

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, Ciencias y Tecnologías).

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**

**Distribución geográfica de comunidades microbianas
fotoheterótrofas en la Corriente de California**

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

Presenta:

Isis del Rosario Alcántara Gallardo

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Isis del Rosario Alcántara Gallardo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Laura Gómez Consarnau
Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Codirectora de tesis

Dra. María Asunción Lago Lestón

Dr. Miguel Cuevas Cruz



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

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Isis del Rosario Alcántara Gallardo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Distribución geográfica de comunidades microbianas fotoheterótrofas en la Corriente de California

Resumen aprobado por:

Dra. Laura Gómez Consarnau
Codirectora de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Codirectora de tesis

La presencia de fotoproteínas denominadas proteorodopsinas en microorganismos fotoheterótrofos sugieren una adaptación a condiciones ambientales variables en la zona fótica del océano. Esta tesis analizó la distribución de pigmentos, específicamente clorofila-*a* y proteorodopsina (retinal), así como la composición de las comunidades bacterianas y su relación con parámetros ambientales a lo largo del transecto del Pacífico oriental frente a la península de Baja California, durante la campaña oceanográfica IMECOCAL 1911. El objetivo fue analizar la estructura de las comunidades microbianas fotoheterótrofas e identificar sus patrones de distribución de pigmentos en la zona fótica de la corriente de California. Para ello, se cuantificaron los pigmentos y se realizó un análisis de secuenciación de las regiones V4-V5 del gen 16S de ARNr. Se observó que la proteorodopsina está ampliamente presente en la superficie del océano en toda la región de estudio. Los factores que regulan su dinámica son la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto en bajas concentraciones. Además, se identificaron bacterias del clado SAR11 y Flavobacterias como los órdenes fotoheterótrofos más abundantes. El orden de los Flavobacteriales mostró una dominancia en el área con mayor concentración de clorofila-*a*. Este estudio destaca la importancia de las comunidades microbianas fotoheterótrofas, particularmente aquellas que contienen proteorodopsinas, las cuales están distribuidas y adaptadas a las condiciones ambientales en la corriente de California, resaltando la importancia de estos microorganismos en los ciclos biogeoquímicos marinos.

Palabras clave: comunidades microbianas, fototrofia, proteorodopsina, 16S ARNr, corriente de California

Abstract of the thesis presented by **Isis del Rosario Alcántara Gallardo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

Geographical distribution of photoheterotrophic microbial communities in the California Current

Abstract approved by:

Dra. Laura Gómez Consarnau
Thesis Director

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Thesis Director

The presence of photoproteins known as proteorhodopsins in photoheterotrophic microorganisms suggests an adaptation to variable environmental conditions in the photic zone of the ocean. This thesis analyzed the distribution of pigments, specifically chlorophyll-a and proteorhodopsin (retinal), as well as the composition of bacterial communities and their relationship with environmental parameters along the eastern Pacific transect off the coast of the Baja California peninsula, during the IMECOCAL 1911 oceanographic campaign. The objective was to analyze the structure of photoheterotrophic microbial communities and identify their pigment distribution patterns in the photic zone of the California Current. To this end, pigments were quantified and a sequencing analysis of the V4-V5 regions of the 16S rRNA gene was performed. It was observed that proteorhodopsin is widely present at the ocean surface throughout the study region. The factors regulating its dynamics are temperature, salinity, and dissolved oxygen in low concentrations. Additionally, bacteria from the SAR11 clade and Flavobacteria were identified as the most abundant photoheterotrophic orders. The order Flavobacteriales showed dominance in the area with the highest concentration of chlorophyll-a. This study highlights the importance of photoheterotrophic microbial communities, particularly those containing proteorhodopsins, which are distributed and adapted to environmental conditions in the California Current, emphasizing the significance of these microorganisms in marine biogeochemical cycles.

Keywords: microbial communities, phototrophy, proteorhodopsin, 16S rRNA, California Current

Dedicatoria

A mi mamá Isabel, por tu amor infinito y apoyo incondicional. Tu fortaleza y resiliencia me han inspirado a lo largo de este viaje. Gracias por no dejarme rendir, por creer en mí cuando tenía dudas y por ser mi pilar en los momentos más difíciles.

A mi papá Luis, por tu gran amor. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia, por estar siempre dispuesto a apoyarme en cada una de mis ocurrencias, por alentarme a seguir mis sueños. Te admiro profundamente y valoro enormemente cada sacrificio que has hecho por mí.

A Gary, mi fiel compañerito, por tu amor puro. Tus ojitos llenos de ternura siempre han iluminado los momentos más difíciles. Eres parte de mi ser.

A mi hermanita Yaeli, gracias por llenar mi vida de tanto amor y alegría. Admiro tu habilidad para sacarme una sonrisa incluso en las situaciones más complicadas. Las aventuras que hemos vivido juntas son recuerdos que atesoro, así como nuestra complicidad y el aprendizaje mutuo.

A mi hermana Aranza, gracias por escucharme y por tus consejos sinceros. Admiro tu fuerza y determinación para superar desafíos que la vida te presenta.

A mi querida abuelita Hortensia, siempre te llevo en mi corazón. Los momentos que compartimos y el amor que me diste son inolvidables. Valoraré por siempre los consejos que me diste.

Al mar, por su inmensa belleza, su inspiración y por ser el refugio donde encuentro serenidad en medio del caos.

Agradecimientos

Al centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por brindarme la oportunidad de realizar un posgrado, y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Laura Gómez Consarnau, por haberme aceptado en su laboratorio y por brindarme la oportunidad de aprender bajo su tutela.

A la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, por sus valiosos comentarios, contribuciones fundamentales y su disponibilidad en los asuntos relacionados con esta tesis.

Al Dr. Miguel Cuevas Cruz, por su invaluable ayuda desde el inicio en el laboratorio; sus consejos, aportaciones y empatía en todo momento han sido fundamentales en la realización de esta tesis.

A la Dra. María Asunción Lago Lestón, por sus comentarios y por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. A su equipo de trabajo, a Yam, por la ayuda en el laboratorio su colaboración hizo posible superar muchos desafíos experimentales. A Apatzingan, por sus ánimos y por ayudarme a distancia con mis dudas.

Al Dr. Jorge Adrián Rosales Casián, por aceptarme en el posgrado y por sus inolvidables prácticas de campo que enriquecieron mi formación. Al Dr. Rafael Andrés Cabral Tena, por su atención durante el proceso. A todo el personal del CICESE, técnicos, administrativos y vigilantes por su amabilidad. A los investigadores que me dieron clase. Al Departamento de Oceanografía Biológica, especialmente al Dr. Timothy Robert Baumgartner McBride y a Luis Erasmo Miranda Bojórquez, por proporcionarme los datos del IMECOCAL 1911.

A mis compañeros del laboratorio de Rodopsinas: Andrés, Hiram, Lau, Selene, Ángeles, Caro, Netza, Danny, y Fanny. Gracias por su ayuda y sus observaciones. A las personas involucradas en el apoyo desde la Universidad del Sur de California.

A la Dra. Rosalva García Sánchez, el Dr. Guillermo Blancas Arroyo y el Dr. Arcadio Monroy Ata, por sus ánimos y sabios consejos. Ha sido un placer coincidir en la vida.

A mi amiga Vianey, por motivarme a entrar al CICESE y ayudarme cuando llegue a Ensenada, por ser mi confidente desde la Facultad, por las aventuras, las risas y sostenerme en mis bajones emocionales. A Carmi, por escuchar mis problemas y aconsejarme. A Claudia Arellano, por apoyarme antes de esta aventura y por tus consejos certeros. Aprecio profundamente que se hayan preocupado por mí, incluso a la distancia.

A mis compis del CICESE: a Mau, por tus abrazos, las pláticas y ser mi compañero de buceo. A Tania, por tu genuina disposición para ayudarme, escuchar mis problemas existenciales y aconsejarme. A Elia, por tu apoyo y por hacerme reír en los eventos desafortunados. Y a todas aquellas personas con las que conviví y compartí momentos agradables en Ensenada.

