continua (130 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura (18 °C \pm 1 °C). 19
14. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O₂ vs. tiempo con tendencia lineal en la fase exponencial de cuatro réplicas de luz (72 h). 21
15. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O₂ vs. tiempo con tendencia lineal en la fase exponencial de cuatro réplicas de oscuridad (72 h). 21
16. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O₂ vs. tiempo con tendencia lineal en la fase estacionaria (120 h) de cuatro réplicas de luz. 22
17. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O₂ vs. tiempo con tendencia lineal en la fase estacionaria (120 h) de cuatro réplicas de oscuridad. 23
18. Tasa de respiración celular en la fase exponencial (72 h) y estacionaria (120 h) del crecimiento de MED134 en condiciones de luz (barra amarilla) y oscuridad (barra gris). Las barras en el centro indican la desviación estándar de duplicados. 23
19. Niveles de ATP y tasas de respiración de MED134 durante las fases de crecimiento exponencial (72 h) y estacionaria (120 h). El ATP corresponde a las barras naranjas y la respiración a las barras sin fondo. Los niveles de ATP se muestran en atogramos (ag) que es equivalente a 10⁻¹⁸ g..... 24
20. Ciclo de TCA y reacciones anapleróticas (flechas rojas). Las reacciones anapleróticas son reacciones que reponen productos intermedios del TCA mediante la fijación de CO₂. Modificado de Prescott *et al.*, 2004..... 26
21. Crecimiento de MED134 con respecto del tiempo en condiciones de luz (puntos naranjas) y oscuridad (puntos negros). Medio de cultivo con exceso de nutrientes inorgánicos (2.1 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$ y 0.3 $\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_3$, concentración de COD de 0.39 mM C (Zobell), temperatura 18 °C, cultivos de 1.9 L. Gómez-Consarnau *et al.*, 2016. 35
22. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento exponencial de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10⁵ cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4)..... 36
23. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento exponencial de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de oscuridad. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10⁵ cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4). 36
24. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento estacionaria de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de

- luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4)..... 37
25. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento estacionaria de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4)..... 37
26. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase exponencial en condiciones de luz. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardo en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio..... 38
27. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase exponencial en condiciones de oscuridad. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardo en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio..... 38
28. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase estacionaria en condiciones de luz. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardo en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio..... 39
29. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase estacionaria en condiciones de luz. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardo en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio..... 39

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Diluciones correspondientes a la curva de calibración de ATP.....	18
2. Resultados de los conteos celulares por microscopía de epifluorescencia correspondientes a la curva de crecimiento de MED134.....	20
3. Preparación de medio Zobell para el cultivo inicial de MED134.....	35

Capítulo 1. Introducción

1.1 Fototrofia bacteriana

Las bacterias marinas son microorganismos clave en el océano debido a su participación dentro de los procesos biogeoquímicos (e.g. ciclo del carbono y nitrógeno) y por su función en la transferencia de energía a niveles tróficos más altos (Munn, 2020; Pomeroy, 1974; Valiela, 2015). La amplia diversidad metabólica de las bacterias marinas les permite tener una distribución cosmopolita en el océano. La zona fótica, en particular, se destaca por ser un espacio de alta actividad biológica (energía), debido a que en la superficie convergen una gran diversidad de microorganismos con diferentes estrategias nutricionales: los organismos fotótrofos, heterótrofos y fotoheterótrofos (Valiela, 2015; Bruslind, 2021).

La luz desempeña un papel crucial en el metabolismo de los microorganismos porque es una fuente de energía que es aprovechada por el plancton. La transformación de luz a energía química (ATP) se conoce como fototrofia (Bruslind, 2021). Hasta ahora se conocen dos principales formas de generar energía a partir de la luz: la fotoautotrofia y la fotoheterotrofia (Figura 1). La fotoautotrofia, también conocida como fotosíntesis, es el método de obtención de energía a partir de luz; además, durante el proceso se incorporan dióxido de carbono y agua. El phylum de las cianobacterias es el ejemplo más conocido de bacterias fotosintéticas, las cuales utilizan como pigmento principal la clorofila y absorben la luz en longitudes de onda en el rango del espectro visible (≈ 430 y 675 nm) (Bruslind, 2021). Por otro lado, la fotoheterotrofia implica la obtención de la energía mediante compuestos orgánicos y a partir de la captación de luz con pigmentos como la bacterioclorofila o mediante el retinal en las rodopsinas (RD) (Shiba *et al.*, 1979; Bèjà *et al.*, 2000; Kolber *et al.*, 2000). La bacterioclorofila posee en su estructura central una porfirina con dobles enlaces de carbono y la presencia del ion magnesio similar a la clorofila. Este pigmento absorbe principalmente en longitudes de onda del espectro infrarrojo ($\approx 825 - 1040$ nm); por otro lado, las bacterias con bacterioclorofila también tienen la capacidad de absorber luz en longitudes de onda del espectro visible, entre el azul y el verde ($\approx 400 - 500$ nm) con la ayuda de pigmentos accesorios (e.g. carotenoides) (Koblížek *et al.*, 2015).

Las proteínas RD son proteínas transmembranales que pueden funcionar como bombas de iones o protones impulsadas por luz y tienen un rango de absorción en el azul o el verde ($\approx 490 - 530$ nm) según el tipo de RD y el organismo en que se encuentren (Bèjà *et al.*, 2000; Gómez-Consarnau *et al.*, 2007;

Rozenberg *et al.*, 2021). Un ejemplo de este tipo de proteínas son las proteorodopsinas (PR), las cuales funcionan como bombas de protones (H^+) impulsadas por luz y se caracterizan por su función bioenergética en grupos del bacterioplancton con requerimientos nutricionales distintos (copiotróficos, oligotróficos), como los géneros *Dokdonia* (phylum Bacteroidetes), *Pelagibacter* (phylum Proteobacteria) y *Vibrio* (phylum Proteobacteria) (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007; Gómez-Consarnau *et al.*, 2010; Giovannoni *et al.*, 2017). Esta tesis se enfoca al estudio de la fotoheterotrofia mediante PR, porque estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en el océano (Finkel *et al.*, 2013; Dubinsky *et al.*, 2017; Sieradzki *et al.*, 2018) y pueden ser clave en la captación de energía en la zona fótica (Gómez-Consarnau *et al.*, 2019). A día de hoy, se han realizado pocos estudios experimentales que traten de entender las respuestas fisiológicas asociadas al uso de la luz usando cepas cultivables de bacterias marinas con PR.

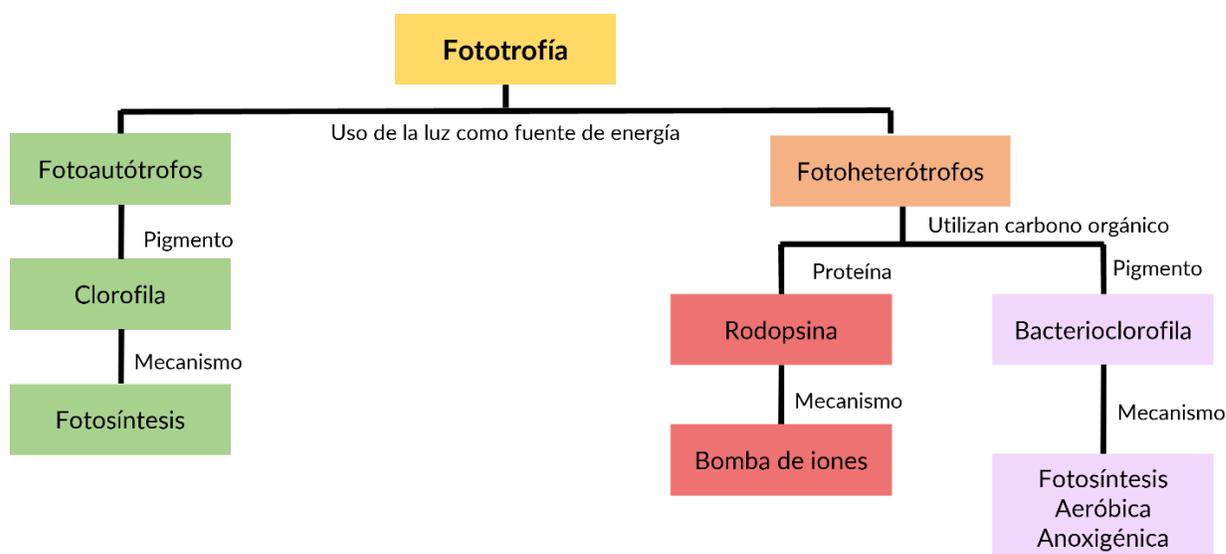
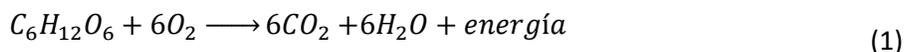


Figura 1. Tipos de fototrofia, pigmentos o proteínas para la utilización de luz y mecanismo empleado para transformar la luz en energía química.

1.1.1 Heterotrofia bacteriana

La heterotrofia implica la oxidación de materia orgánica (e.g. carbohidratos, aminoácidos, péptidos) para generar energía. La respiración es un proceso que forma parte del metabolismo heterotrófico y del cual se genera la mayor cantidad de energía en forma de ATP. La respiración microbiana ocurre a lo largo de la membrana periplasmática y se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de oxígeno (fermentación) (Bruslind, 2021). Esta tesis se enfoca en el estudio de la forma más común de la respiración, la cual utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. A continuación, se presenta una representación resumida de la respiración aeróbica mediante la oxidación de la glucosa:



En el metabolismo heterotrófico existen tres rutas importantes; la primera consiste en la glucólisis, que es la ruta catabólica (degradación de moléculas) de glucosa a piruvato, y se divide en dos partes. La primera requiere energía (2 ATP) para fosforilar la glucosa y la segunda genera energía (4 ATP) a partir de reacciones enzimáticas a nivel del sustrato; por cada molécula de glucosa se forman dos moléculas de piruvato y se obtienen dos moléculas netas de ATP; además se reduce NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleótido) a NADH (Prescott *et al.*, 2004; Bruslind, 2021).

La segunda ruta es el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs, donde el piruvato es oxidado a CO₂; en este ciclo se forman metabolitos precursores de otras rutas y en el transcurso suceden una serie de reacciones de oxidación y reducción, por ejemplo, NAD⁺ a NADH, FAD⁺ a FADH₂ (Flavín adenín dinucleótido) y GDP + Pi a GTP (Guanosín trifosfato) (Prescott *et al.*, 2004; Bruslind, 2021). El TCA genera reacciones en el sentido catabólico (oxidación de moléculas) o anabólico (síntesis de moléculas) conforme a las necesidades de la célula, se caracteriza por nueve reacciones desde la oxidación del piruvato hasta la formación de oxaloacetato (Figura 2) (Prescott *et al.*, 2004; Bruslind, 2021).

Algunas reacciones anabólicas dirigidas a la síntesis de compuestos orgánicos utilizan productos intermedios del TCA (e.g. oxaloacetato). Por lo tanto, para mantener el ciclo activo de manera continua, existen reacciones (anapleróticas) que reponen los productos intermedios a partir de la fijación de CO₂ (Prescott *et al.*, 2004; González *et al.*, 2011).

El transporte de electrones generado por el TCA en la membrana periplasmática provoca la síntesis de ATP a partir de la última ruta, la fosforilación oxidativa. Durante esta última etapa los protones libres migran hacia el periplasma y se acumulan de un lado de la membrana. Esto genera un potencial eléctrico por las diferencias de carga entre el espacio periplasmático (carga positiva) y citoplasma (carga negativa); el potencial eléctrico genera la fuerza protón motriz (FPM), la cual transporta protones al interior de la célula para mantener el equilibrio de carga.

Por último, la ATP sintetasa se activa con el transporte de los protones y fosforila el ADP + Pi a ATP (fosforilación oxidativa) (Prescott *et al.*, 2004; Bruslind, 2021). En teoría, la oxidación de la glucosa a CO₂ puede generar un máximo de 38 ATP. Sin embargo, no existe un cálculo exacto para las bacterias marinas,

debido a que el sistema de transporte de electrones puede variar entre phyla debido al tipo de metabolismo (heterotrófico, fotoheterotrófico).

La respiración forma parte del ciclo del carbono y juega un papel importante en la transferencia de energía a niveles tróficos más altos. Sin embargo, su estudio en miembros del bacterioplancton ha sido limitado principalmente por la dificultad de aislamiento y cultivo de bacterias marinas, además de la complejidad para reproducir los métodos de cuantificación y la sensibilidad (e.g. Winkler, optodos, fluorescencia "Redox Sensor Green") y el amplio rango de consumo de oxígeno que puede existir entre géneros (e.g. $0.001 - 10 \text{ fmol O}_2 \text{ cél}\cdot\text{h}^{-1}$) (Warkentin *et al.*, 2007; Munson-McGee *et al.*, 2022).

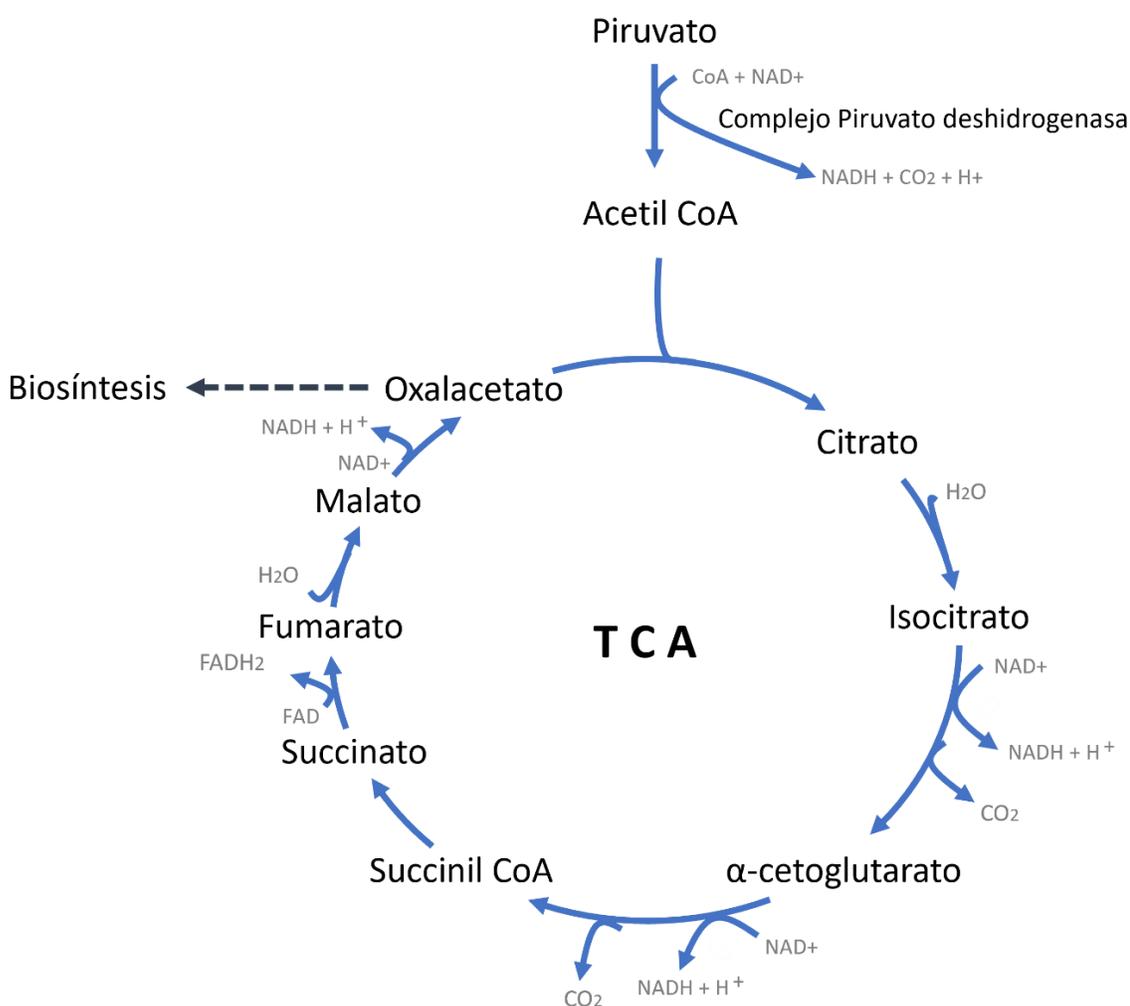


Figura 2. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Metabolitos principales en color negro; las reacciones de oxidación y reducción se muestran en color gris. El oxaloacetato es un producto intermedio que puede ser utilizado para biosíntesis celular. Modificado de Prescott *et al.*, 2004.

1.1.2 Rodopsinas

Las RD son una familia de proteínas transmembranales que están conformadas por una opsina (proteína de siete alfa hélices) con un aminoácido de lisina en su centro que se une de manera covalente al retinal (cromóforo) (Béjà *et al.*, 2000; Rozenberg *et al.*, 2021). Se dividen en dos clases, la clase I corresponde a las RD microbianas, la cual se subdivide en cuatro tipos: PR, xantorodopsinas, bacteriorodopsinas y halorodopsinas (Rozenberg *et al.*, 2021). Las proteínas de clase I, funcionan como bombas de iones o protones específicos, por ejemplo, H^+ , Cl^- , Na^+ (Béjà *et al.*, 2000; Pinhassi *et al.*, 2016; Rozenberg *et al.*, 2021). El rango de absorción puede variar de acuerdo con el tipo de luz en la columna de agua, como se ha mencionado anteriormente; este rango se encuentra entre el azul y el verde (490 – 530 nm). La clase II corresponde a las RD presentes en los ojos de animales, donde tienen una función sensorial para la detección de luz (Rozenberg *et al.*, 2021), aunque existen excepciones para algunas especies de diatomeas y dinoflagelados que cuentan con proteínas de la clase I (microbianas) (Yoshizawa *et al.*, 2015).

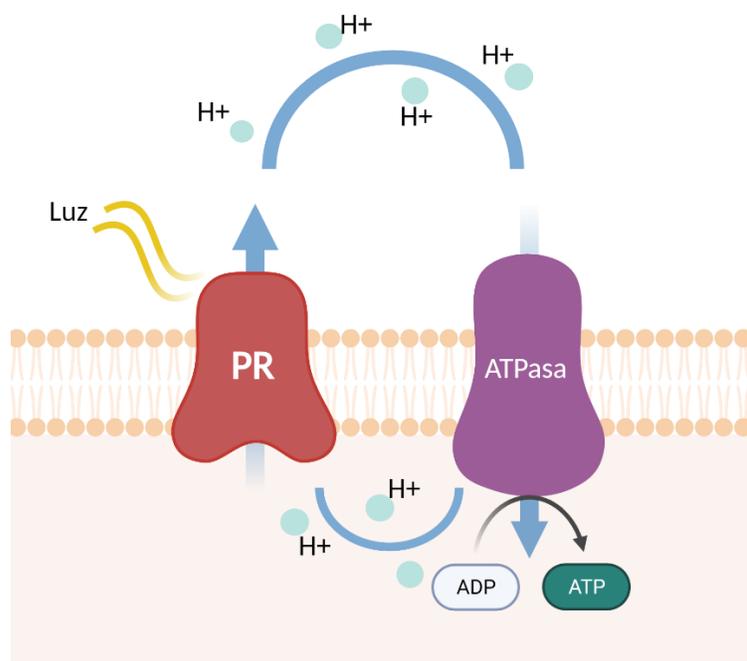


Figura 3. Mecanismo simplificado de las proteorodopsinas (PR). A partir de la captura de fotones se genera una fuerza protón-motriz en la membrana que activa la ATP sintasa. Membrana citoplasmática (interna), el espacio periplasmático corresponde al color blanco y el citoplasma al color naranja. Diagrama modificado de DeLong y Béjà (2010).

Se estima que alrededor del 80 % del procarioplanton posee PRs (Finkel *et al.*, 2013; Dubinsky *et al.*, 2017, Sieradzki *et al.*, 2018), las cuales funcionan como bombas de protones (H^+). La luz provoca la isomerización del retinal de 13-trans a 13-cis; a partir de la constante isomerización del retinal, las PR

movilizan protones del citoplasma hacia el espacio periplasmático (Figura 3) (Rozenberg *et al.*, 2021). El bombeo constante de protones genera un gradiente eléctrico que activa la FPM, de manera similar al generado al final del TCA.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Respiración y proteorodopsinas

Existen dos procesos que pueden generar la FPM en la célula; el transporte de electrones durante la respiración aeróbica y el bombeo de protones por la actividad de las PR. La FPM tiene distintas funciones dentro de la célula, entre los cuales se encuentran la síntesis de ATP, la absorción de nutrientes (transporte activo) y motilidad (deslizamiento) (Voet y Voet, 1995; Prescott *et al.*, 2004; Gómez-Consarnau *et al.*, 2016; Palovaara *et al.*, 2014). Hasta ahora, se han investigado algunas respuestas fisiológicas en cepas específicas con PR dentro de los phyla Bacteroidetes y Proteobacteria.

Las cepas fotoheterótrofas MED134 y DSW-1 pertenecientes al género *Dokdonia* (phylum Bacteroidetes) han mostrado un mejor crecimiento en condiciones de luz con respecto de oscuridad debido a la ventaja energética por el uso de las PR (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007, 2016). MED134 fue la primera cepa marina con PR en la que se observaron diferencias significativas en el crecimiento en condiciones de luz y baja disponibilidad de materia orgánica (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la mejora en su crecimiento en luz versus oscuridad incrementa en condiciones limitadas de carbono orgánico disuelto (COD; 0.14 mM C – 0.39 mM C) mientras que en concentraciones altas de COD (>1.1 mM C) se reduce la ventaja y no se observan diferencias en el crecimiento con respecto al uso de las PRs en condiciones de luz (Figura 4).

Se plantea la hipótesis de que en ambientes enriquecidos el COD es suficiente para cubrir los requerimientos energéticos y por esta razón no existe una ventaja significativa por el uso de las PR. En el caso contrario, al disminuir la disponibilidad del COD, la generación de energía a partir de las PR se vuelve más relevante para mantener los niveles energéticos y funciones de la célula (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007). El transporte activo de sustratos se divide en primario y secundario; el primero utiliza ATP (transportadores ABC) mientras que el segundo opera a través del gradiente de protones (transportadores TonB) (Bruslind, 2021; Gómez-Consarnau *et al.*, 2016).

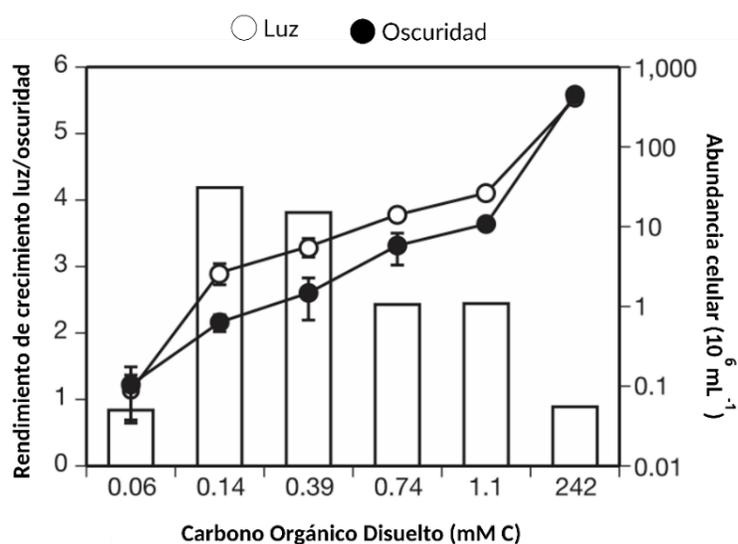


Figura 4. Rendimiento del crecimiento celular de *Dokdonia* sp. MED134 en luz vs. oscuridad en diferentes concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD); proporción de crecimiento luz/oscuridad (barras), abundancia celular (círculos). Gómez-Consarnau *et al.*, 2016.

En condiciones de luz *Dokdonia* sp. MED134 y DSW-1, han mostrado una mayor expresión de transportadores de tipo TonB específicos para la incorporación de tiamina (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016) (Figura 5). La tiamina es un cofactor orgánico que participa como catalizador de reacciones enzimáticas en el TCA (e.g. piruvato deshidrogenasa) (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha reportado que la FPM puede incrementar la motilidad por deslizamiento en las bacterias fotoheterótrofas (Walter *et al.*, 2007; Steindler *et al.*, 2011; Gómez-Consarnau *et al.*, 2016), sin embargo, aún no se ha evaluado este proceso celular de manera específica.

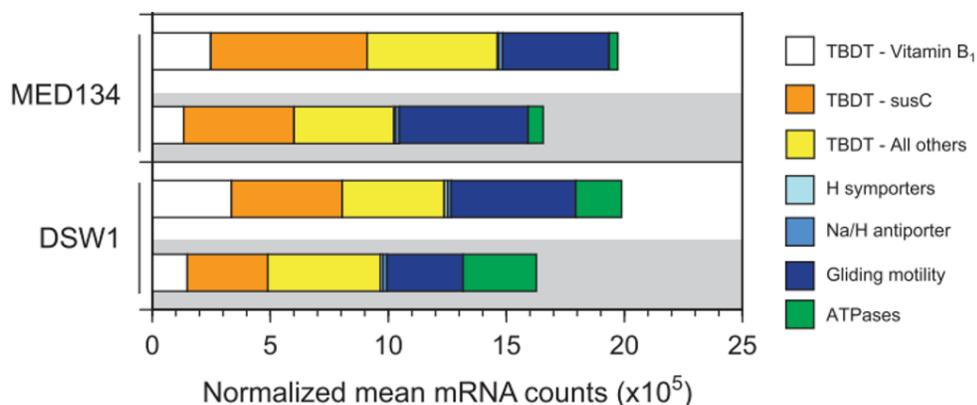


Figura 5. Nivel de expresión de genes correspondientes a procesos generados por la FPM en *Dokdonia* sp. MED134 y DSW-1. El tratamiento en luz muestra fondo blanco y en oscuridad se muestra con un fondo gris. Las muestras del transcriptoma se colectaron a las 120 h de la fase de crecimiento. Gómez-Consarnau *et al.*, 2016.

En el phylum Proteobacteria, se ha observado que las bacterias que utilizan PR tienen una mejor supervivencia en condiciones de inanición. En particular, la cepa *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 (clado SAR11), perteneciente a la clase Alphaproteobacteria, no muestra diferencias en el crecimiento en condiciones de luz versus oscuridad, pero presenta una disminución en la tasa de respiración durante la fase estacionaria del crecimiento en condiciones de luz y COD limitado (>80 h del cultivo; Figura 6). Por otro lado, en condiciones de oscuridad las PR se encuentran inactivas, así que las células dependen únicamente del COD disponible en el medio.

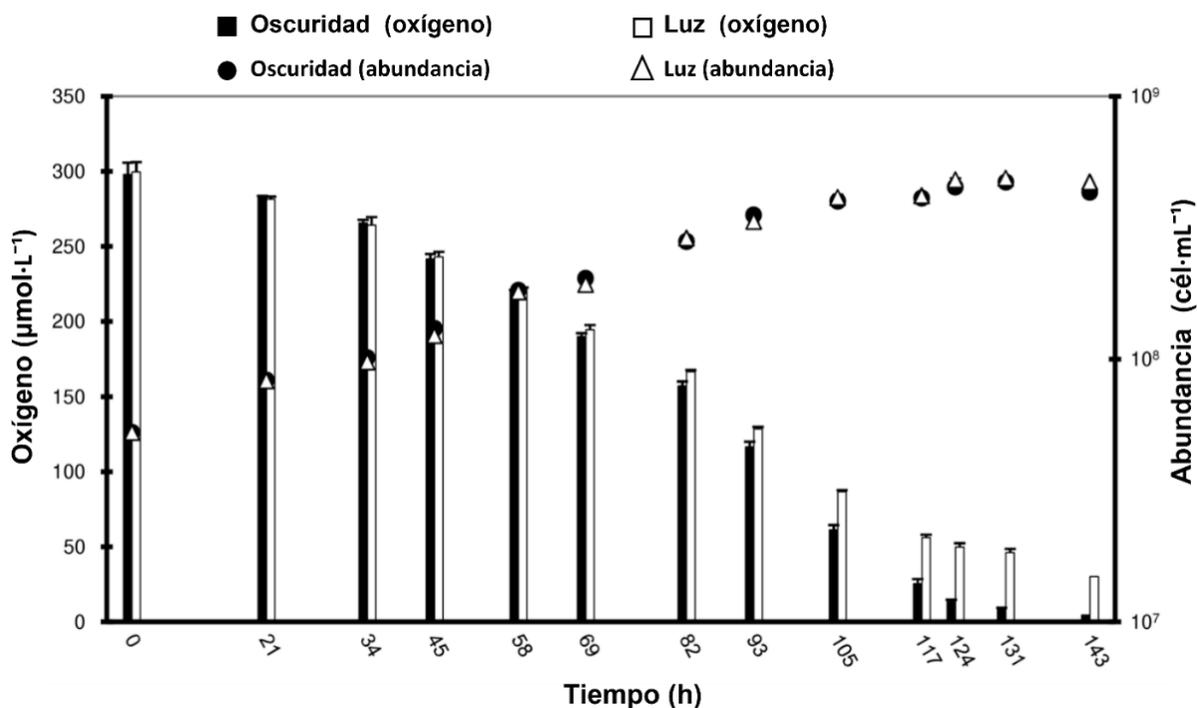


Figura 6. Respiración de *Candidatus Pelagibacter ubique* (SAR11) en condiciones limitadas de carbono. Concentración de oxígeno y densidad celular en cultivos en oscuridad constante (barras y círculos negros) y luz: oscuridad (12:12 h); barras y triángulos en blanco. Steindler *et al.*, 2011.

Cuando el COD se vuelve limitante, *Candidatus Pelagibacter ubique* comienza a consumir sus propios recursos mediante respiración endógena, provocando que a partir del segundo día de la fase estacionaria la célula empiece a disminuir su tamaño ($\approx 0.014 \mu\text{m}^3$) y metabolizar lípidos de la membrana que causan que la célula se deforme con el tiempo (Figura 7G) (Steindler *et al.*, 2011). Esta cepa del clado SAR11 ha mostrado una mayor eficiencia de transporte activo de taurina (65 % más alta con respecto al consumo en oscuridad) gracias al uso de las PR. En cuanto a los niveles de energía, se ha observado que HTCC1062 presenta un incremento de ATP (17.4 ± 5.1 %) a partir de 5 minutos de exposición a la luz, y este porcentaje aumenta a medida que avanzan los días en fase estacionaria (51.1 ± 11.1 %).

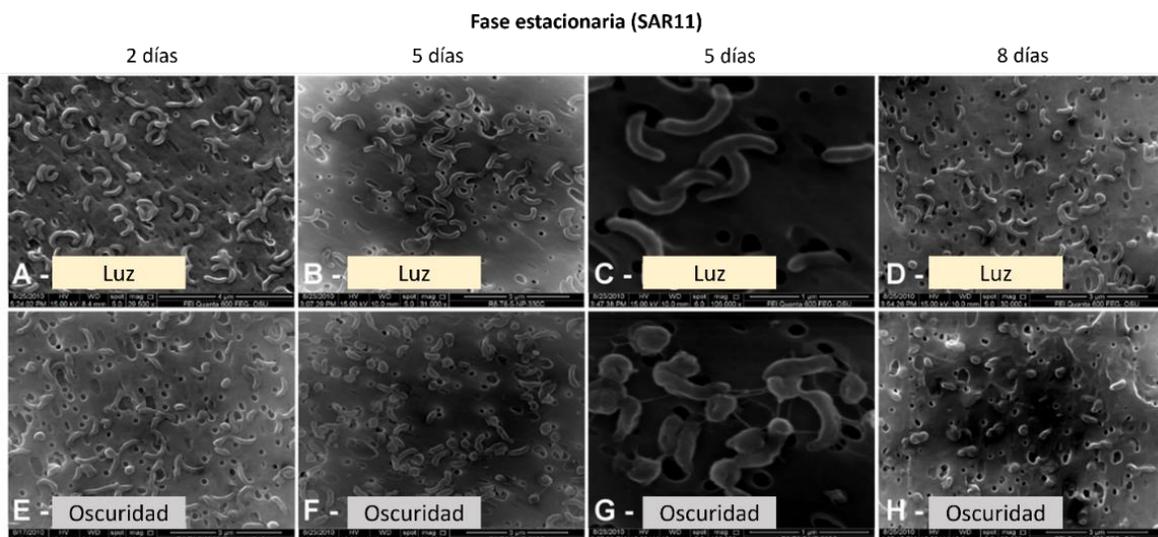


Figura 7. Morfología de SAR11 durante la fase estacionaria en condiciones de inanición. Cultivos en condiciones constantes de luz ($70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u oscuridad. Los días en la parte superior indica los días transcurridos en la fase estacionaria, las fotos correspondientes a 5 días de crecimiento se muestran en dos ampliaciones ($\approx 30000\times$ (B y F) y $105000\times$ (C y G)). Modificado de Steindler *et al.*, 2011.