A mis roomies: Betito, gracias por tu apoyo en los momentos buenos y malos. A Moni y a Rubí, por ser muy lindas conmigo. A Ángelito, por tus consejos. Gracias por la buena convivencia, las risas y el chismecito. Deseo que sean felices y tengan mucho éxito a donde quiera que vayan.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 Fotoheterotrofia mediante proteorodopsina.....	4
1.1.2 Estudios de comunidades microbianas mediante el gen 16S ribosomal.....	6
1.1.3 Sistema de la corriente de California.....	6
1.1.4 IMECOCAL.....	7
1.2 Justificación.....	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Área de estudio y toma de muestras.....	10
2.2 Cuantificación de pigmentos.....	11
2.3 Extracción de ADN genómico de las comunidades microbianas.....	11
2.4 Análisis bioinformático y estadístico.....	12

Capítulo 3. Resultados.....	13
3.1 Distribución de pigmentos en aguas superficiales de la región de estudio.....	13
3.1.1 Clorofila- <i>a</i>	13
3.1.2 Proteorodopsina.....	15
3.2 Parámetros ambientales.....	17
3.3 Relación entre clorofila- <i>a</i> , proteorodopsina y parámetros ambientales.....	18
3.4 Análisis de las comunidades microbianas.....	19
3.4.1 Riqueza y diversidad de las comunidades microbianas.....	20
3.4.2 Estructura de la comunidad microbiana.....	21
Capítulo 4. Discusión.....	23
4.1 Distribución de clorofila- <i>a</i> y proteorodopsina en aguas superficiales de la corriente de California.....	23
4.2 Relación entre clorofila- <i>a</i> , proteorodopsina y parámetros ambientales.....	24
4.3 Grupos microbianos fotótrofos de la corriente de California.....	25
Capítulo 5. Conclusiones.....	29
Literatura citada.....	30
Anexos.....	36

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de rodopsina microbiana. Esta proteína contiene siete hélices α , a través de la membrana celular, el retinal unido covalentemente en la hélice G, el extremo N hacia el exterior y el extremo C hacia el interior de la célula (Ernst et al., 2014).	5
Figura 2. Área de estudio de las estaciones para la campaña IMECOCAL 1911. La línea continua entre estaciones indica la ruta de navegación, comienza en la estación 100.30 y finaliza en la estación 113.60.....	10
Figura 3. Concentraciones de clorofila- <i>a</i> total (pM) en las estaciones del IMECOCAL 1911.	14
Figura 4. Porcentaje de concentración de la clorofila- <i>a</i> total (pM) en las diferentes fracciones de tamaño de microorganismos analizadas: 0.2 a 3.0 μm , 3.0 a 10 μm y >10 μm	14
Figura 5. Mapa de la distribución de la clorofila- <i>a</i> total (pM) superficial. La escala de color indica la concentración de la clorofila- <i>a</i> . Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	15
Figura 6. Concentraciones de proteorodopsina total (pM) en las estaciones del IMECOCAL 1911.	16
Figura 7. Porcentaje de concentración de proteorodopsina total (pM) en las diferentes fracciones de tamaño de microorganismos analizadas: 0.2 a 0.3 μm , 3.0 a 10 μm y >10 μm	16
Figura 8. Mapa de la distribución de la proteorodopsina total (pM) superficial. La escala de color indica la concentración de la proteorodopsina. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	17
Figura 9. Heatmap de correlaciones <i>r</i> de Spearman entre pigmentos y parámetros ambientales. Los recuadros con asteriscos (***) para valor $P < 0.001$, ** para valor $P < 0.01$ y * para valor $P < 0.05$) representan las correlaciones estadísticamente significativas.	18
Figura 10. Gráfico de dispersión, correlación entre proteorodopsina y clorofila <i>a</i> totales.	19
Figura 11. Riqueza de especies evaluada en la fracción 0.2 a 3.0 μm , ASVs observados. Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.	20
Figura 12. Índice de Shannon-Weaver (diversidad alfa) evaluada en la fracción 0.2 a 3.0 μm . Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.	21
Figura 13. Abundancia relativa a nivel de orden de las comunidades microbianas presentes en la fracción 3.0 a 0.2 μm del crucero IMECOCAL 1911. Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.	22
Figura 14. Mapa de la temperatura superficial del crucero IMECOCAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	37
Figura 15. Mapa del oxígeno disuelto superficial del crucero IMECOCAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	37
Figura 16. Mapa de la salinidad superficial del crucero IMECOCAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	38

Figura 17. Mapa de la densidad del crucero IMECOCAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.	38
Figura 18. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Proteorodopsina.	39
Figura 19. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Proteorodopsina.	40
Figura 20. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Proteorodopsina.	40
Figura 21. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Clorofila- <i>a</i>	41
Figura 22. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Clorofila- <i>a</i>	41
Figura 23. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Oxígeno.	42
Figura 24. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Salinidad.	42
Figura 25. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Densidad.	43
Figura 26. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Oxígeno disuelto.	43
Figura 27. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Densidad.	44
Figura 28. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Densidad.	44

Lista de tablas

Tabla 1. Estrategias metabólicas de las comunidades microbianas a nivel de orden del crucero IMECOCAL 1911.....	22
Tabla 2. Posición geográfica de las estaciones donde se realizaron los muestreos para análisis de ADN, citometría de flujo y cuantificación de pigmentos durante la campaña IMECOCAL 1911.	36
Tabla 3. Coeficientes de correlación de Spearman (diagonal inferior) y su probabilidad (diagonal superior) categorizadas en $P < 0.05^*$ (significativo), $P < 0.01^{**}$ (altamente significativo), $P < 0.001^{***}$ (muy altamente significativo) y $P > 0.05$ (no significativo) de los parámetros ambientales.....	39
Tabla 4. Número de secuencias obtenidas en el filtro con tamaño de poro de 0.2 μm del crucero IMECOCAL 1911.....	45

Capítulo 1. Introducción

Estudiar la distribución y diversidad biológica de las comunidades microbianas marinas es de gran importancia para entender su influencia en los ciclos biogeoquímicos de los océanos. Las bacterias marinas son los organismos más abundantes del océano, y son altamente diversas por las adaptaciones que han desarrollado a lo largo de su evolución. Los estudios de las comunidades bacterianas marinas se agrupan por las características de los ambientes donde habitan: comunidades microbianas planctónicas pelágicas, se enfocan en describir el patrón global de la composición de la comunidad en el océano (Gibbons et al., 2013); comunidades microbianas planctónicas costeras, muestran variaciones en su estructura atribuibles a los nutrientes derivados de surgencias en regiones cercanas a la costa (Boeuf et al., 2013); comunidades microbianas bentónicas: que se encuentran a grandes profundidades y en contacto con el sedimento, son muy dinámicas con frecuencia cuentan con una mayor diversidad. Esto se puede atribuir al acceso a nutrientes, así como las condiciones ambientales y la heterogeneidad del sustrato que se tiene en el bentos (Miller et al., 2013).

En la zona fótica del océano, los microorganismos fotótrofos capturan y transducen la energía proveniente del sol, la cual puede ser utilizada para catalizar las transformaciones biogeoquímicas claves dentro del ciclo del carbono, los nutrientes inorgánicos y otros elementos traza necesarios a su vez para la productividad primaria (Karl, 2007). El ciclo del carbono en el océano depende de las interacciones metabólicas entre organismos autótrofos (i.e., fijadores de carbono inorgánico) y heterótrofos (i.e., consumidores de carbono orgánico). La luz solar impulsa gran parte de la fijación de carbono inorgánico y la formación de carbono orgánico que se produce a través de la fotosíntesis (Falkowski, 1997).