1.3 Justificación

La zona fótica del océano constituye una región de transformación de energía donde los organismos fotosintéticos y las bacterias juegan un papel esencial. Aunque se estima que alrededor del 50 – 90 % de la producción primaria es mineralizada (Hernández de la Torre y Gaxiola Castro, 2007), aún no se ha evaluado el impacto potencial de la fotoheterotrofia en el flujo del carbono. Por lo tanto, es necesario caracterizar la fisiología de bacterias fotoheterótrofas para entender su impacto en la mineralización y la transferencia de energía en los océanos. Por otro lado, la fototrofia mediante PRs está ampliamente distribuida en el procarioplanton (Finkel *et al.*, 2013; Dubinsky *et al.*, 2017; Sieradzki *et al.*, 2018), por lo cual estudiar estos flujos en cepas de bacterioplanton en cultivos de laboratorio puede ayudar a comprender las posibles ventajas de esta fototrofia en miembros de las comunidades microbianas marinas.

1.4 Hipótesis

En condiciones de luz y limitación de carbono orgánico disuelto, las PRs generan la fuerza protón-motriz que permite activar la síntesis de ATP y transporte de sustratos a través de la membrana. Esto, combinado con la respiración, permite a las bacterias obtener una mayor cantidad energía en forma de

ATP. Por otro lado, en condiciones de oscuridad las bacterias no tienen la capacidad de activar las PR. Por lo que dependen únicamente del carbono orgánico disuelto en el medio, lo que se vería reflejado en una mayor tasa de respiración para obtener los recursos necesarios para la obtención de energía y biomasa.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar la fisiología de la cepa de *Dokdonia* MED134 en condiciones de limitación de carbono orgánico, en presencia como en ausencia de luz.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la capacidad de crecimiento y las tasas de crecimiento en luz y oscuridad en una concentración de carbono orgánico de 0.39 mM C.
- Calcular las tasas de respiración a partir del consumo de oxígeno durante la fase exponencial y estacionaria en luz y oscuridad, durante su crecimiento en un medio enriquecido con 0.39 mM C.
- Cuantificar los niveles de ATP celular mediante la técnica de bioluminiscencia en condiciones de luz y oscuridad, durante el crecimiento en un medio enriquecido con 0.39 mM C.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Descripción de la cepa

Dokdonia sp. MED134 es una bacteria marina Gram-negativa perteneciente al phylum de los Bacteroidetes y orden de los flavobacteriales (González *et al.*, 2011; Gasol y Kirchman, 2018). Los flavobacteriales se caracterizan por su eficiencia en la degradación de materia orgánica compleja y su amplia distribución en las comunidades del procarioplancton (González *et al.*, 2011).

La cepa de MED134 fue aislada en el 2007 de muestras de agua de mar superficial (0.5 m) del mar Mediterráneo (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011). El genoma de MED134 ha sido secuenciado (tamaño: 3 301 953 pb) y se ha reportado la presencia de genes de PR como parte de su metabolismo fototrófico (fotoheterotrófico). Los análisis genómicos confirman su metabolismo heterotrófico (aerobio obligado), por lo que no posee ningún mecanismo para el crecimiento autotrófico (González *et al.*, 2011).

2.2 Preparación del cultivo

La preparación del cultivo se llevó a cabo siguiendo la metodología de Gómez-Consarnau y colaboradores (2016), como se describe a continuación (Figura 8).

2.2.1 Siembra y cultivo inicial

Se realizó la siembra a partir de un stock del cultivo (glicerol 50 %) mantenido a -80 °C. Se inoculó una placa de agar (Zobell) y se incubó durante siete días a temperatura ambiente (Figura 8); en el octavo día se transfirió una colonia a 50 mL de medio líquido Zobell estéril (Tabla 3, Anexos) donde se dejó crecer durante cinco días. En el quinto día mediante el uso de microscopía de epifluorescencia se cuantificó la abundancia bacteriana (2.97×10^7 cél·mL⁻¹).

2.2.2 Cultivo intermedio

En el quinto día se tomó una muestra del cultivo inicial y se diluyó 1:1000 en un cultivo intermedio que consistía únicamente en agua de mar filtrada (0.2 μm , Sterivex) estéril. El medio consistió en agua de mar, con el fin de disminuir de los cultivos previos los residuos de carbono del medio Zobell, así como para diluir la abundancia bacteriana, el cultivo intermedio se mantuvo durante tres días (Figura 8).

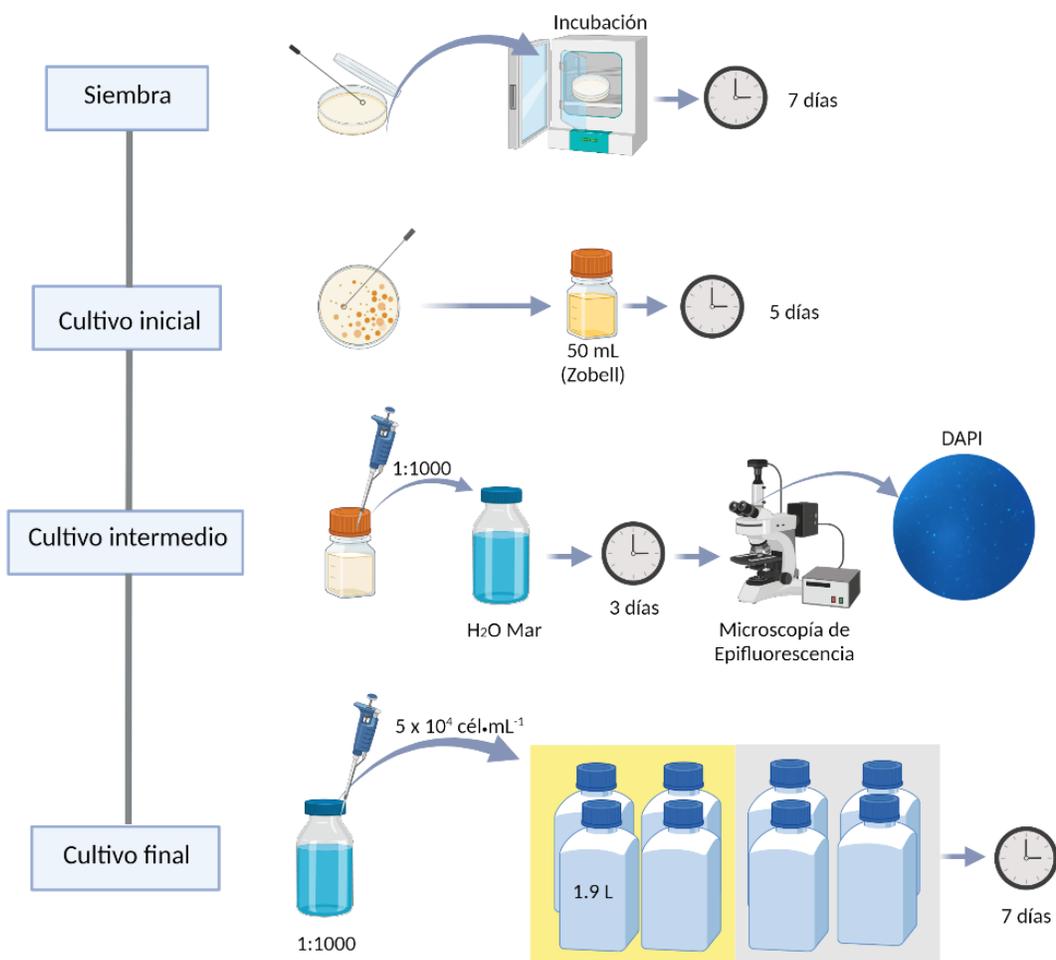


Figura 8. Diseño experimental desde la siembra hasta el cultivo final.

2.2.3 Cultivo final

En botellas de policarbonato de 1.9 L se agregó el medio, el cual consistió en agua de mar prefiltrada (0.2 μm , Sterivex) y una dilución de Zobell (Peptona, extracto de levadura) para la obtención de una concentración final de 0.39 mM C. Además, se añadieron como nutrientes inorgánicos 2.1 μM NH_4Cl y 0.3 μM Na_2HPO_4 en exceso con el fin de evitar otro tipo de limitación distinta al carbono o la luz y

únicamente observar la variabilidad del crecimiento, respiración y ATP, respecto a estas fuentes de energía. Se inocularon cada una de las botellas con una concentración inicial de 5×10^4 cél·mL⁻¹. Se utilizaron 4 réplicas de luz y 4 réplicas en oscuridad (Figura 8), en condiciones controladas de temperatura ($18 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) y luz (promedio $130 \pm 50 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para simular las condiciones de oscuridad, las botellas se cubrieron con una capa de papel de aluminio y otra de plástico negro. El cultivo final se mantuvo durante siete días, y se describen los detalles experimentales a continuación.

2.3 Crecimiento bacteriano

Se evaluó el crecimiento de MED134 durante siete días. Cada día se tomaron 10 mL de cada réplica (botella) y de cada condición (luz, oscuridad) a la misma hora (11 am) y se fijaron con 200 μL de formalina (formaldehído a concentración final 0.72 %). Una vez fijadas las muestras, se mantuvieron en refrigeración (5 °C) hasta su procesamiento en el laboratorio. La preparación de la placa de microscopía se realizó siguiendo el método descrito por Villegas y colaboradores (2022). Se colocó un filtro de microfibras de vidrio GF/C (diámetro: 25 mm; $1.2 \text{ } \mu\text{m}$ tamaño de poro Whatman) en la base del embudo para dar soporte y se agregaron gotas de agua destilada para humedecer el filtro, después se colocó un filtro de policarbonato negro (diámetro: 25 mm, tamaño de poro: $0.2 \text{ } \mu\text{m}$; Whatman) y se colocó el embudo (Figura 9).

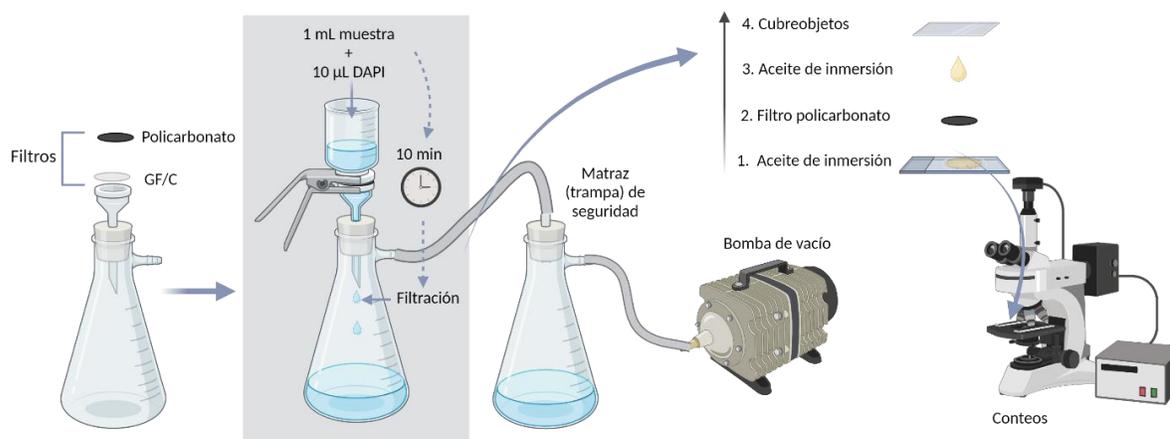


Figura 9. Preparación de placas con marcador fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para conteos mediante microscopía de epifluorescencia. El cuadro gris representa el tiempo que se mantuvo en oscuridad.

Para analizar 1 mL de muestra, se agregaron 20 μL del marcador fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol; Sigma – Aldrich #D9542) a una concentración de $10 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; se incubó en oscuridad de 10 a 15 min. Transcurrido ese tiempo, se filtró la muestra y se colocó en un portaobjetos con aceite de

inmersión (índice de refracción: 1.515; Olympus). Los recuentos de abundancia se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (ZEISS, Axiostar plus, 50W) procurando tener como mínimo 30 células por campo y contar al menos 20 campos, para reducir la varianza entre muestras (Kirchman et al., 1982).

2.4 Tasas de respiración

2.4.1 Cuantificación de oxígeno

Antes del experimento se prepararon las botellas B.O.D. (“Biological Oxygen Demand”), las cuales se mantuvieron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2 % durante 3 días para eliminar cualquier residuo de materia orgánica. Posteriormente, se enjugaron con agua destilada. La concentración de oxígeno se midió con el uso del equipo PreSens (Fibox 4) y optodos (sensores ópticos, diámetro 0.5 cm, PSt3) incorporados dentro de las botellas (Figura 10). Durante el experimento se realizaron tres enjuagues de la botella B.O.D. con aproximadamente 20 mL del medio de cultivo. En un ambiente estéril se vertieron aproximadamente 150 mL del medio de cultivo final a la botella B.O.D. de manera lenta y constante para evitar generar burbujas. Una vez que se alcanzó el volumen máximo de la botella, se colocó el tapón e inmediatamente se realizó la medición del oxígeno disuelto (μM).

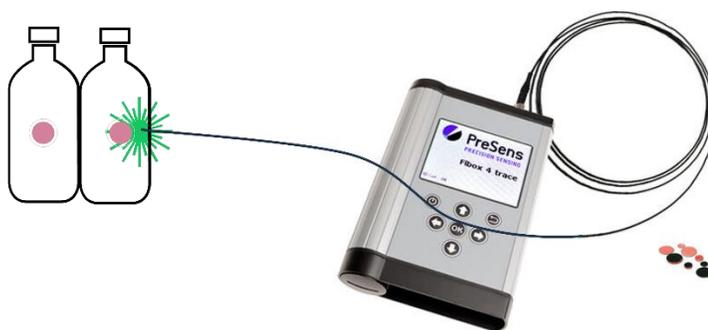


Figura 10. Representación de la cuantificación de la concentración de oxígeno con el equipo PreSens (Fibox 4).

Las tasas de respiración se calcularon durante dos momentos durante de la curva de crecimiento de MED134, uno a las 72 horas (fase estacionaria) y otro a las 120 horas (fase estacionaria). Se midió el oxígeno disuelto cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos del experimento. Posteriormente, cuando el consumo de oxígeno se mantuvo menos variable, se empezó a medir cada hora. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada condición (luz, oscuridad). El experimento en la fase

exponencial tuvo una duración total de ocho horas y en la fase estacionaria el tiempo de cuantificación fue de dos horas, ya que después de este punto la tasa de respiración disminuyó considerablemente (e.g. consumo $1 \mu\text{M O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$).

2.4.2 Cálculo de tasas de consumo de oxígeno

Las tasas de consumo de oxígeno en muestras ambientales se calculan utilizando un modelo de regresión lineal. El consumo se determina a partir de la pendiente de una recta (Ec. 2), considerando la variable independiente (x) como el tiempo y la dependiente como el oxígeno (y). Al derivar esta ecuación con respecto del oxígeno se obtiene la tasa de cambio del oxígeno (m) en función del tiempo. En muestras ambientales el consumo de oxígeno del bacterioplancton suele ajustarse bien a esta función, debido a que las tasas de respiración suelen ser bajas y se mantienen relativamente constantes (Warkentin *et al.*, 2007); por lo tanto, a partir de la derivada de esta ecuación se calcula fácilmente la tasa de consumo.

$$y = mx + b \rightarrow y' = m \quad (1)$$

2.4.3 Tasa de consumo de O_2 por célula

Una vez calculada la tasa de consumo de oxígeno ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), se procedió a calcular el consumo por célula (Ec. 3). A partir de las abundancias ($\text{cél} \cdot \text{L}^{-1}$) en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria.

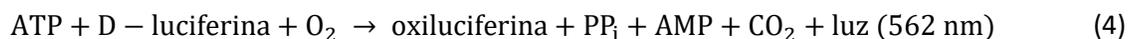
$$\frac{\mu \text{ mol } \text{O}_2}{\text{L} \cdot \text{min}} \left(\frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}} \right) = \frac{60 \cdot \mu \text{ mol } \text{O}_2}{\text{L} \cdot \text{h}} \left(\frac{\text{L}}{\text{cél}} \right) = \frac{60 \cdot \mu \text{ mol } \text{O}_2}{\text{cél} \cdot \text{h}} \quad (3)$$

2.5 Determinación de niveles de ATP

Las muestras para la determinación de los niveles de ATP se colectaron durante la fase exponencial (72 h) y estacionaria (120 h) del cultivo final. Se realizó un análisis donde se determinó la concentración de ATP empleando el método de bioluminiscencia (Kit ATP HS II, Sigma-Aldrich) y un luminómetro (hygiena, ENSURE).

2.5.1 Método de bioluminiscencia

Este método se basa en la producción de luz por parte de la enzima luciferasa utilizando ATP (Lomakina *et al.*, 2015). La cantidad del ATP se cuantifica considerando que la emisión de luz es directamente proporcional a la cantidad de ATP en presencia de la luciferasa (Lomakina *et al.*, 2015; Sigma-Aldrich, 2021). La cantidad de luz que se genera durante la reacción es detectada por el luminómetro; el equipo integra la cantidad de luz (1 – 15 s) y a partir de este cálculo se determinan las Unidades Relativas de Luz (RLU). Posteriormente, utilizando una curva de calibración se determina la cantidad de ATP (M) en la muestra. La reacción se simplifica de la siguiente forma:



Donde:

ATP: Adenosín trifosfato

D – luciferina: luciferasa

O₂: Oxígeno

Oxiluciferina: Producto de la oxidación de la luciferina/luciferasa

PP_i: Pirofosfato inorgánico

AMP: Adenosín monofosfato

CO₂: Dióxido de carbono

Los reactivos para el análisis de bioluminiscencia corresponden al kit comercial “ATP Kit High Sensitive II” (Sigma-Aldrich). Se utilizó el reactivo de la luciferasa (*Photinus pyralis*), el estándar de ATP, y el buffer de lisis (EDTA 4 mM y Tris 100 mM, pH 7.76), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit es ampliamente utilizado para la cuantificación de ATP de alta sensibilidad en muestras microbianas (10⁻⁵ y 10⁻¹² M ATP) (Sigma-Aldrich, 2021).

2.5.2 Cuantificación de ATP en los cultivos

Para la determinación de ATP en los cultivos, se utilizaron 2 filtros de cartucho Sterivex de 0.2 μm (cada condición luz/oscuridad) dónde se había filtrado 1 L de cultivo final. Para remover el cartucho del

filtro, con unas pinzas se rompió el empaque por un extremo de la cápsula y con unas pinzas de disección estériles se extrajo el filtro completo e intacto. Después con una navaja se recortaron los extremos del filtro y este se colocó en un tubo Falcon con 5 mL (para que todo el filtro quedara inmerso) de buffer (EDTA 4 mM y Tris 100 mM, pH 7.76). Se colocó este tubo en agua hirviendo durante 2 minutos y seguidamente en hielo. De cada tubo falcon se transfirió 1 mL a un tubo eppendorf, que se centrifugó a 13 000 g durante un minuto y medio. La muestra se mantuvo en hielo hasta su lectura. Se transfirieron 50 μ L del sobrenadante a un vial de cristal (especial para el luminómetro) y se adicionaron 50 μ L del reactivo de la luciferasa. Una vez agitado el vial se colocó en luminómetro y se registró la lectura. El procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra (Figura 11).

2.5.3 Curva de calibración

Para determinar la concentración de ATP se realizó una curva de calibración (Figura 12) con el mismo buffer de lisis (EDTA 4 mM y Tris 100 mM, pH 7.76) y el estándar de ATP del kit; se realizaron 10 diluciones del estándar de ATP (Tabla 1) y se registraron las unidades relativas de luz (RLU) del luminómetro. Se iniciaron las mediciones del RLU a partir de la sexta dilución, debido a que, a partir de esa dilución se encontraba el rango de valores de las muestras (cultivo) previamente evaluadas.

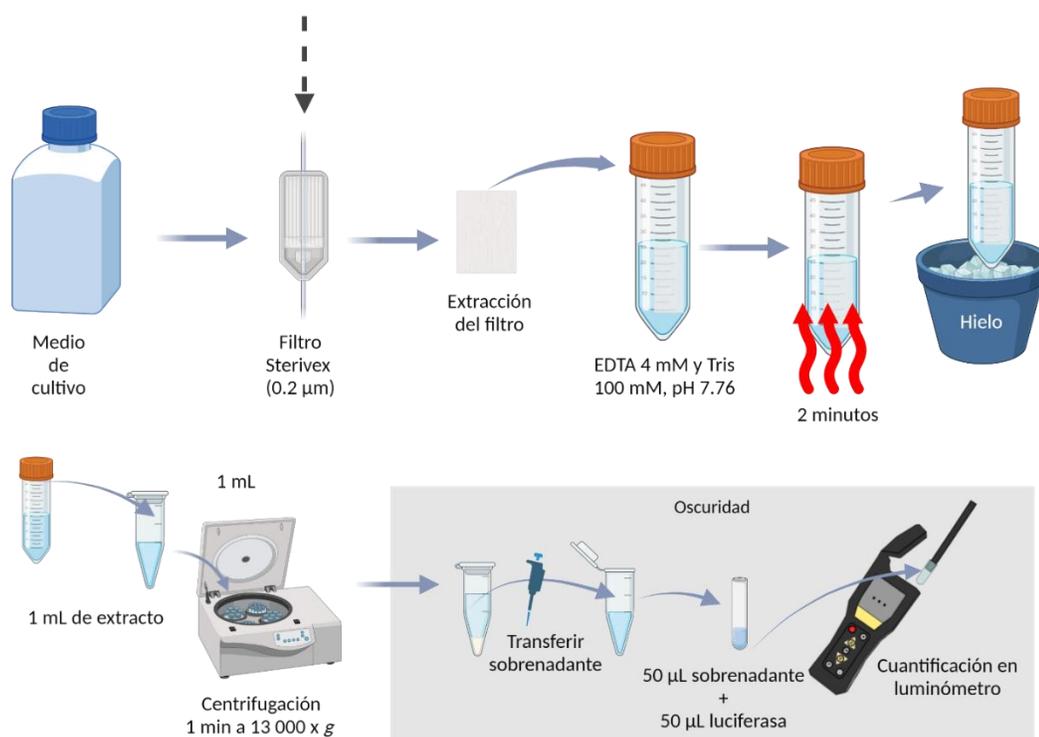
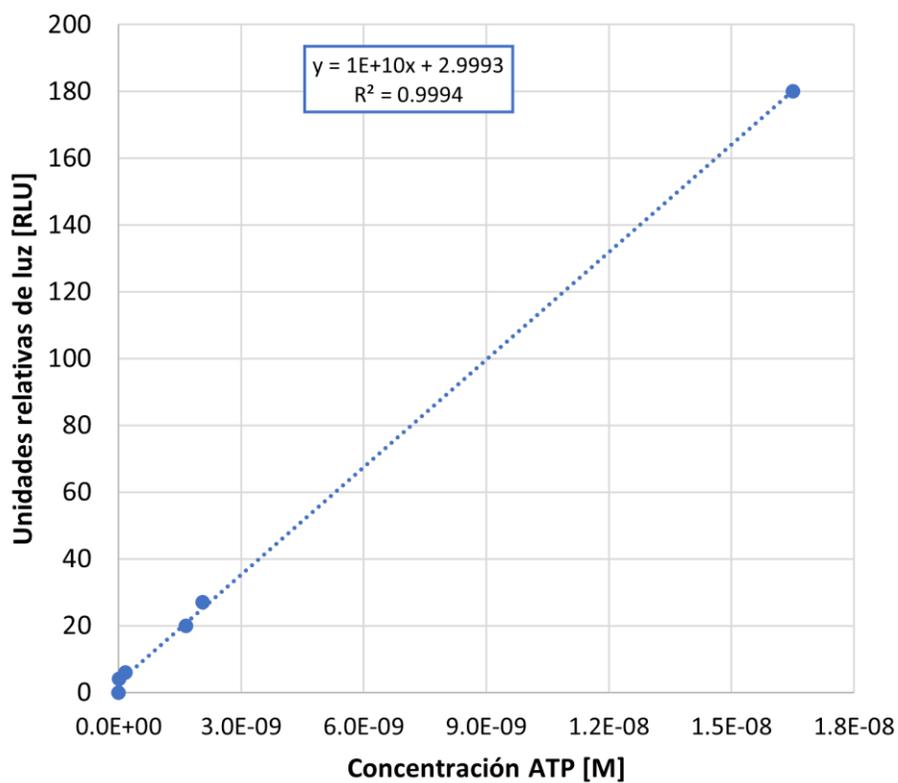


Figura 11. Método de extracción y cuantificación de ATP en muestras del cultivo final. El procedimiento se repitió durante las 72 h y 120 h.

Tabla 1. Diluciones correspondientes a la curva de calibración de ATP.

# Dilución	Concentración ATP [M]	Unidades Relativas de luz [RLU]
Stock	1.65E-02	-
1	1.65E-03	-
2	1.65E-04	-
3	1.65E-05	-
4	1.65E-06	-
5	1.65E-07	-
6	1.65E-08	180
6.1	2.06E-09	27
7	1.65E-09	20
8	1.65E-10	6
9	1.65E-11	4
10	1.65E-12	0

**Figura 12.** Curva de calibración de ATP.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización del crecimiento

Durante el desarrollo de los cultivos de *Dokdonia* sp. MED134 no se observaron cambios visibles en las botellas que indicaran crecimiento significativo, como cambio de color o turbidez del medio de cultivo en las botellas en condición de luz u oscuridad. Asimismo, los conteos por microscopía mostraron abundancias similares durante las 24 y 48 h en ambas condiciones. Sin embargo, a las 72 h se observaron diferencias en el crecimiento, con densidad celular de 5.15×10^5 cél·mL⁻¹ en condiciones de luz y 3.86×10^5 cél·mL⁻¹ en oscuridad (Figura 13, Tabla 2).

La máxima abundancia bacteriana se alcanzó en condiciones de luz a las 120 h (fase estacionaria) con una abundancia de 6.42×10^5 cél·mL⁻¹. En condiciones de oscuridad, el máximo se presentó a las 72 h (fase exponencial) con 3.86×10^5 cél·mL⁻¹ y se mantuvo constante hasta las 120 h. Después de este punto, se observó un declive en la abundancia a las 144 h, indicando que las bacterias han dejado de crecer y se encuentran en la última fase (muerte).

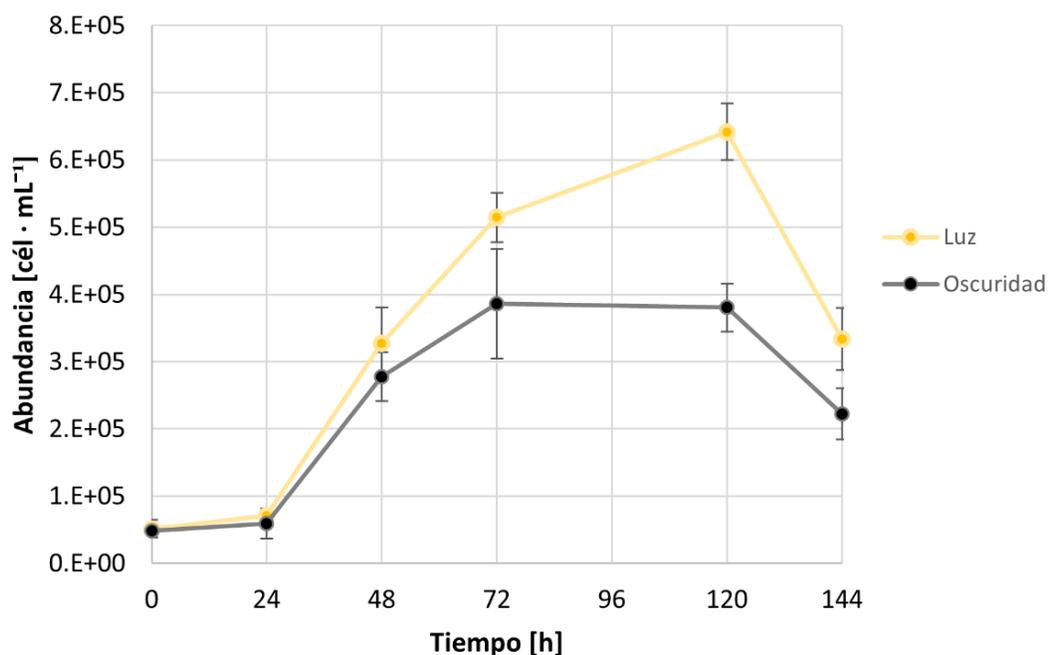


Figura 13. Promedios y desviación estándar de la abundancia bacteriana (triplicados) de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz (amarillo) y oscuridad (negro). No se determinó la abundancia a las 96 h debido a problemas técnicos. Características del medio; concentración de carbono orgánico inicial (0.39 mM C, Zobell), luz continua ($130 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura ($18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabla 2. Resultados de los conteos celulares por microscopía de epifluorescencia correspondientes a la curva de crecimiento de *Dokdonia* sp. MED134.

Tiempo (h)	Condición Luz (L)/Oscuridad (O)	Abundancia (cél·mL ⁻¹)	Desviación estándar
0	L	5.13 x 10 ⁴	1.34 x 10 ⁴
0	O	4.85 x 10 ⁴	5.54 x 10 ³
24	L	7.13 x 10 ⁴	4.71 x 10 ³
24	O	5.92 x 10 ⁴	2.24 x 10 ⁴
48	L	3.28 x 10 ⁵	5.33 x 10 ⁴
48	O	2.77 x 10 ⁵	3.64 x 10 ⁴
72	L	5.15 x 10 ⁵	3.65 x 10 ⁴
72	O	3.86 x 10 ⁵	8.14 x 10 ⁴
120	L	6.42 x 10 ⁵	4.20 x 10 ⁴
120	O	3.80 x 10 ⁵	3.56 x 10 ⁴
144	L	3.34 x 10 ⁵	4.60 x 10 ⁴
144	O	2.22 x 10 ⁵	3.82 x 10 ⁴

3.2 Tasas de respiración

En cuanto a las tasas de respiración, se realizaron ensayos tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria del crecimiento. La fase exponencial (72 h) se realizó durante aproximadamente seis horas en condiciones de luz y oscuridad (Figuras 22 y 23, Anexos). En la fase estacionaria sólo se midió durante dos horas (Figuras 24 y 25, Anexos). Sin embargo, para el cálculo de las tasas de respiración, sólo se consideró del minuto 10 al 50 por ser este el rango que mostró un mejor ajuste lineal a la ecuación para determinar la tasa de respiración por réplica ($\mu\text{mol O}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) y por célula ($\mu\text{mol O}_2\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Los primeros diez minutos de la medición se omitieron debido al tiempo que tomo que la señal de oxígeno se estabilizara en el medio.

Durante la primera hora de la fase exponencial en condiciones de luz, la concentración de oxígeno disminuyó un 7 % mientras que en oscuridad la concentración de oxígeno disminuyó alrededor del 5 % con respecto de la concentración inicial. La temperatura durante esta etapa se mostró una disminución de 0.1 °C del minuto diez hasta el 60, de 17.6 a 17.5 °C. En esta etapa de crecimiento, se observa una mayor variabilidad del consumo de oxígeno en condiciones de luz, en estas réplicas se obtuvo una regresión lineal

(R^2) entre 0.80 a 0.88 (Figura 14); mientras que en oscuridad las réplicas fueron más similares entre sí y se ajustaron mejor al modelo con valores de $R^2 = 0.88$ a 0.94 (Figura 15).