La producción primaria en el océano constituye la entrada principal de materia orgánica al ecosistema, ya que las tasas de entrada y salida de carbono orgánico en el océano como los ríos, depósitos atmosféricos, evaporación, aerosoles, entre otros, son muy pequeñas. El proceso de producción de materia orgánica se realiza durante el día en la zona fótica, mientras que el consumo de esta materia orgánica por respiración y mineralización la realizan de manera continua en toda la columna de agua. Una porción sustancial de la producción primaria termina siendo transferida a la fracción disuelta como carbono orgánico disuelto (DOC, por sus siglas en inglés) mediante procesos fisiológicos y mecanismos tróficos. El sustrato disuelto orgánico es capturado y consumido principalmente por bacterias y arqueas marinas, quienes lo convierten en biomasa y bióxido de carbono con una eficiencia variable que en gran medida depende de la composición química del DOC (Williams, 2000).

Asociar las distribuciones geográficas de los microorganismos con las condiciones ambientales ayuda a entender los vínculos entre la estructura, función y procesos de los ecosistemas de las comunidades microbianas, permitiendo predecir los cambios biogeoquímicos en el océano a medida que cambian las condiciones ambientales. Dada su importancia en la zona fótica del océano, es imprescindible entender las distribuciones de taxones microbianos fotótrofos clave en el océano para predecir patrones biogeográficos de diversidad genética y funcional (Ladau et al., 2013).

Un hallazgo importante en el campo de la oceanografía microbiana fue el descubrimiento de la gran abundancia de microorganismos fotótrofos en los océanos. Eiler (2006), define a los fotótrofos como organismos capaces de utilizar energía electromagnética (fotones) como fuente para producir energía química (ATP y compuestos orgánicos). Existen dos tipos principales de fotótrofos en las comunidades microbianas marinas: el primero son los autótrofos que utilizan el dióxido de carbono (CO_2) como fuente de carbono (Madigan et al., 2006). El pigmento principal captador de luz es la clorofila-*a* (chl-*a*) y, los principales microorganismos que contienen este pigmento en ambientes marinos son las cianobacterias (Chisholm et al., 1988). El segundo son los heterótrofos que obtienen el carbono a partir de compuestos orgánicos (Madigan et al., 2006).

Un gran porcentaje de estos organismos heterótrofos, son además fotótrofos facultativos o fotoheterótrofos, es decir, que pueden utilizar la luz como fuente de energía complementaria. Los pigmentos utilizados por los microorganismos fotoheterótrofos son la clorofila, bacterioclorofila y las rodopsinas microbianas o proteorodopsinas (Eiler, 2006; Béjà et al., 2000). Las proteorodopsinas absorben luz a través del cromóforo retinal y funcionan como bombas de protones impulsadas por luz, generando un potencial de membrana que puede ser utilizado para la síntesis de ATP y confiere a las células varias ventajas fisiológicas, como un mayor crecimiento o supervivencia en la luz (Gómez-Consarnau et al., 2007; Gómez-Consarnau et al., 2010; Akram et al., 2013).

Aunque la gran abundancia de microorganismos en estas comunidades microbianas en el océano es conocida desde hace varias décadas (Hobbie et al., 1977), existen aún varios interrogantes sobre su fisiología y ecología que siguen sin respuesta. Estudios como los de Gómez-Consarnau et al. (2007) sugieren que la fototrofia mediante proteorodopsinas puede proveer cantidades críticas de energía, no solo para la respiración y el mantenimiento, sino también para el crecimiento activo del bacterioplancton marino en su medio natural. Un estudio posterior menciona que el mayor crecimiento observado en Flavobacterias que albergan proteorodopsinas en la luz se debe al uso de la fuerza motriz de protones (pmf) generada por proteorodopsinas, en este caso para potenciar la absorción de vitamina B_{12} , esencial

para el metabolismo central del carbono (Gómez-Consarnau et al., 2016). Las proteorodopsinas son una adaptación vital en una cepa de *Candidatus Pelagibacter Ubique* (perteneciente al grupo SAR11, considerado el más abundante en el océano) durante la carencia de carbono orgánico, una condición que ocurre con frecuencia en ambientes oceánicos oligotróficos (Steindler et al., 2011). En resumen, las comunidades microbianas en la zona fótica poseen potencial fototrófico, y muchas contienen genes de proteorodopsinas, los cuales desempeñan un papel importante bajo condiciones oligotróficas (Finkel et al., 2013; Dubinsky et al., 2017). Los grupos bacterianos marinos que contienen proteorodopsinas en los océanos suelen estar dominados por tres clados: *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidetes* (Britschgi & Giovannoni, 1991; Kirchman, 2002; Giovannoni, 2017).

Bacterias pertenecientes al clado SAR11 (orden *Pelagibacterales*, clase *Alphaproteobacterias*) fueron los primeros microorganismos (no cultivables en su momento) que se descubrieron con los métodos de secuenciación de ADN para el estudio de la diversidad microbiana marina (Giovannoni et al., 1990). La terminación SAR11 se origina del prefijo SAR se refiere al Mar de los Sargazos, ambiente de donde se extrajo el ADN, y SAR11 fue el undécimo clon de la primera biblioteca de amplicón del gen 16S ARNr. Las bacterias de este clado son de vida libre y crecimiento lento, adaptadas metabólicamente a bajas concentraciones de nutrientes (Rappé et al., 2002), tienen genomas pequeños y oxidan la materia orgánica disuelta (DOM; Giovannoni, 2017). La mayoría de los miembros de SAR11 tienen proteorodopsinas y, aunque los primeros estudios no observaron ventajas de la fotoheterotrofia en cuanto a las tasas de crecimiento o el rendimiento celular de la cepa HTCC1062 (*Pelagibacter ubique*; Giovannoni et al., 2005), investigaciones posteriores demostraron que la exposición a la luz en esta cepa puede promover una reducción de las tasas de respiración, un aumento de síntesis de ATP y un aumento en la tasa de incorporación de ciertas moléculas orgánicas, como el aminoácido taurina (Steindler et al., 2011).

Los microorganismos del clado SAR86 son heterótrofos marinos ubicuos en aguas superficiales. El término SAR86 se refiere a un clado de *Gammaproteobacteria* observado en bibliotecas de clones construidas a partir de comunidades microbianas de la superficie del océano (Britschgi & Giovannoni, 1991). A pesar de su ubicuidad en los sistemas marinos, hoy día todavía no existen representantes cultivables del clado SAR86, por lo tanto, el conocimiento del papel ecológico en las comunidades microbianas marinas se encuentra limitado a la evidencia de los genomas a partir del ensamblaje metagenómico. El gen de proteorodopsinas se encontró por primera vez en un fragmento del genoma derivado de una γ -proteobacteria marina no cultivada del grupo SAR86 mediante el uso de técnicas de genómica ambiental (Béjà et al., 2000).

El orden Flavobacteriales, pertenece al phylum Bacteroidetes, y lo forman bacterias que se caracterizan por ser abundantes durante los florecimientos algales, donde tienen un papel importante en la degradación de la materia orgánica (MO; DeLong et al., 1993). La primera bacteria con proteorodopsinas en la que se observó un aumento en el crecimiento bajo la exposición a la luz pertenecía a una flavobacteria (*Dokdonia* sp. cepa MED134; Gómez-Consarnau et al., 2007). El propósito de esta tesis es identificar los patrones de distribución de pigmentos fototróficos y su relación con las comunidades microbianas heterotróficas de la corriente de California. La abundancia y diversidad de las proteorodopsinas en las aguas superficiales oceánicas indican que estos genes desempeñan un papel importante en la captación de energía lumínica (Gómez-Consarnau et al., 2019).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Fotoheterotrofia mediante proteorodopsina

Las rodopsinas son proteínas transmembranales que captan luz unidas covalentemente al cromóforo retinal y se encuentran en los tres dominios de la vida: Eucarya, Bacteria y Archaea. Las rodopsinas pueden ser clasificadas en dos familias distintas: las rodopsinas de tipo 1 son microbianas y se encuentran en algunas haloarqueas extremas, bacterias y microorganismos eucariotas; las rodopsinas de tipo 2 son las visuales y se encuentran en los ojos de todo el reino animal (Spudich et al., 2000).

Al igual que las rodopsinas de las arqueas, la proteorodopsina es una proteína de membrana integral bacteriana que, unida a un cromóforo de retinal, funciona como una bomba de protones impulsada por la luz (Figura 1; Béjà et al., 2000). Los genes de proteorodopsinas se encuentran ampliamente distribuidos y son abundantes en las aguas marinas de todos los océanos. Estos genes se han detectado en más de un 80% de los procariontes que viven en la superficie del océano, pero las estimaciones de los estudios varían dependiendo de la región oceánica y del método de detección (Marchetti et al., 2015; Dubinsky et al., 2017; Sieradzki et al., 2018).

Aunque los métodos genómicos proporcionan información sobre los procesos que pueden ser relevantes en el océano, no proporcionan estimas cuantitativas de estos procesos en el medio natural. Por ejemplo, cuando se quiere estimar la productividad primaria en el océano, se cuantifican los niveles de clorofila en el agua, o las tasas de fijación de CO₂, en lugar de estudiar los genes responsables de la síntesis de los

fotosistemas. Gómez-Consarnau et al. (2019) publicaron el primer método para cuantificar proteorodopsinas en agua de mar a través de su pigmento, el retinal. Gracias a este estudio, se concluyó que las proteorodopsinas son un importante mecanismo de transducción de energía para recolectar energía solar en la superficie del océano. Más allá de este estudio, cuantificaciones ambientales de retinal en combinación con estudios de comunidad microbiana están permitiendo conocer la magnitud de los procesos fototróficos en el agua, además de identificar las bacterias potencialmente responsables de este metabolismo.

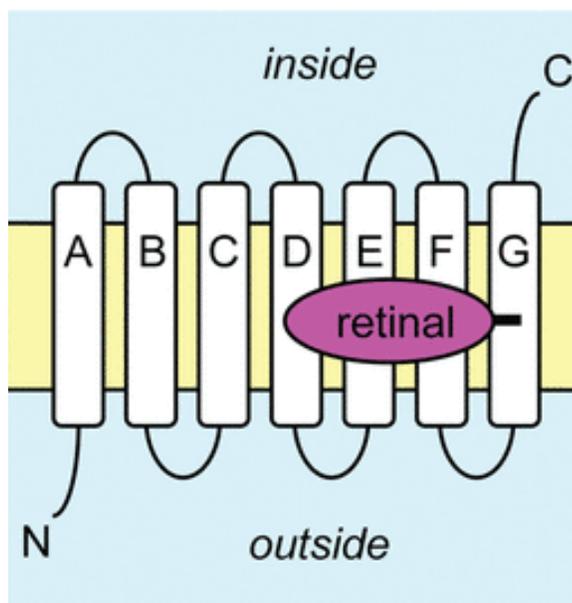


Figura 1. Estructura de rodopsina microbiana. Esta proteína contiene siete hélices α , a través de la membrana celular, el retinal unido covalentemente en la hélice G, el extremo N hacia el exterior y el extremo C hacia el interior de la célula (Ernst et al., 2014).

En el estudio de Villarreal (2021), se encontró una relación entre los niveles de clorofila y la abundancia bacteriana de ciertos grupos taxonómicos con la presencia de proteorodopsinas en el agua de mar colectada en la cuenca del Sur de California en incubaciones de enriquecimiento con nutrientes en un mesocosmos de 20 días. En esta investigación, mediante estudios de pigmentos (retinal y clorofila) y la estructura de las comunidades microbianas se observó que el orden Flavobacteriales fue el principal contribuyente de los niveles altos de proteorodopsinas en ambientes productivos y demostró que las bacterias fotoheterótrofas con tamaño menor a $3 \mu\text{m}$ son las principales productoras de proteorodopsinas. Sin embargo, se desconoce si existen relaciones similares entre la abundancia de estos metabolismos fototróficos y la presencia de grupos microbianos en el agua natural, especialmente en regiones que presentan gradientes naturales de nutrientes y productividad primaria.

1.1.2 Estudios de comunidades microbianas mediante el gen 16S ribosomal

El análisis de secuencias del gen ribosómico ARNr 16S se ha utilizado como una poderosa herramienta para evaluar la diversidad genética de muestras ambientales. Los ribosomas procariotas son orgánulos encargados del complejo proceso de síntesis de proteínas. Están formados por dos subunidades con distintos coeficientes de sedimentación. La subunidad mayor se caracteriza por tener un coeficiente de sedimentación de 50S, y consta de dos moléculas de ARN ribosomal (ARNr 5S, 23S) y 34 proteínas. La subunidad menor formada tiene un coeficiente de sedimentación del 30S, y está formada por una molécula ARNr (16S) y 21 proteínas (Fukuda et al., 2016).

El gen que codifica la secuencia de ARNr 16S procariota es un polirribonucleótido de una longitud de aproximadamente 1500 nucleótidos, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), y es utilizado como poderoso marcador universal. Contiene nueve regiones (V1-V9) hipervariables, que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía, además consta de regiones conservadas facilitando el diseño de cebadores (o *primers*, en inglés) universales que permiten la amplificación de estas regiones hipervariables (Baker et al., 2003).

La amplificación por PCR del gen 16S de microorganismos que aún no se pueden cultivar ha brindado una valiosa perspectiva sobre nuestra comprensión de la estructura de la comunidad, especialmente en ambientes donde las condiciones de crecimiento resultan difíciles de imitar en el laboratorio. Las regiones V4-V5 son las más utilizadas para estudios taxonómicos debido a su destacada capacidad para distinguir entre diferentes especies bacterianas (Yang et al., 2016). En este estudio, se eligieron específicamente estas regiones hipervariables por su eficiencia y precisión en la discriminación de la biodiversidad bacteriana.

1.1.3 Sistema de la corriente de California

El sistema de la corriente de California (SCC) está ubicado desde el sur de Canadá hasta la península de Baja California. Es una corriente de frontera Este del Pacífico Norte con dirección hacia el Ecuador, es reconocida como una de las áreas de surgencias más importantes y productivas del mundo. Las surgencias costeras son procesos oceanográficos de movimientos ascendentes de agua fría subsuperficial de entre 100 a 150 metros y rica en nutrientes (nitratos, fosfatos y silicatos) hacia la zona fótica, lo que resulta en una alta productividad primaria. Estas surgencias son generadas por los vientos del noroeste, que ejercen

una fuerza sobre la superficie oceánica (transporte de Ekman) y debido a la rotación de la Tierra en el hemisferio Norte, el efecto Coriolis desvía el agua hacia el oeste, alejándola de la costa y facilitando el ascenso (Kämpf & Chapman, 2016).

Por su origen subártico la temperatura de esta corriente es relativamente fría (10 - 20 °C), la salinidad es baja (32.5 - 33.8 UPS), densidades entre 24.5 a 25.5 kg/m³ y se caracteriza por el alto contenido de oxígeno disuelto (Lynn & Simpson, 1987; Thomas & Strub, 1990; Durazo, 2015). La corriente de California presenta un potencial para la identificación de comunidades microbianas con rodopsinas adaptadas a regiones productivas.

1.1.4 IMECOCAL

El programa oceanográfico IMECOCAL (Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California, 2023) que inició en 1997, continuó con las investigaciones del programa CalCOFI (1950 - 1972). Consiste en proporcionar información detallada sobre los procesos físicos y biológicos de la corriente de California, mejorando así la comprensión de la dinámica del ecosistema marino en el área mexicana frente a la península de Baja California.