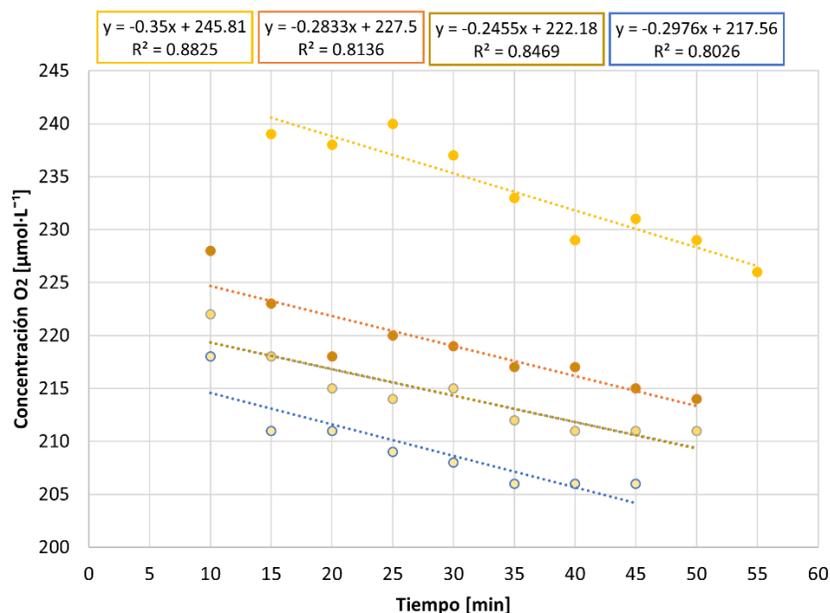


Figura 14. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O_2 vs. tiempo con tendencia lineal en la fase exponencial de cuatro réplicas de luz (72 h).

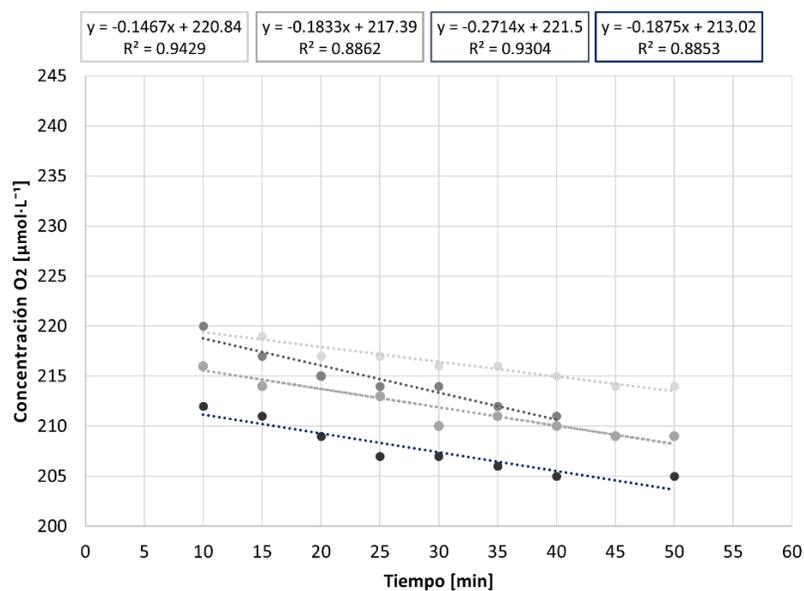


Figura 15. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O_2 vs. tiempo con tendencia lineal en la fase exponencial de cuatro réplicas de oscuridad (72 h).

En la fase estacionaria se observaron diferencias en la densidad celular y en las tasas de respiración entre ambas condiciones. Los cultivos en condiciones de luz mostraron la abundancia bacteriana más alta ($6.25 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 13) y el consumo de oxígeno mostró una tendencia lineal de disminución (Figura 16) con respecto a la fase exponencial. La temperatura durante esta etapa tuvo una disminución de $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ del minuto diez hasta el 60, de 18 a $17.8 \text{ }^\circ\text{C}$. En oscuridad la abundancia bacteriana se mantuvo en el mismo rango de $3.8 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ pero se observó un incremento en la tasa de respiración (Figura 18). En ambas condiciones se observó un mejor ajuste lineal con valores mayores a 0.87 (R^2) (Figura 16 y 17).

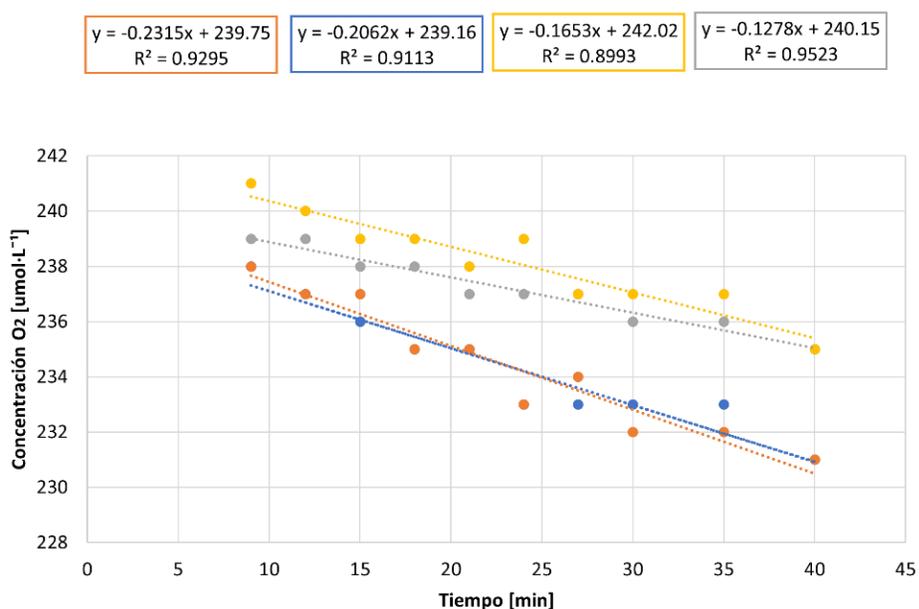


Figura 16. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O_2 vs. tiempo con tendencia lineal en la fase estacionaria (120 h) de cuatro réplicas de luz.

Durante la fase de crecimiento exponencial la tasa de respiración celular en luz fue ligeramente menor ($5.41 \times 10^{-10} \text{ } \mu\text{mol O}_2\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) en comparación con la de oscuridad ($5.96 \times 10^{-10} \text{ } \mu\text{mol O}_2\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). En la fase correspondiente a la estacionaria, la tasa de respiración celular en luz disminuyó ($2.77 \times 10^{-10} \text{ } \mu\text{mol O}_2\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) mientras que en oscuridad incrementó ($6.69 \times 10^{-10} \text{ } \mu\text{mol O}_2\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figura 18). Estos resultados sugieren que en condiciones de oscuridad las bacterias presentan mayor actividad por la oxidación de compuestos orgánicos, mientras que en condiciones de luz, las bacterias reducen su consumo de carbono a lo largo del tiempo y posiblemente a la disponibilidad de otros recursos (e.g. tiamina).

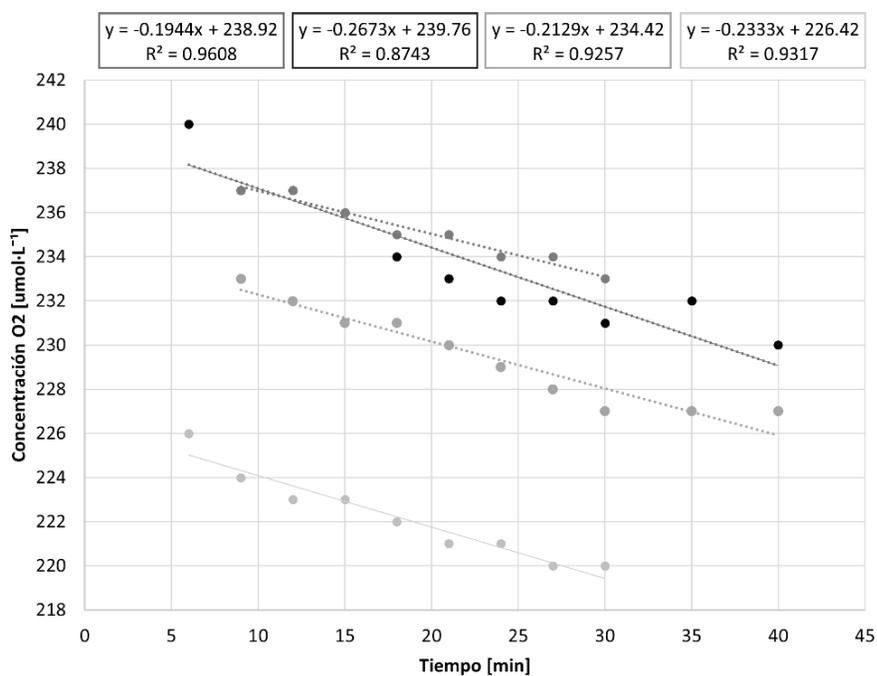


Figura 17. Tasas de respiración obtenidas a partir de las regresiones lineales de la concentración de O₂ vs. tiempo con tendencia lineal en la fase estacionaria (120 h) de cuatro réplicas de oscuridad.

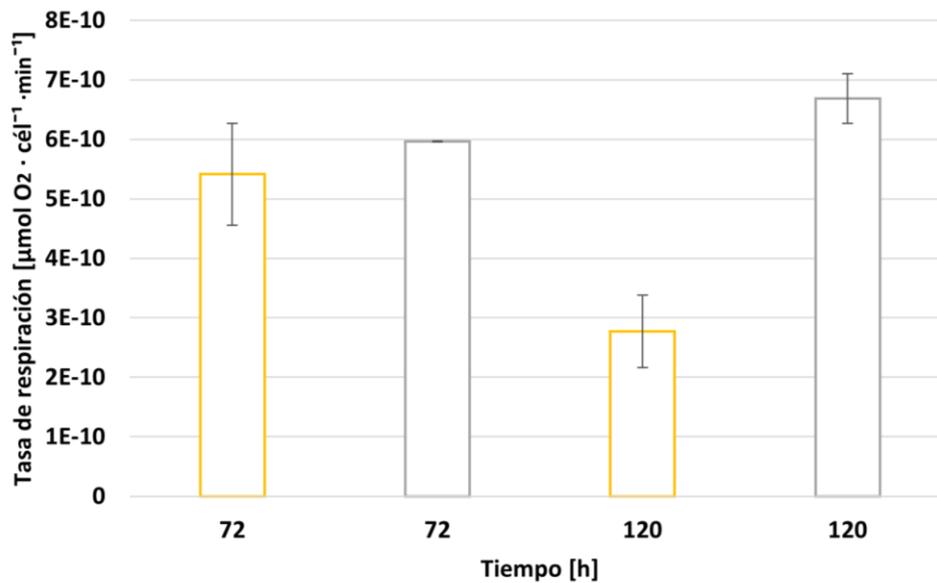


Figura 18. Tasa de respiración celular en la fase exponencial (72 h) y estacionaria (120 h) del crecimiento de MED134 en condiciones de luz (barra amarilla) y oscuridad (barra gris). Las barras en el centro indican la desviación estándar de duplicados.

3.3 Niveles de ATP celular

Los niveles del ATP celular se calcularon en atogramos (ag), un atogramo es equivalente a 10^{-18} g. En la fase exponencial se observaron niveles más altos de ATP celular para los tratamientos de oscuridad ($45 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$) en comparación con los tratamientos de luz ($15 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$), respaldando la hipótesis de que las bacterias contarían con mayor energía por el uso de las PR. Sin embargo, en la fase estacionaria se observó un marcado decremento en los niveles de ATP, de $40 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$ en condiciones de oscuridad y de $4 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$ en condiciones de luz (Figura 19). Estos resultados sugieren que en la fase exponencial (72 h) la respiración parece ser más eficiente en condiciones de oscuridad con la misma cantidad de sustrato. Sin embargo, tras transcurrir el tiempo de cultivo hasta la fase estacionaria (120 h) la respiración se vuelve más eficiente en condiciones de luz.

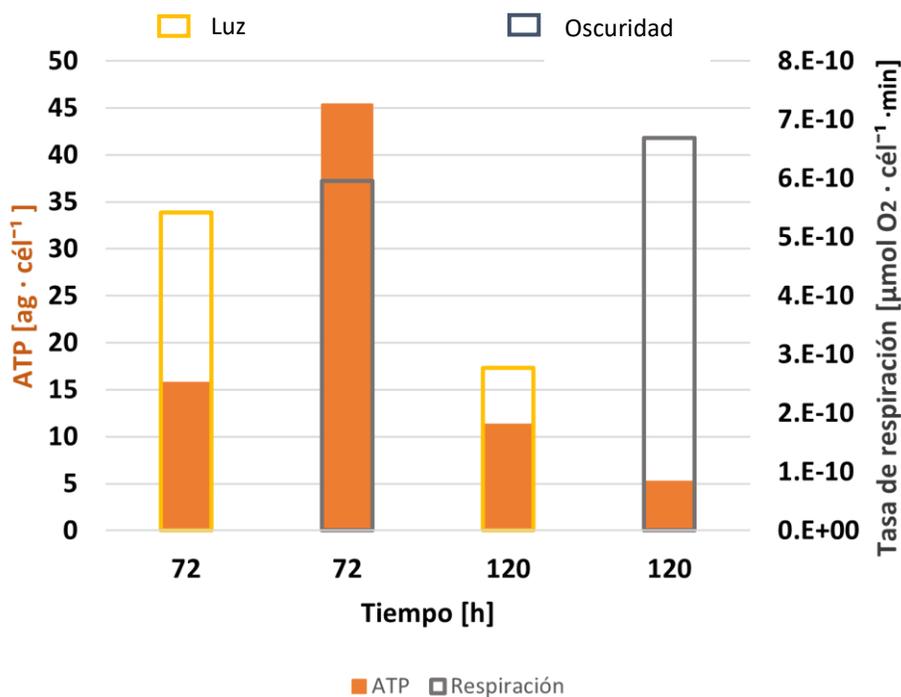


Figura 19. Niveles de ATP y tasas de respiración de MED134 durante las fases de crecimiento exponencial (72 h) y estacionaria (120 h). El ATP corresponde a las barras naranjas y la respiración a las barras sin fondo. Los niveles de ATP se muestran en atogramos (ag) que es equivalente a 10^{-18} g

Capítulo 4. Discusión

4.1 Crecimiento

El crecimiento de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz se extendió hasta el quinto día (120 h) y luego disminuyó en el sexto día (144 h). Aunque las tasas de crecimiento disminuyeron entre las 72 y 120 horas, no se distinguió claramente el inicio de la fase estacionaria en la curva de crecimiento, lo cual concuerda con estudios previos de la cepa MED134 (Figura 21; Anexos). En próximos estudios se recomienda coleccionar muestras de abundancia cada 12 horas con el fin de obtener una mejor resolución de las fases de crecimiento con respecto del tiempo. En condiciones de luz y bajo contenido de COD (0.39 mM C) MED134 alcanzó un mayor nivel de biomasa con respecto de los cultivos de oscuridad desde el tercer hasta el último día del cultivo, como se había reportado anteriormente (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007, 2016). En este experimento se obtuvo una abundancia máxima de 6.42×10^5 cél·mL⁻¹ en condiciones de luz durante la fase correspondiente a la estacionaria (quinto día, 120 h), mientras que Gómez-Consarnau y colaboradores (2016) reportaron una abundancia máxima de aproximadamente $\approx 6 \times 10^6$ cél·mL⁻¹ en el mismo punto de la fase de crecimiento. Estas diferencias pueden atribuirse a variaciones en las condiciones de laboratorio con respecto a las reportadas en el artículo publicado en el 2016, por ejemplo, en la preparación del medio y/o método de cuantificación de bacterias.

En condiciones de luz, las bacterias fotoheterótrofas contienen una ventaja energética, porque la actividad de las PR en la membrana periplasmática, la cual puede generar la FPM y facilitar la síntesis de ATP o el transporte de sustratos. La expresión de los genes de PR en MED134 se ha estudiado con anterioridad a partir de análisis de su transcriptoma (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016), donde los transcritos de mRNA de PR son más abundantes en condiciones de luz. Además, los análisis reportados del transcriptoma de MED134 no solo indican una mayor expresión de genes de PR, sino también transportadores dependientes de TonB (TBDT) específicos para la tiamina (vitamina B1) a las 120 h del crecimiento (fase estacionaria) (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016). Las vitaminas como la cobalamina, la biotina y la tiamina desempeñan un papel esencial como cofactores en reacciones enzimáticas del metabolismo de los microorganismos; por ejemplo, en la reacción de transcetolasa (ruta de las pentosas fosfato), piruvato deshidrogenasa (TCA) y α -cetoglutarato (TCA) (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016; Munn, 2020; Edwards, 2022). Las vitaminas catalizan reacciones esenciales en la ruta del TCA, y por ende, apoyan el crecimiento de las bacterias. La mayoría de los microorganismos son auxótrofos para la tiamina (carecen de rutas metabólicas para sintetizarla por sí mismos) y la obtienen a través de interacciones con otros

microorganismos que son productores (protótrofos) (e.g. simbiosis, señalización) (Gasol y Kirchman, 2018; Johnson *et al.*, 2020). Sin embargo, existen algunas excepciones, como la bacteria patogénica *Borrelia burgdoferi* (causante de la enfermedad de Lyme), la cual no requiere tiamina (Zhang *et al.*, 2017).

Las bacterias reponen productos intermedios en el ciclo del TCA a través de otras reacciones conocidas como anapleróticas con el fin de mantener un equilibrio en el suministro de carbono del ciclo y en el sentido de las reacciones (anabólicas y catabólicas). Estas reacciones anapleróticas reponen los productos intermedios (e.g. oxaloacetato, piruvato; Figura 20) mediante la fijación de CO_2 (carbono inorgánico), la conversión del CO_2 a carbono orgánico y su asimilación (Prescott *et al.*, 2004).

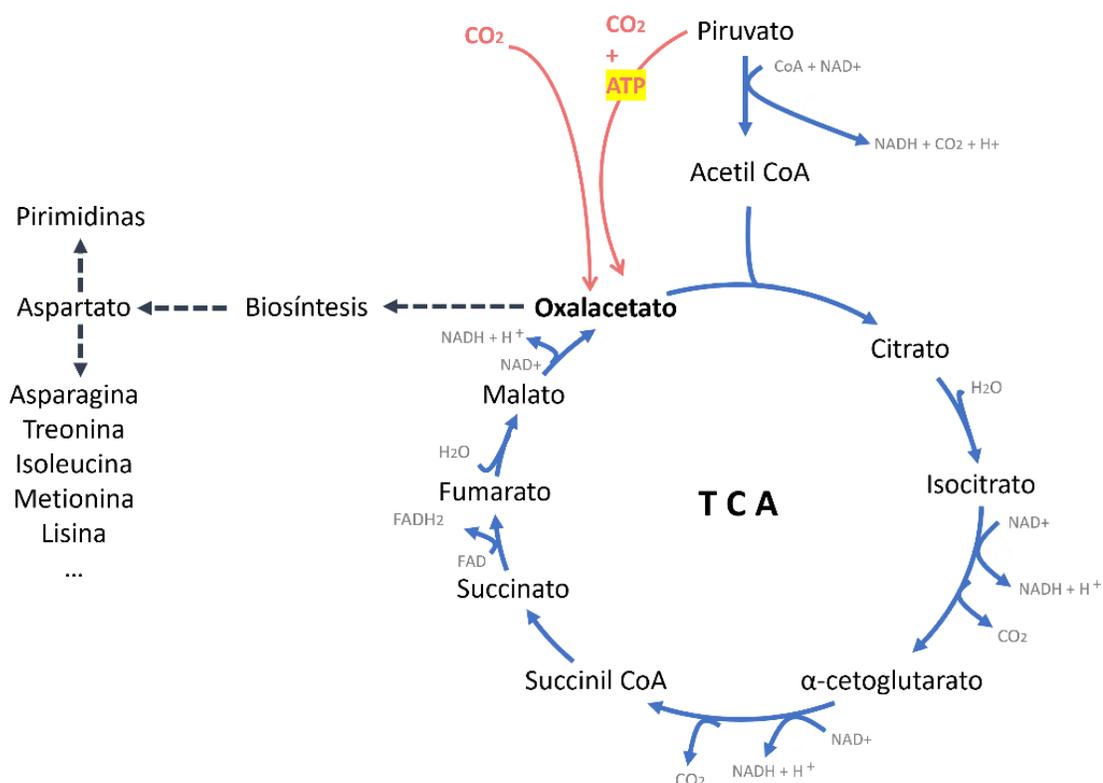


Figura 20. Ciclo de TCA y reacciones anapleróticas (flechas rojas). Las reacciones anapleróticas son reacciones que reponen productos intermedios del TCA mediante la fijación de CO_2 . Modificado de Prescott *et al.*, 2004.

Cabe destacar que estas reacciones sólo permiten reponer parte del carbono para la biosíntesis de determinados aminoácidos (e.g. aspartato) (Figura 20). En comparación con los organismos autótrofos los cuales tienen otro proceso de fijación de CO_2 , el cual les permite obtener la mayor parte del carbono necesario para el crecimiento (Prescott *et al.*, 2004; Palovaara *et al.*, 2014). En cultivos de MED134 con bajas concentraciones de COD (0.3 – 0.7 mM C) o enriquecido con el aminoácido alanina (Ala), se ha reportado una tasa de fijación anaplerótica que varía entre 0.02 a 0.47 fg C·cél⁻¹. A partir de la fijación de

carbono inorgánico, se estima que MED134 obtiene del 24 – 31 % del carbono celular en luz, mientras que los niveles en oscuridad son menores al 14 % (Palovaara *et al.*, 2014; Pinhassi *et al.*, 2016).

4.2 Tasas de respiración

Durante las incubaciones para calcular las tasas de respiración en MED134, los ajustes lineales ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$) omitieron los primeros 10 minutos debido a que en esa franja de tiempo inicial la concentración de oxígeno decayó rápidamente y no se observó una disminución lineal. Warkentin y colaboradores (2007) utilizaron el mismo tipo de sensores ópticos de oxígeno (optodos) y al evaluar la tasa de respiración recomiendan omitir los primeros diez minutos, debido a que reportaron un abrupto declive en la concentración de oxígeno ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) durante ese tiempo. En esta tesis los cambios en la concentración de oxígeno tuvieron fluctuaciones de $\pm 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ durante los primeros minutos, y cambios de temperatura alrededor de $0.1 - 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, por lo que se descarta que la temperatura causara estas fluctuaciones, se hipotetiza que este cambio en la respiración puede deberse al tiempo de adaptación del microorganismo al ser transferido de botella.

Las tasas de respiración en un organismo pueden presentar variabilidad por varios factores. Por ejemplo, la disponibilidad de sustratos orgánicos, la temperatura del agua, la cual afecta a la solubilidad del O_2 y la actividad de la célula; asimismo, la falta de macronutrientes como el fosfato, nitrato y micronutrientes como las vitaminas (Munn, 2020). Es por esto que el medio de cultivo fue diseñado con un exceso de nutrientes inorgánicos ($2.1 \mu\text{M NH}_4\text{Cl}$, $0.3 \mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$) y temperatura controlada ($18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$); asimismo se utilizó una concentración limitante de carbono orgánico (0.39 mM C Zobell) con el fin de observar diferencias en el crecimiento en condiciones de luz y oscuridad (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016) y tener una abundancia celular baja ($\leq 10^6$) que permitiera cuantificar la respiración. De esta forma se evitó otro tipo de limitación nutricional que pudiera afectar la tasa de respiración.

La hipótesis planteada esperaba que en condiciones de luz la respiración fuera menor que en oscuridad, debido al uso de las PR y los efectos por la FPM en la membrana. Sin embargo, la hipótesis se cumplió únicamente en la fase estacionaria, ya que durante la fase exponencial las tasas de respiración celular fueron muy similares en las condiciones de luz y oscuridad (5.41 vs. $5.96 \times 10^{-10} \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Figura 18). Esto puede deberse a que ambas condiciones se encontraban en una fase de crecimiento activo, aunque las muestras en condiciones de luz ya se diferenciaban de las de oscuridad en su abundancia celular (5.15 vs. $3.86 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Figura 13). En la fase estacionaria (120 h) el

agotamiento del sustrato provocó un efecto distinto en la respiración de cada condición, en luz la tasa de respiración disminuyó, mientras que en oscuridad se registró un aumento (2.77 vs. $6.69 \times 10^{-10} \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Figura 18). Estos resultados muestran que hay un efecto interesante en la respiración en condiciones de luz durante la fase estacionaria. Se hipotetiza que cuando las bacterias han terminado el crecimiento activo y se encuentran ante la limitación del carbono orgánico disponible, la FPM generada por las PRs es utilizada principalmente para mantener la síntesis de ATP y el transporte activo a través de la membrana (e.g. Transportadores Ton B dependientes).

Gómez-Consarnau y colaboradores (2016) hipotetizaron que la ventaja del crecimiento de MED134 en condiciones de luz y durante la fase estacionaria (120 h) se debe a un mayor transporte activo de la tiamina y no por una disminución de la respiración. En ese mismo estudio MED134 mostró una expresión más alta en condiciones de luz de genes de la ruta del TCA, como 2-cetoglutarato deshidrogenasa, succinil co A (*sucA*) y piruvato deshidrogenasa, sugiriendo que los transportadores de tiamina permiten catalizar las reacciones metabólicas del TCA en la luz y favorecer la respiración de materia orgánica. Aunque esto explica parte de la eficiencia de utilización de carbono y aumento del crecimiento de MED134, es difícil explicar los procesos implicados en la disminución de la respiración. Por una parte, la disminución en la respiración puede indicar que las células son más eficientes utilizando el carbono orgánico, porque se encuentran en su máxima abundancia ($6.42 \times 10^5 \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$) en comparación con las de oscuridad, donde son menos eficientes debido a que no tienen otra fuente de energía (PR) e incrementan la respiración para mantener su abundancia y funciones ($3.86 \times 10^5 \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$).

En otro estudio realizado con la bacteria fotoheterótrofa con PR, *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 (clado SAR11, clase Alfabroteobacteria), se observa que la respiración disminuye en condiciones de luz conforme el carbono orgánico se vuelve limitante, mientras que en oscuridad la respiración aumenta (Figura 6) (Steindler *et al.*, 2011). Por lo tanto, el aumento en la tasa de respiración a las 120 h en condiciones de oscuridad en MED134 puede deberse a que aumenta la respiración endógena, es decir, que las bacterias comienzan a consumir sus recursos celulares internos (e.g. lípidos y proteínas) para obtener la energía para mantenerse activas (Kjelleberg *et al.*, 1987; Steindler *et al.*, 2011), mientras que en luz las PR ayudan a la obtención de energía adicional para el mantenimiento de la célula.

4.3 Niveles de ATP

En cuanto a los niveles de ATP celular, este estudio mostró que en condiciones de luz, se

mantuvieron relativamente estables entre la fase exponencial y estacionaria. Los niveles de ATP durante la fase exponencial fueron de 15 ag·cél, cuando las bacterias estaban creciendo activamente y ya se observaba una diferencia en el crecimiento en luz con respecto de las de oscuridad. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el ATP celular fue menor en la luz respecto a la oscuridad debido a que la energía fue utilizada principalmente para transporte de sustratos, transporte de vitaminas y crecimiento. Los TonB son proteínas intermembranales que en conjunto con los transportadores TBDT (Transportadores TonB dependientes) permiten transportar sustancias específicas, por ejemplo, vitaminas como la tiamina. Estos transportadores son parte del transporte activo de la célula, corresponden al transporte activo secundario, el cual funciona a partir del gradiente de protones en la membrana, por lo tanto, su actividad es propiciada por la generación de la FPM de las PR en condiciones de luz.

En condiciones de luz durante la fase estacionaria se observó un descenso en la respiración y en los niveles del ATP (11.29 ag·cél⁻¹) (Figura 19), donde también se observó la máxima abundancia bacteriana (6.42 x10⁵ cél·ml⁻¹). Esto sugiere que el uso de las PR en condiciones de luz permite a estas bacterias mantener sus funciones celulares básicas a pesar de la limitación del carbono orgánico disponible. Se hipotetiza que la FPM en condiciones de luz se genera con mayor intensidad, permitiendo facilitar el transporte de sustratos de importancia (tiamina), la síntesis de ATP, así como otras reacciones (e.g. rutas anapleróticas), que reponen productos intermediarios de importancia en las rutas anabólicas.

Durante la fase exponencial en oscuridad las tasas de respiración y los niveles de ATP celular son mayores (45 ag·cél⁻¹) (Figura 19) respecto a la luz. Esto sugiere que el carbono orgánico disuelto que se añadió al cultivo (0.39 mM C) fue suficiente para estimular el crecimiento activo. Sin embargo, en el quinto día (fase estacionaria) la mayor parte del sustrato orgánico ya había sido consumido por la respiración o utilizado para la síntesis de biomasa, reflejándose en un marcado declive en los niveles de ATP por célula (5 ag·cél⁻¹). Steindler y colaboradores (2011) observaron que al exponer los cultivos de SAR11 a la luz después de un periodo de oscuridad (cinco minutos) generaba un incremento en los niveles de ATP celular (~5 ag·cél⁻¹) durante la fase estacionaria. Además, mediante microscopía electrónica se observaron que las células de los cultivos en condiciones de oscuridad mostraban cambios de morfología (reducción del tamaño de la célula y estructura de la pared celular) (Figura 7, C y G). En el caso de de SAR11, la observación de estos cambios ha servido para entender que la energía obtenida de las PR es utilizada para mantener la morfología y tamaño celular cuando el sustrato se encuentra limitado.

Dokdonia sp. MED134 es una bacteria capaz de crecer en una concentración limitante de carbono orgánico (0.39 mM C) tanto en luz como en oscuridad. Sin embargo, su crecimiento es mayor en

condiciones de luz debido al tipo de fotoheterotrofia con PR que utiliza, como se ha reportado anteriormente. Existen muchas incógnitas respecto al consumo de COD y producción de energía de MED134, por lo que se intentó replicar las condiciones de estudios previos, con el propósito de obtener resultados comparables respecto a la actividad en luz contra oscuridad en una condición limitada de carbono. En este experimento, las abundancias bacterianas fueron menores las reportadas previamente (1×10^5 vs. 1×10^6), estas diferencias pueden ser atribuidas a variaciones de temperatura ambiental, método de cuantificación o la reproducibilidad de la cepa.

La caracterización de las tasas de respiración de MED134 complementó los estudios previos sobre crecimiento y del transcriptoma (particularmente en la fase estacionaria) reportados anteriormente (Gómez-Consarnau *et al.*, 2016). Durante la fase exponencial en condiciones de luz y carbono orgánico disponible, la respiración fue similar en condiciones de luz como en oscuridad. Sin embargo, durante la fase estacionaria se observó una disminución de la respiración en condiciones de luz y un incremento en oscuridad. La hipótesis planteada en este estudio indicaba que MED134 disminuiría su respiración, debido a la energía que es obtenida por las PRs en condiciones de luz, mientras que en oscuridad provocaría el efecto contrario. Sin embargo, esta hipótesis sólo se cumple en la fase estacionaria (120 h) del crecimiento, lo que indica que a medida que el COD se vuelve limitante, la energía obtenida a través de las PR se vuelve más relevante en el mantenimiento y biosíntesis de la célula.