Durante los cruceros oceanográficos en cada estación, se realizan lances de CTD, arrastres de red Bongo, se determinan los niveles de oxígeno disuelto y nutrientes y se registran la temperatura, salinidad, fluorescencia y las corrientes marinas. Además de sus actividades regulares, en ocasiones participan investigadores en los cruceros oceanográficos que realizan muestreos adicionales con objetivos específicos, como la identificación de comunidades microbianas y la cuantificación de pigmentos. Estos estudios enriquecen la base de datos del IMECOCAL y mejoran la comprensión de los procesos biológicos y ecológicos en la región.

1.2 Justificación

Esta tesis se fundamenta en la investigación realizada por Villarreal (2021), la cual se enfocó en entender la interacción de la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento del fitoplancton y los microorganismos que poseen proteorodopsinas en un sistema experimental controlado de alta productividad. Las proteorodopsinas son ampliamente expresadas entre las bacterias marinas y la fototrofia a través de estas

proteínas les confiere una ventaja energética a los microorganismos que la poseen, lo que representa un mecanismo especialmente beneficioso en la superficie del océano. Estudiar la distribución de las comunidades microbianas adaptadas a estos ambientes en combinación con los niveles de fototrofia en el agua (es decir, los niveles de proteorodopsinas mediante la cuantificación de retinal) permitirá entender la importancia de la fototrofia mediante proteorodopsinas, especialmente en ambientes que presentan regiones con gradientes naturales de nutrientes y materia orgánica.

1.3 Hipótesis

La abundancia y distribución de las comunidades microbianas con distintas capacidades fotoheterotróficas están asociadas a regiones con diferentes niveles de productividad. Similar a los patrones observados por Villarreal (2021) en un sistema experimental controlado, regiones marinas de alta productividad tendrán altos niveles de fotoheterotrofia mediante proteorodopsinas. Además, las bacterias del orden Flavobacteriales serán los principales grupos asociados con altos niveles de retinal en la superficie oceánica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Analizar las comunidades microbianas fotoheterótrofas e identificar sus patrones de distribución de pigmentos en la región de surgencia de la corriente de California, colectadas en el crucero IMECOCAL 1911.

1.4.2 Objetivos específicos

- Analizar las distribuciones de rodopsina en aguas superficiales de la región de estudio.
- Determinar la estructura de las comunidades microbianas en esta región.
- Identificar los principales grupos microbianos fotoheterótrofos capaces de producir rodopsinas en

estas aguas y sus patrones de distribución de acuerdo con otros parámetros ambientales (por ejemplo, niveles de clorofila, salinidad, temperatura, etc.).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio y toma de muestras

El crucero IMECOCAL 1911 tuvo lugar a bordo del buque oceanográfico Alpha Helix del 30 de noviembre al 06 de diciembre del 2019. La nomenclatura 1911 indica que fue iniciado en noviembre (11) del año 2019 (19). Esta campaña cubrió la región del Pacífico oriental frente a la península de Baja California desde la zona costera hasta 320 km costa afuera en la parte más occidental y cubrió desde los 28° hasta los 32° N y desde los 118° hasta 115° E (Figura 2). Se tomaron muestras en un total de 39 estaciones realizando el mismo número lances de CTD (Conductivity, Temperature and Depth) modelo SBE-911 *plus*, por Sea-Bird Electronics Inc., el cual consiste en una unidad submarina (SBE-9*plus*) y una unidad de control en cubierta (SBE-11*plus*). La unidad SBE-911 *plus* está ensamblada junto a los sensores y una roseta SBE para la determinación de los parámetros de oxígeno disuelto y clorofila.

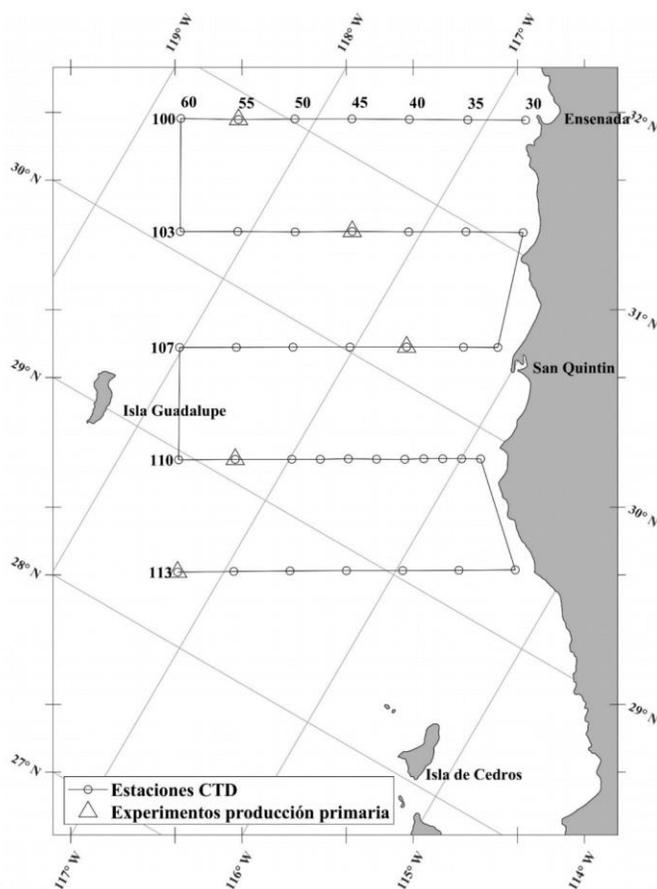


Figura 2. Área de estudio de las estaciones para la campaña IMECOCAL 1911. La línea continua entre estaciones indica la ruta de navegación, comienza en la estación 100.30 y finaliza en la estación 113.60.

Para el análisis de cuantificación de pigmentos y ARNr 16S de comunidades microbianas, las muestras se colectaron en la superficie del océano. Para separar las células de distinto tamaño, se implementó un proceso de filtración secuencial mediante una bomba peristáltica. Se utilizaron filtros de policarbonato (PC) de 47 mm de diámetro para fracciones de tamaño microbiano de 10 μm (microplancton), 3 μm (nanoplancton) y cartucho Sterivex para 0.2 μm (picoplancton). Los filtros de PC con las muestras se guardaron en crioviales de 2 ml. Se conservaron en nitrógeno líquido durante la campaña oceanográfica para garantizar la preservación de las muestras. Finalmente, las muestras se trasladaron a un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis en laboratorio. Las fechas de muestreo y la ubicación geográfica de las estaciones muestreadas se muestran en la Tabla 2.

2.2 Cuantificación de pigmentos

El estudio de la cuantificación de pigmentos (i.e., clorofila y retinal) permite estimar la magnitud de los procesos de fototrofia. Para cuantificar el retinal y la clorofila- α , para ello se filtraron 8 L de agua de mar, agregando 50 ml de agua mili Q en el sistema. Las muestras fueron enviadas a la Universidad del Sur de California en Los Ángeles California, EE. UU., para su posterior análisis.

Los pigmentos fueron extraídos de los filtros utilizando metanol, siguiendo el procedimiento de Garrido & Roy (2015). Para obtener la concentración de clorofila- α , se realizó una cuantificación fluorométrica mediante el método descrito por Knap et al. (1996) con la modificación de no realizar la acidificación, utilizando un fluorómetro de laboratorio marca Turner Designs 10AU. Las concentraciones de retinal se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) siguiendo el método propuesto por Gómez-Consarnau et al. (2019) y Hassanzadeh et al. (2021). Los mapas se crearon utilizando el programa Ocean Data View (ODV) versión 5.5.2.; un software utilizado para visualizar y analizar datos oceanográficos (Schlitzer, 2022).

2.3 Extracción de ADN genómico de las comunidades microbianas

Para analizar la comunidad microbiana en las muestras ambientales, con un enfoque especial en el gen 16S ARNr que proporciona información detallada sobre la composición taxonómica. Los filtros de PC de distintos tamaños de poro conservados en tubos crioviales y los cartuchos Sterivex se acondicionaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su descongelación paulatina y así preservar la integridad de las muestras. La extracción de ADN se

realizó utilizando el protocolo Fenol-Cloroformo, modificado de Wright et al. (2009). Los filtros de PC se extrajeron de los tubos crioviales con pinzas estériles, en el caso de los Sterivex se siguieron las indicaciones de la metodología de extracción específica descrita por Cruaud et al. (2017) para la ruptura física del cartucho utilizando un cortador de tuberías de PVC y la recuperación del filtro. Las muestras fueron preservadas a -20 °C.

La concentración del ADN se estimó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific®. Se utilizó el buffer TE (Tris-EDTA) como blanco para la medición. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ADN. El gel se corrió durante 10 minutos a 50 volts y 40 minutos a 80 volts con Buffer TBE. Las imágenes de la electroforesis se procesaron utilizando el programa IMAGELAB (BIO-RAD), este paso facilita la interpretación y análisis de la integridad del ADN visualizado en el gel.

Una vez verificada la concentración y la calidad, las muestras fueron enviadas a la compañía Novogene donde se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de la región V4-V5 del gen 16S ARNr para detectar los dominios Archaea y Bacteria (Parada et al., 2016). Se utilizaron los cebadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 926R (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT) para la amplificación, y la secuenciación se realizó usando la plataforma Illumina Nova.

2.4 Análisis bioinformático y estadístico

Los datos de secuenciación se procesaron utilizando un flujo bioinformático usando el lenguaje R, versión 4.3.1, en RStudio, haciendo uso de la paquetería del programa DADA2 versión 1.30.0 (Callahan, 2016). DADA2 se encargó de filtrar la calidad de las secuencias, emparejar lecturas y eliminar quimeras para generar variantes de secuencia de amplicón (ASVs, *Amplicón Sequence Variant*). Los análisis de diversidad alfa de las comunidades procariontas, así como la gráfica de abundancia relativa se realizaron con el programa Phyloseq versión 1.46.0 (McMurdie & Holmes, 2013). Para la asignación taxonómica, se utilizó la versión 138.1 (actualización 2023) de la base de datos Silva del gen 16S ARNr como referencia. Además, se eliminaron del conjunto de datos todos los ASVs asignados taxonómicamente a mitocondrias y cloroplastos (microalgas), con el fin de analizar sólo la comunidad procarionte.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Distribución de pigmentos en aguas superficiales de la región de estudio

Para obtener la concentración total superficial de clorofila-*a* y proteorodopsina (retinal), se realizó la suma de las concentraciones obtenidas en las diferentes fracciones de plancton microbiano 0.2 μm (tamaño de microorganismos entre 0.2 y 3.0 μm), 3 μm (tamaño de microorganismos entre 3.0 y 10 μm) y 10 μm (tamaño de microorganismos >10 μm), a lo largo del transecto del crucero oceanográfico IMECOCAL 1911.

La comparación entre los niveles de proteorodopsinas y clorofila-*a* es particularmente relevante ya que ambos pigmentos desempeñan un papel crucial como transductores de energía solar capturada en el ambiente marino.

3.1.1 Clorofila-*a*

En las concentraciones de clorofila-*a* total, se observó una heterogeneidad en las distintas estaciones de muestreo. En general la clorofila-*a* varió entre 40 y 442 pM (Figura 3), la concentración más alta se registró en la estación 107.32.

La mayoría de los pigmentos se encuentran en las fracciones más pequeñas de bacterioplancton; en la Figura 4 se muestra que la fracción de tamaño entre 3.0 y 0.2 μm presentó las concentraciones más altas, excepto en la estación 113.30 donde constituyó solo un 26%, en el resto de las estaciones dominó esta fracción con un máximo de 91% en la estación 110.50.

La Figura 5 muestra el mapa de la distribución de clorofila-*a* en la superficie oceánica, con un gradiente de colores donde los tonos más cálidos representan mayores concentraciones, mientras que los tonos más fríos indican concentraciones más bajas, en picomoles (pM). Se observó que las áreas de mayor concentración se encuentran cercanas a la costa, predominantemente en las proximidades de San Quintín, con una disminución gradual hacia fuera de la costa.

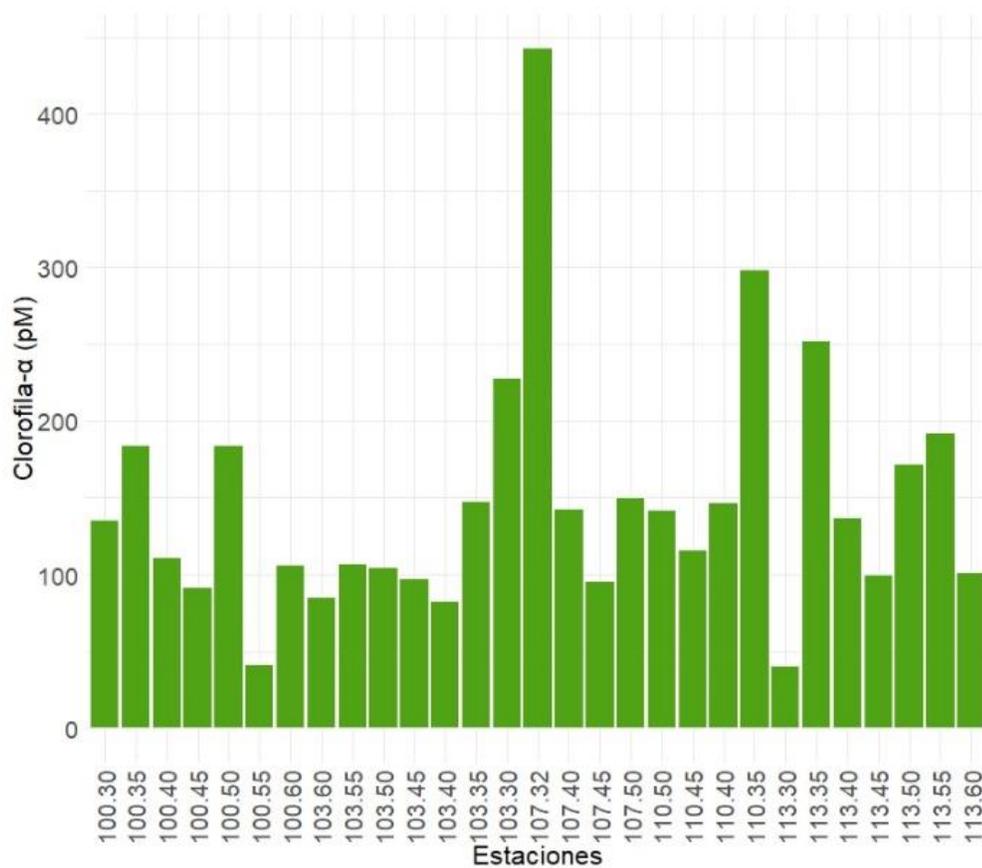


Figura 3. Concentraciones de clorofila-*a* total (pM) en las estaciones del IMECOCAL 1911.