La interpretación de los efectos de la luz y el carbono en los niveles de energía de MED134 es complicada debido a que los ensayos de esta tesis son las primeras aproximaciones energéticas (ATP). La concentración de ATP en la fase exponencial fue inesperadamente más alta en oscuridad ($45 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$); la hipótesis respecto a la ventaja energética de las PR sólo se cumplió en condiciones de luz durante la fase estacionaria, donde la concentración de ATP fue mayor que en oscuridad (11.29 vs. $5.23 \text{ ag}\cdot\text{cél}^{-1}$). Cabe mencionar que en el presente estudio no se contó con réplicas en los análisis de niveles de ATP, por lo tanto, estas observaciones deben tomarse con cautela. Aun así, se logró utilizar el método de análisis y se pudieron mostrar las primeras medidas de ATP en MED134 en luz y oscuridad, lo cual será informativo para optimizar futuros estudios. Para futuras cuantificaciones de ATP, se recomienda coleccionar suficientes muestras para evaluar cómo cambia la concentración de ATP a lo largo de un intervalo de análisis (e.g. 5 minutos) exponiéndolos en luz y oscuridad como lo realizaron Steindler y colaboradores en 2011. Además, es de suma importancia estandarizar previamente el método o kit a utilizar, determinar la eficiencia del buffer de lisis (e.g. EDTA + Tris vs buffer provisto en kits comerciales) y por último, calcular la razón más eficiente de luciferasa con respecto de la muestra (en este caso se utilizó 1:1).

Capítulo 5. Conclusiones

El efecto de la luz en las tasas de respiración de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de carbono orgánico limitado se observó principalmente durante la fase estacionaria (120 h). En esta etapa el crecimiento de las bacterias presentó la mayor abundancia, indicando que las bacterias utilizan de manera más eficiente el carbono conforme se vuelve más limitado. Por otro lado, no se observó un efecto significativo en las tasas de respiración entre condiciones durante la fase exponencial (72 h).

Los resultados de las cuantificaciones energéticas de ATP muestran que la disponibilidad de energía celular es similar en condiciones de luz y durante las diferentes fases de crecimiento, debido al uso de las PR y a la eficiencia en la utilización de COD. Sin embargo, para confirmar estos resultados se sugiere realizar experimentos que utilicen mayor número de réplicas y un análisis temporal más extenso para obtener una mejor comprensión del uso de la energía en MED134.

Dokdonia sp. MED134 es una cepa fotoheterótrofa con PR con potencial de estudio para lograr una mejor comprensión de la eficiencia del uso de carbono y otros sustratos (e.g. vitaminas o aminoácidos). Para ampliar el conocimiento de MED134 (o de otras cepas bacterianas) y las PR, los próximos experimentos pueden complementar esta investigación con estudios sobre la morfología celular, descripciones más detalladas de rutas metabólicas (e.g. TCA), así como producción de la proteína en condiciones de luz vs. oscuridad.

Literatura citada

- 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. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1902>
- Bruslind, L. (2021). General microbiology. Oregon State University. Recuperado el 23 de enero del 2023 de: <https://open.oregonstate.edu/generalmicrobiology/>
- DeLong, E. F., & Béjà, O. (2010). The light-driven proton pump proteorhodopsin enhances bacterial survival during tough times. *PLoS Biology*, 8(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000359>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13624>
- Edwards, K. (2022). Thiamine Biochemistry. Department of Natural Resources and the Environment, Cornell University. Recuperado el 21 de junio del 2023 de: http://thiamine.dnr.cornell.edu/Thiamine_biochemistry.html.
- Finkel, O. M., Béjà, O., & Belkin, S. (2013). Global abundance of microbial rhodopsins. *ISME Journal*, 7(2), 448–451. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.112>
- Giovannoni, S. J. (2017). SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), 231–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015934>
- 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 Biology*, 8(4), 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000358>
- Gómez-Consarnau, L., González, J. M., Coll-Lladó, M., Gourdon, P., Pascher, T., Neutze, R., Pedrós-Alió, C., & Pinhassi, J. (2007). Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. *Nature*, 445(7124), 210–213. <https://doi.org/10.1038/nature05381>
- Gómez-Consarnau, L., González, J. M., Riedel, T., Jaenicke, S., Wagner-Döbler, I., Sañudo-Wilhelmy, S. A., & Fuhrman, J. A. (2016). Proteorhodopsin light-enhanced growth linked to vitamin-B 1 acquisition in marine Flavobacteria. *ISME Journal*, 10(5), 1102–1112. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.196>
- Gómez-Consarnau, L., 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. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8855>
- González, J. M., Pinhassi, J., Fernández-Gómez, B., Coll-Lladó, M., González-Velázquez, M., Puigbò, P., Jaenicke, S., Gómez-Consarnau, L., Fernández-Guerra, A., Goesmann, A., & Pedrós-Alió, C. (2011). Genomics of the proteorhodopsin-containing marine flavobacterium *Dokdonia* sp. strain MED134. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8676–8686. <https://doi.org/10.1128/AEM.06152-11>

- Hernández De La Torre, B., & Gaxiola-Castro, G. (2007). Carbono en ecosistemas acuáticos de México. In *Libro* (p. 508). <https://doi.org/10.13140/2.1.4413.7927>
- Johnson, W. M., Alexander, H., Bier, R. L., Miller, D. R., Muscarella, M. E., Pitz, K. J., & Smith, H. (2020). Auxotrophic interactions: A stabilizing attribute of aquatic microbial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(11), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa115>
- Kirchman, D., Sigda, J., Kapuscinski, R., & Mitchell, R. (1982). Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(2), 376–382. <https://doi.org/10.1128/aem.44.2.376-382.1982>
- Kjelleberg, S., M. Hermansson, P. Marden, & G. W. Jones. (1987). The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu. Rev. Microbiol.* *41*: 25–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.000325>
- Koblížek, M. (2015). Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(6), 854–870. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv032>
- Kolber, Z. S., C. L. Van Dover, R. A. Niederman, & P. G. Falkowski. (2000). Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* *407*: 177–179. <https://doi.org/10.1038/35025044>
- Lomakina, G. Y., Modestova, Y. A., & Ugarova, N. N. (2015). Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry*, *80*(6), 701–713. <https://doi.org/10.1134/S0006297915060061>
- Munn, C. B. (2020). Marine Microbiology, Ecology and Applications. In *CRC Press* (3ra ed.).
- Munson-McGee, J. H., Lindsay, M. R., Sintes, E., Brown, J. M., D'Angelo, T., Brown, J., Lubelczyk, L. C., Tomko, P., Emerson, D., Orcutt, B. N., Poulton, N. J., Herndl, G. J., & Stepanauskas, R. (2022). Decoupling of respiration rates and abundance in marine prokaryoplankton. *Nature*, *612*(7941), 764–770. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05505-3>
- Palovaara, J., Akram, N., Baltar, F., Bunse, C., Forsberg, J., Pedrós-Alió, C., González, J. M., & Pinhassi, J. (2014). Stimulation of growth by proteorhodopsin phototrophy involves regulation of central metabolic pathways in marine planktonic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1402617111>
- 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. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00003-16>
- Pomeroy, L. (1974). The Ocean's Food Web, A changing Paradigm. *BioScience*, *24*(9), 6. <https://doi.org/10.2307/1296885>
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. A. 2004. *Microbiología*. (5ta ed.). Mc Graw Hill.
- Rozenberg, A., Inoue, K., Kandori, H., & Bèjà, O. (2021). Microbial Rhodopsins: The Last Two Decades. *Annual Review of Microbiology*, *75*, 427–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-031721-020452>
- Shiba, T., Simidu, U., & Taga, N. (1979). Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Applied and Environmental Microbiology*, *38*(1), 43–45. <https://doi.org/10.1128/aem.38.1.43-45.1979>

- 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). <https://doi.org/10.7717/peerj.5798>
- Sigma-Aldrich. (2021). Manual, ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Versión 12). Recuperado el 6 de julio del 2023 de: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/342/054/11699709001.pdf>
- Steindler, L., Schwalbach, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019725>
- Valiela, I. (2015). Marine Ecological processes. In *Springer* (3ra ed.).
- Vikström, K., Tengberg, A., & Wikner, J. (2019). Improved accuracy of optode-based oxygen consumption measurements by removal of system drift and nonlinear derivation. *Limnology and Oceanography: Methods*, 17(3), 179–189. <https://doi.org/10.1002/lom3.10297>
- Villegas-Mendoza, J., Gómez-Ocampo, E., Velásquez-Aristizábal, J. & Rodríguez-Escobar, D. (2022). Microbial metabolic activity in two basins of the Gulf of Mexico influenced by mesoscale structures. *Journal of Marine Systems*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2022.103781>
- Voet, D. & Voet, J. (1995). *Biochemistry*. John Wiley and Sons. (2da ed.). 1361 pp.
- Walter, J. M., Greenfield, D., Bustamante, C., & Liphardt, J. (2007). Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2408–2412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611035104>
- Warkentin, M., Freese, H. M., Karsten, U., & Schumann, R. (2007). New and fast method to quantify respiration rates of bacterial and plankton communities in freshwater ecosystems by using optical oxygen sensor spots. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6722–6729. <https://doi.org/10.1128/AEM.00405-07>
- Yoshizawa, S., Azuma, T., Kojima, K., Inomura, K., Hasegawa, M., Nishimura, Y., Kikuchi, M., Armin, G., Miyashita, H., Ifuku, K., Yamano, T., Marchetti, A., Fukuzawa, H., Sudo, Y., & Kamikawa, R. (2022). Proton-pumping rhodopsins in marine diatoms. *BioRxiv*, 2022.01.18.476826. <https://doi.org/10.1101/2022.01.18.476826>
- Zhang, K., Bian, J., Deng, Y., Smith, A., Nunez, R. E., Li, M. B., Pal, U., Yu, A.-M., Qiu, W., Ealick, S. E., & Li, C. (2017). Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* does not require thiamin. *Nature Microbiology*, 2(1), 16213. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.213>

Anexos

Tabla 3. Preparación de medio Zobell para el cultivo inicial de MED134.

Compuesto	Líquido	Sólido (agar)
Peptona 5 g	✓	✓
Extracto de levadura 1 g	✓	✓
Bactoagar 15 g	-	✓
Agua de mar filtrada (0.2 um) 750 mL	✓	✓
Agua ultrapura (Milli Q) 250 mL	✓	✓

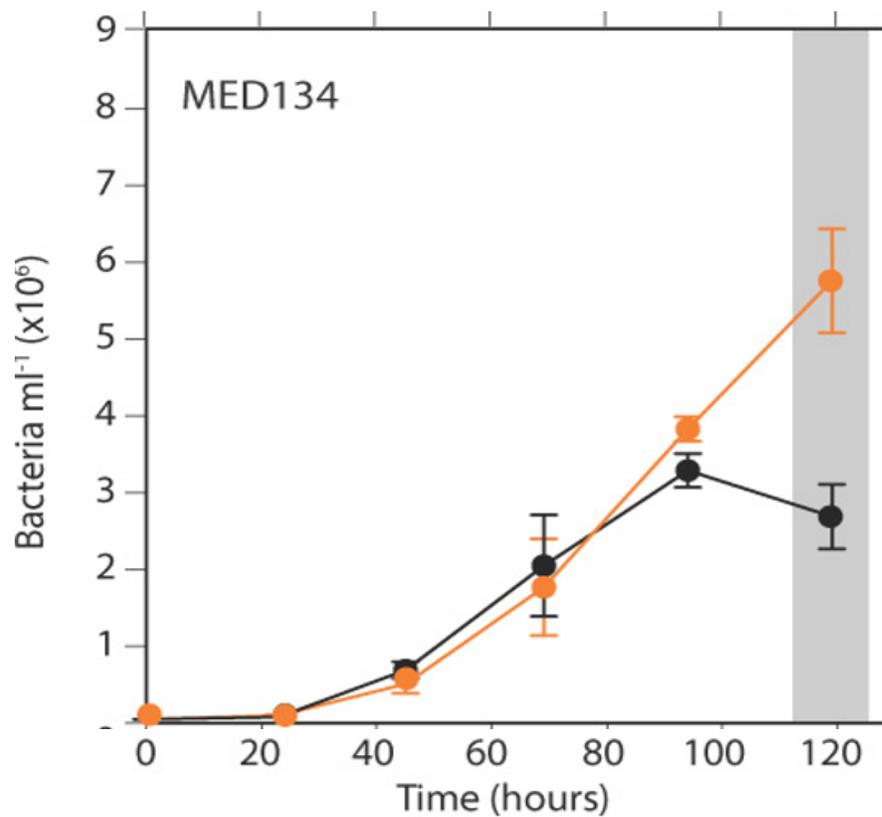


Figura 21. Crecimiento de MED134 con respecto del tiempo en condiciones de luz (puntos naranjas) y oscuridad (puntos negros). Medio de cultivo con exceso de nutrientes inorgánicos ($2.1 \mu\text{M NH}_4\text{Cl}$ y $0.3 \mu\text{M Na}_2\text{HPO}_3$, concentración de COD de 0.39 mM C (Zobell), temperatura $18 \text{ }^\circ\text{C}$, cultivos de 1.9 L . Gómez-Consarnau *et al.*, 2016.

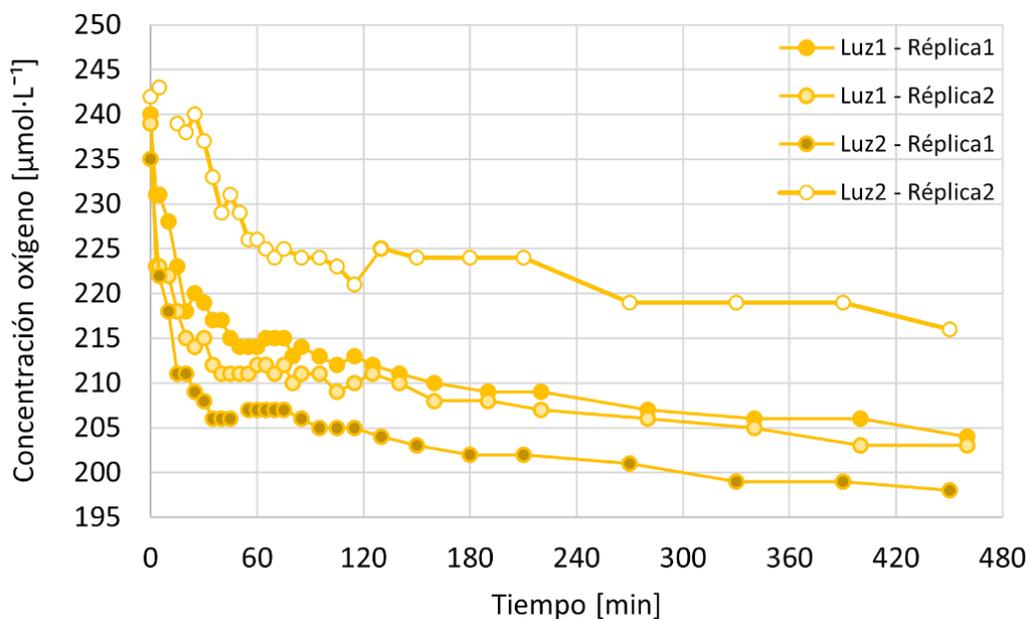


Figura 22. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento exponencial de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4).

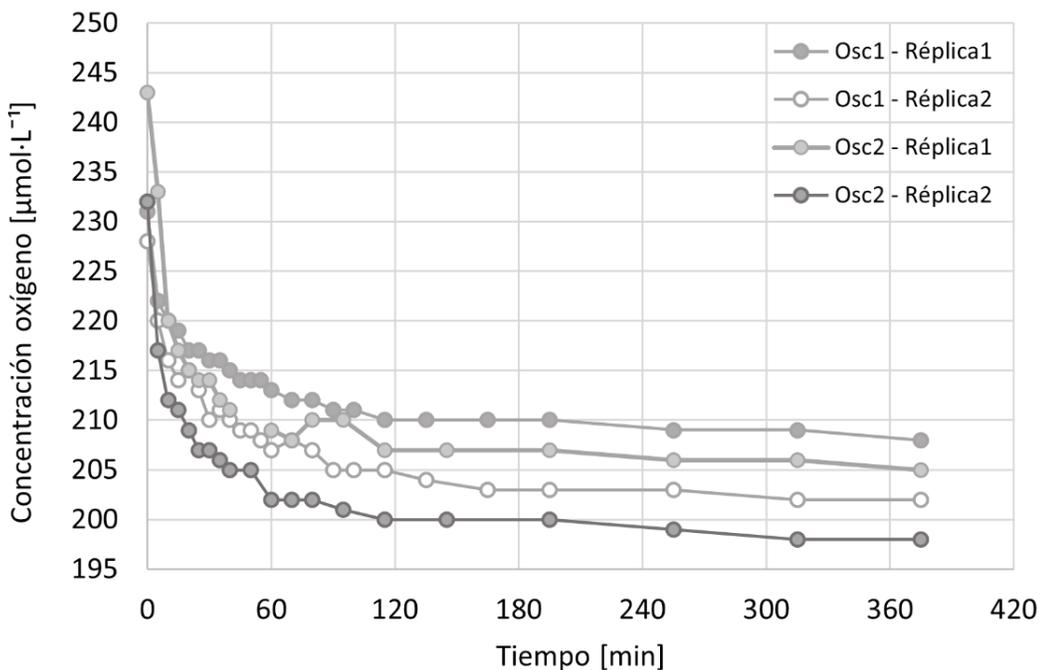


Figura 23. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento exponencial de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de oscuridad. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4).