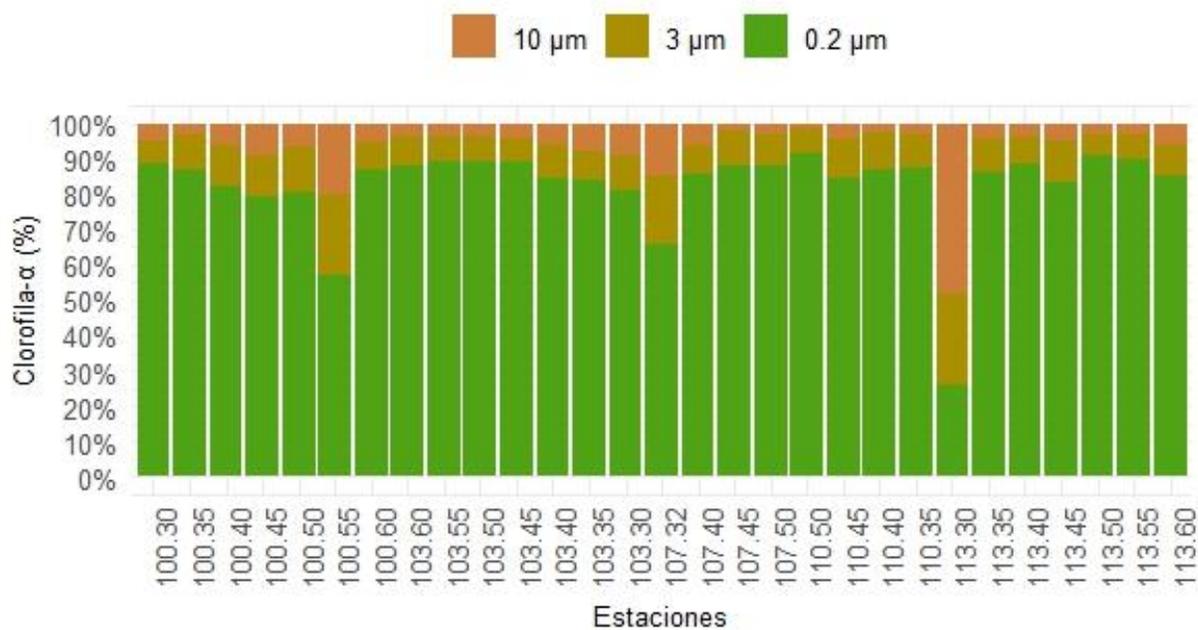


Figura 4. Porcentaje de concentración de la clorofila-*a* total (pM) en las diferentes fracciones de tamaño de microorganismos analizadas: 0.2 a 3.0 μm, 3.0 a 10 μm y >10 μm.

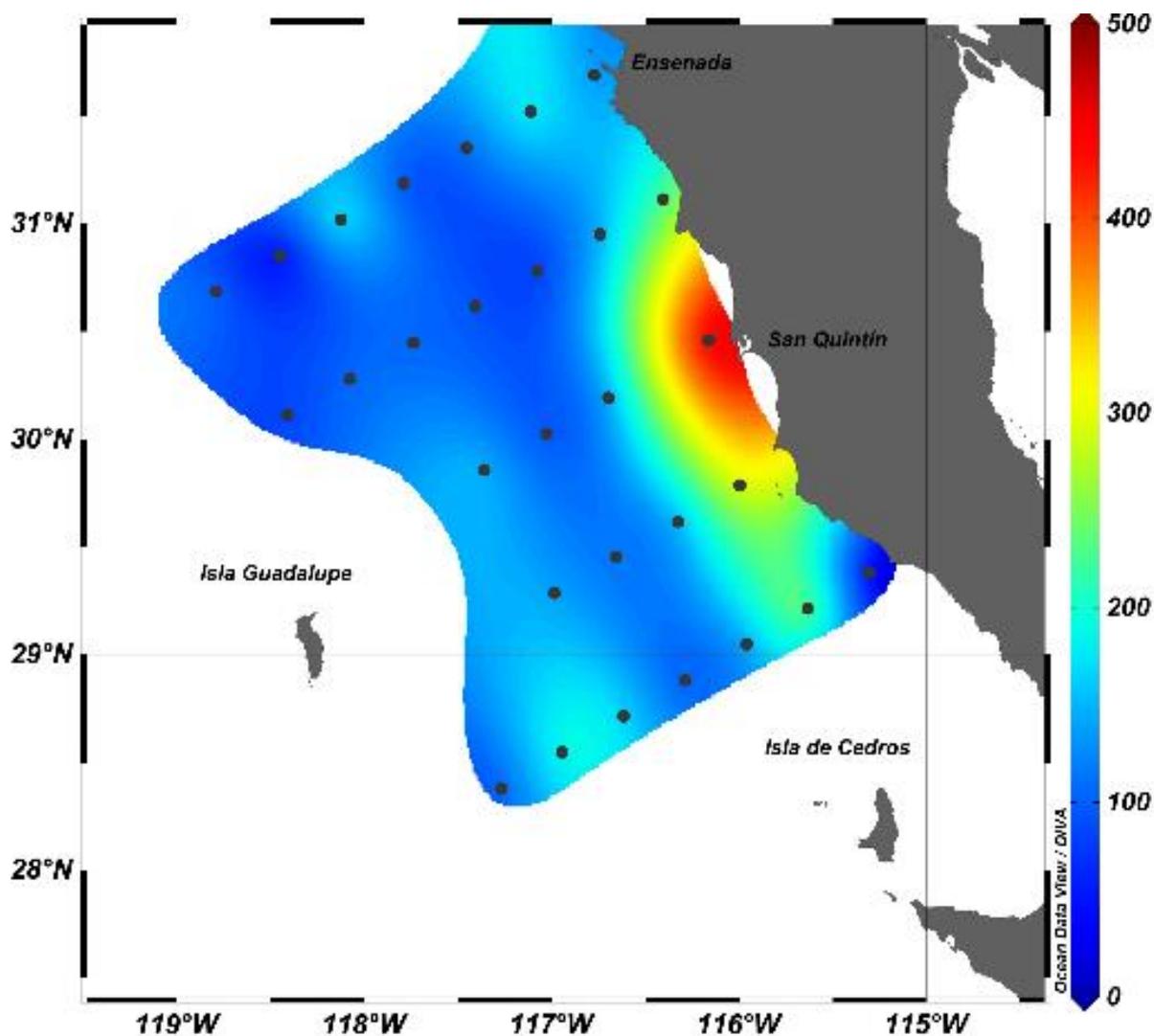


Figura 5. Mapa de la distribución de la clorofila- a total (pM) superficial. La escala de color indica la concentración de la clorofila- a . Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

3.1.2 Proteorodopsina

Las concentraciones de proteorodopsina total oscilaron entre 4 y 30 pM (Figura 6), en la estación 113.35 se registró la concentración más alta. Las mayores concentraciones coinciden con las altas concentraciones de clorofila- a en la fracción entre 3.0 y 0.2 μm (Figura 7), con el 50% en la estación 100.55 y el 93% en la estación 110.50.

La Figura 8 muestra el mapa de la distribución geográfica de la concentración de proteorodopsina total, las altas concentraciones se registraron tanto en las zonas cercanas a la costa como en las zonas alejadas de la costa.