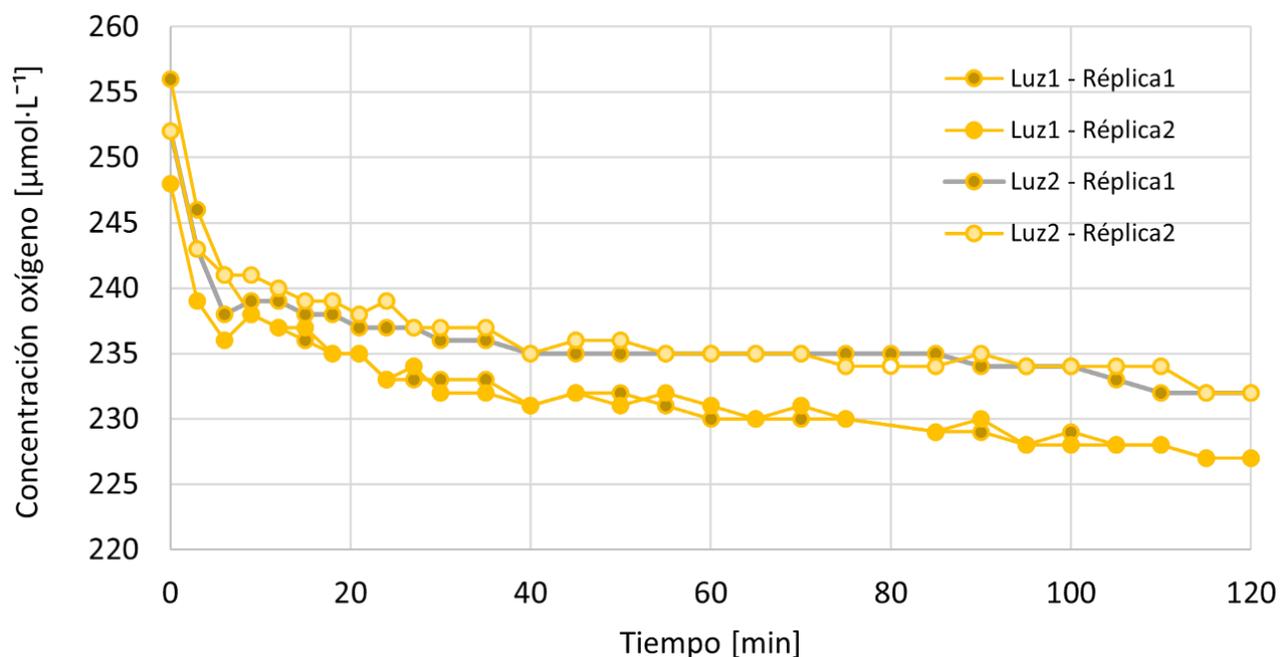


Figura 24. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento estacionaria de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4).

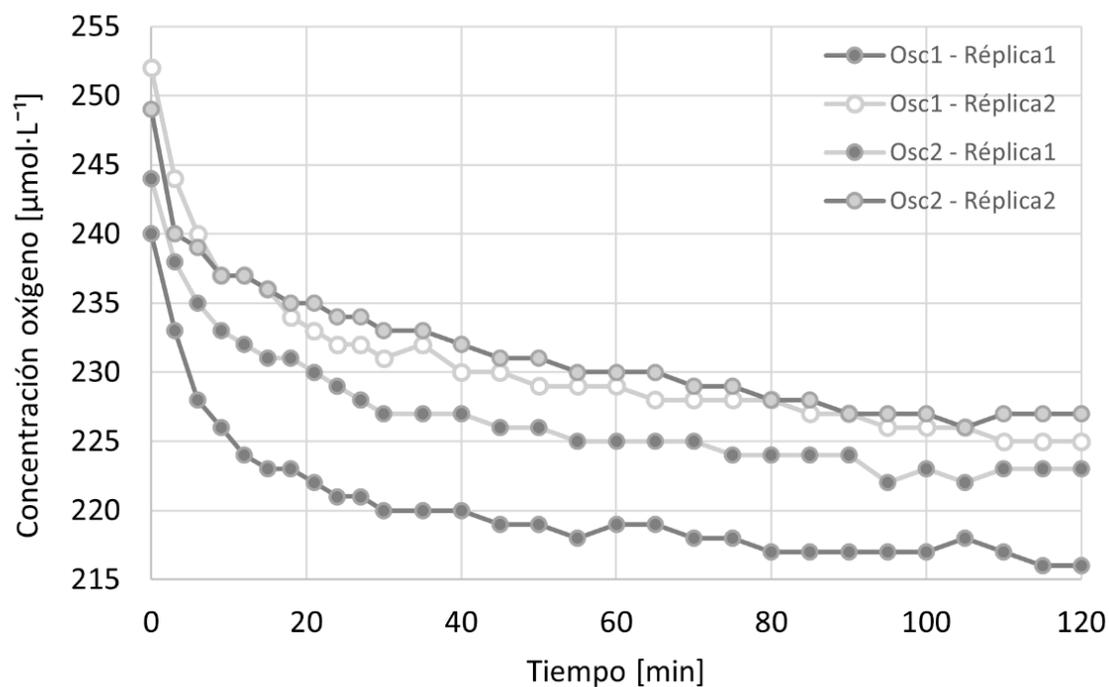


Figura 25. Concentración de oxígeno con respecto del tiempo (minutos) durante todo el ensayo de respiración en la fase de crecimiento estacionaria de *Dokdonia* sp. MED134 en condiciones de luz. Dos botellas por duplicado, abundancia bacteriana de 10^5 cél·mL⁻¹. Determinación de la concentración de oxígeno ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a partir de optodos (PreSens, Fibox4).

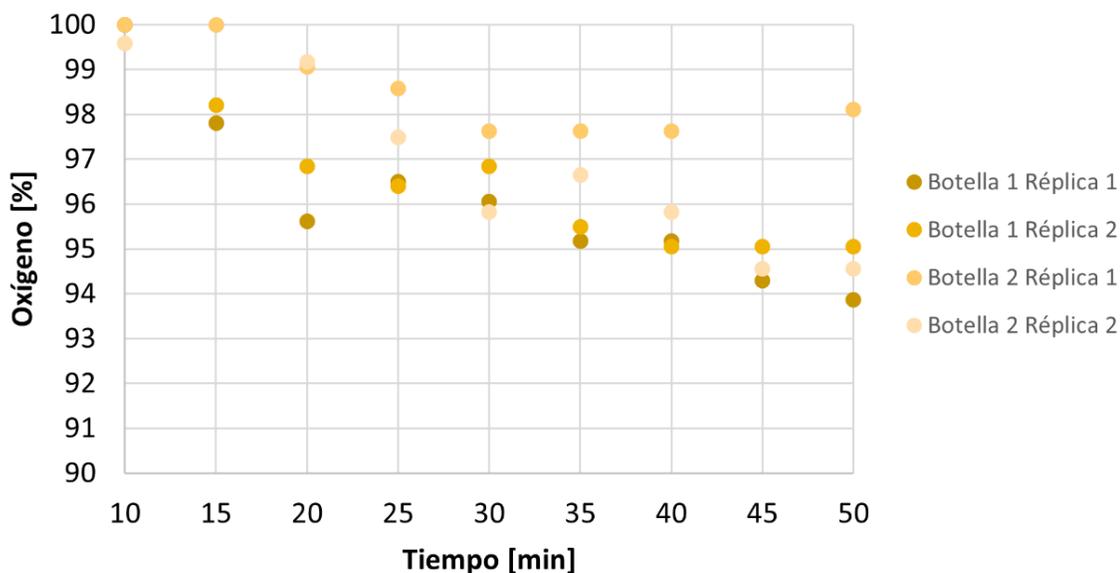


Figura 26. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase exponencial en condiciones de luz. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardó en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio

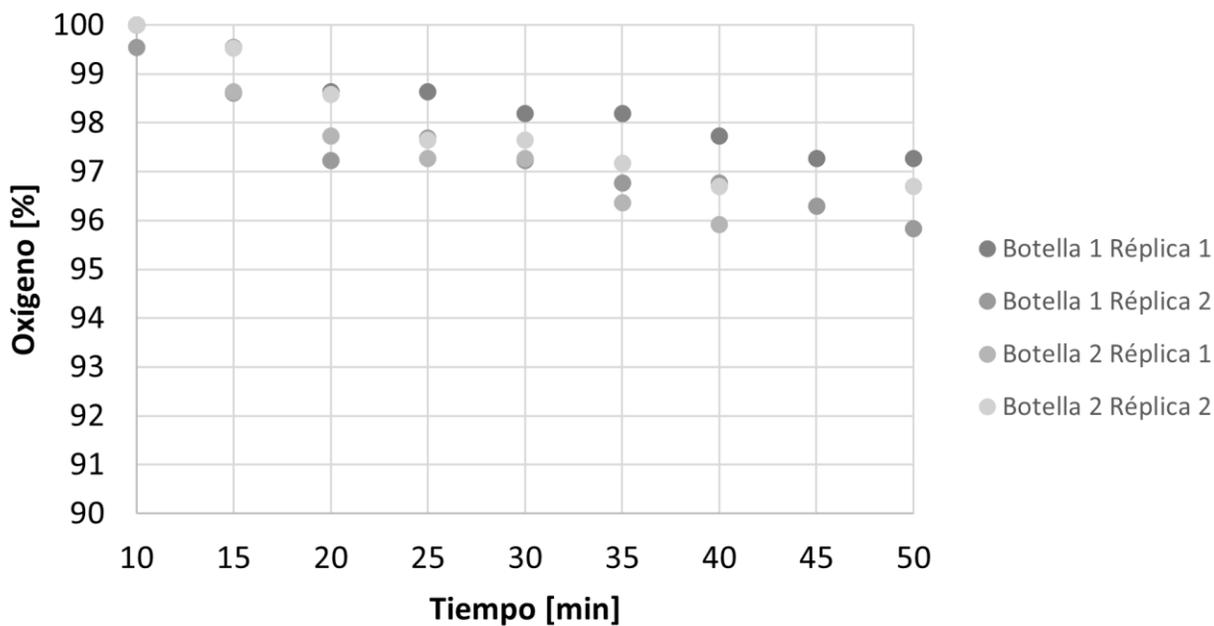


Figura 27. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase exponencial en condiciones de oscuridad. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardó en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio

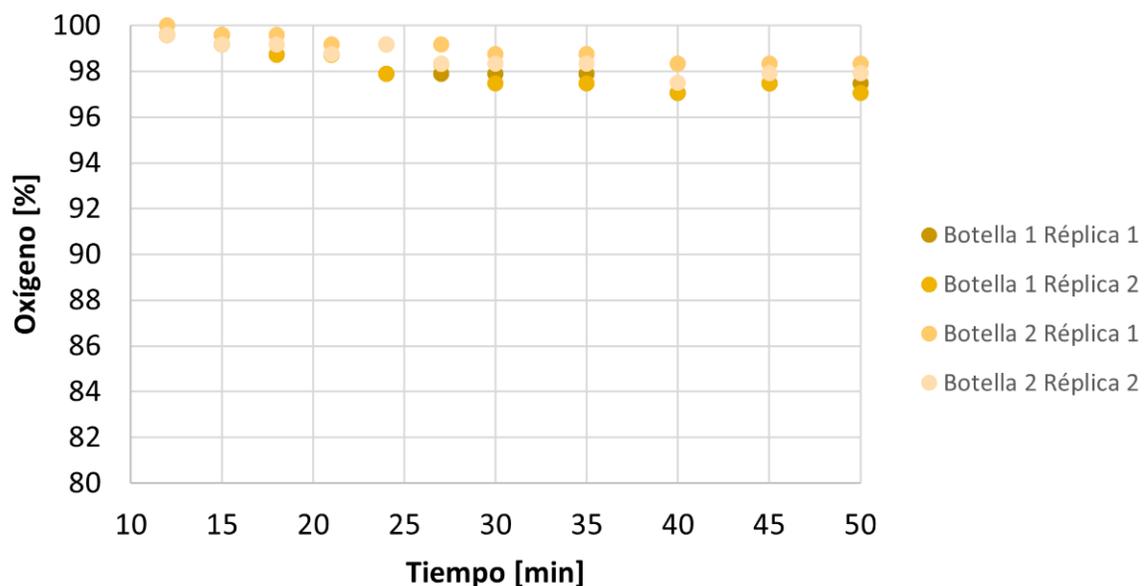


Figura 28. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase estacionaria en condiciones de luz. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardó en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio.

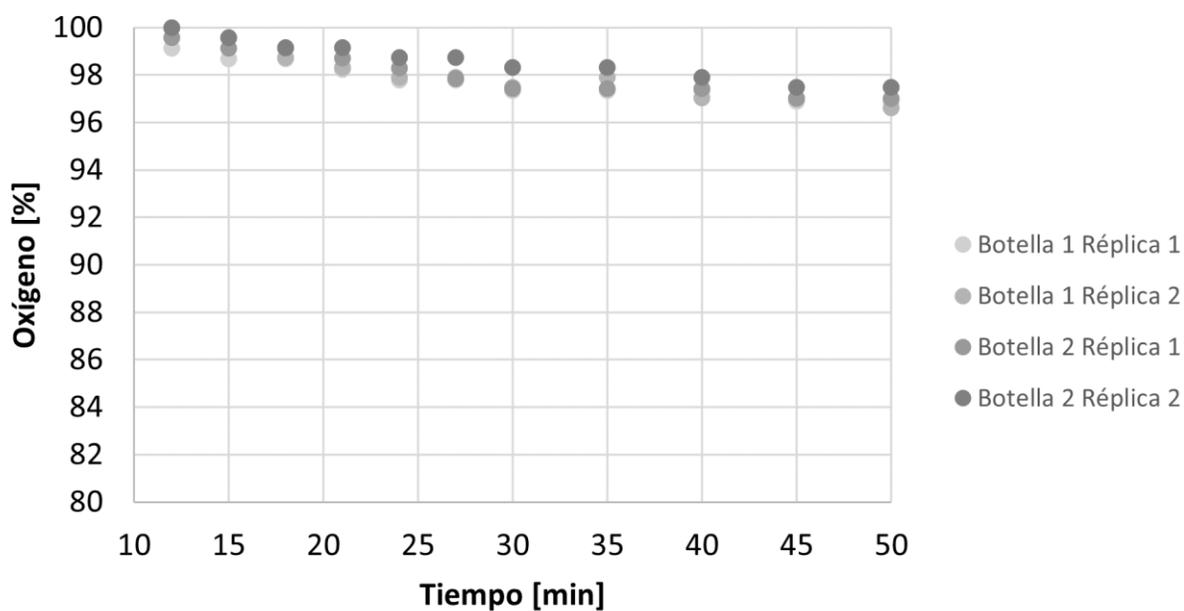


Figura 29. Datos normalizados de la cuantificación de la respiración de *Dokdonia* sp. MED134. Concentración de oxígeno durante la primera hora de ensayo de la fase estacionaria en condiciones de oscuridad. Se omiten los primeros diez minutos de la cuantificación porque fue el tiempo que tardó en estabilizarse la señal de oxígeno en el medio.