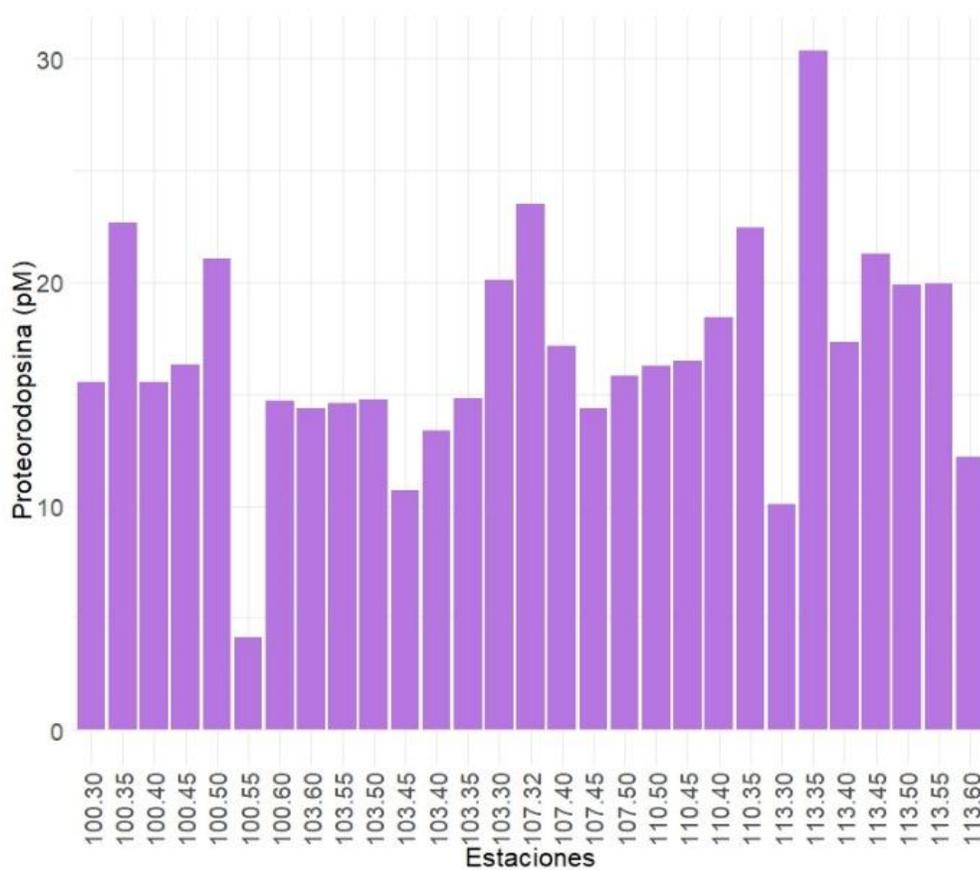


Figura 6. Concentraciones de proteorodopsina total (pM) en las estaciones del IMECOCAL 1911.

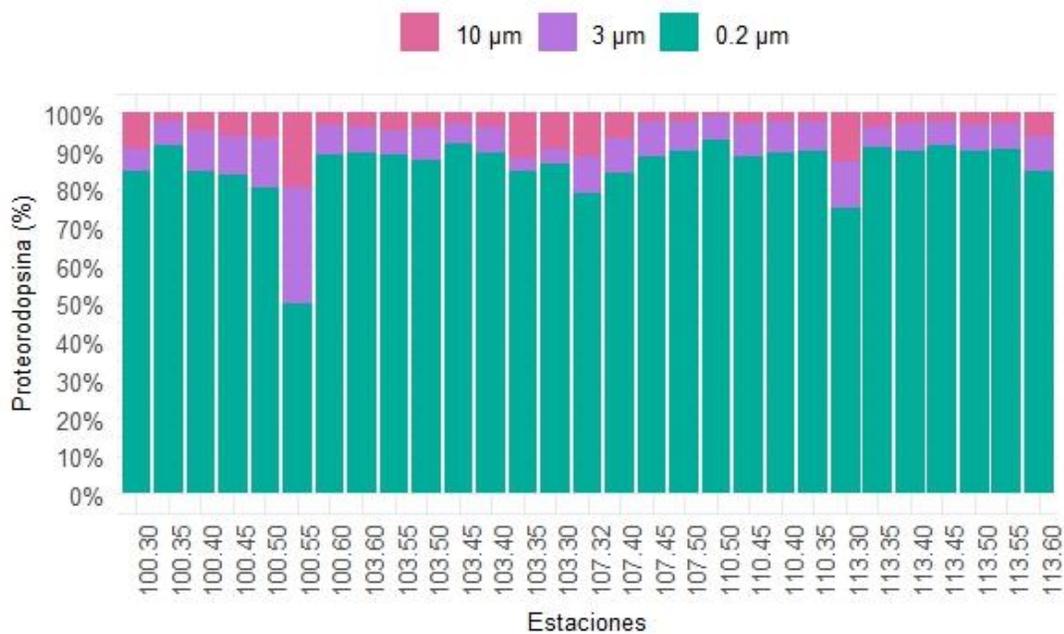


Figura 7. Porcentaje de concentración de proteorodopsina total (pM) en las diferentes fracciones de tamaño de microorganismos analizadas: 0.2 a 0.3 μm , 3.0 a 10 μm y >10 μm .

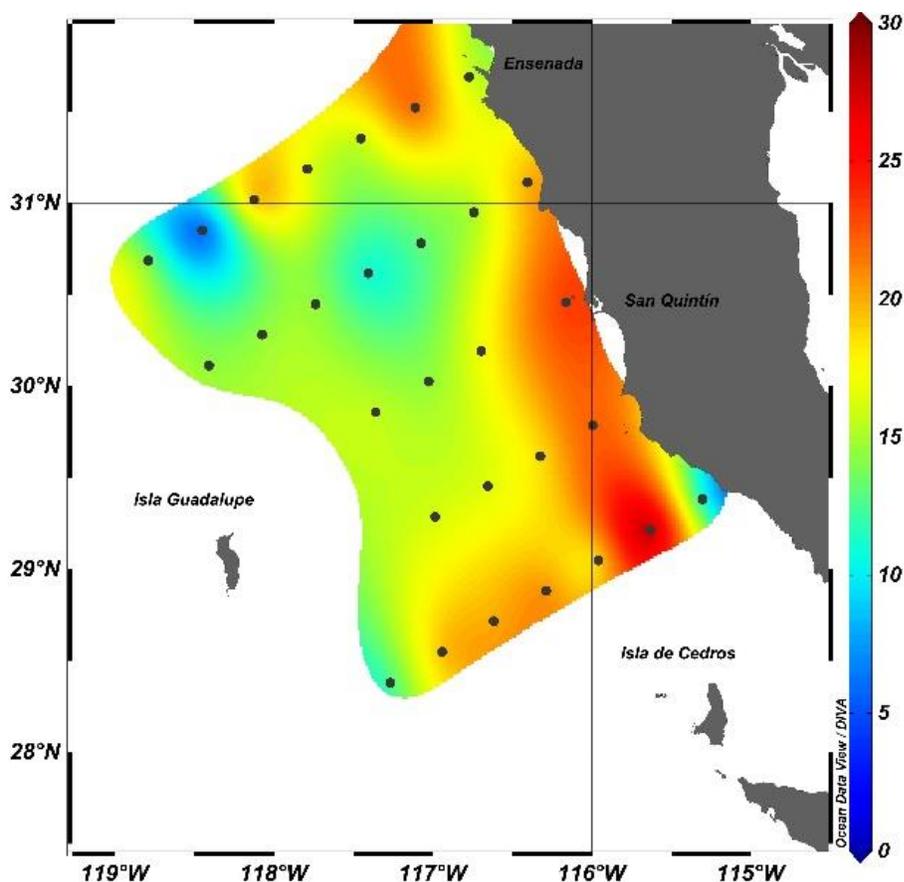


Figura 8. Mapa de la distribución de la proteorodopsina total (pM) superficial. La escala de color indica la concentración de la proteorodopsina. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

3.2 Parámetros ambientales

Las variables fisicoquímicas del agua de mar superficial, en las diferentes estaciones de muestreo del crucero IMECOCAL 1911, proporcionan una comprensión de la variabilidad de las condiciones oceanográficas en la región de estudio. La estación 113.55 registró la temperatura máxima de 19.69 °C y con valor mínimo en la estación 100.55 de 16.91 °C (Figura 14). La concentración máxima de oxígeno disuelto se observó en la misma estación donde se obtuvo el mínimo de temperatura (100.55) y fue 5.47 ml/l, la mínima se presentó en la estación 113.45 (5.15 ml/l; Figura 15). Para la salinidad el valor máximo fue 33.97 PSU y se encontró en la estación 113.40, el valor mínimo (33.39 PSU) en la estación 103.60 (Figura 16). La máxima densidad se registró en la estación 100.55 con un valor de 24.33 kg/m³, la estación 110.50 presentó la densidad mínima con un valor de 24.02 kg/m³ (Figura 17).

En el Anexo se muestran los mapas de los parámetros ambientales utilizados en este trabajo que incluyen datos hasta los 10 metros de profundidad (Figura 14 a 17).

3.3 Relación entre clorofila- α , proteorodopsina y parámetros ambientales

El análisis de los parámetros ambientales y su relación con los pigmentos fotosintéticos clorofila- α y proteorodopsina total, se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. En la Figura 9 se presenta una matriz de estas correlaciones donde las correlaciones positivas están representadas con una gama de colores fríos (azul) y las negativas con colores cálidos (rojo). La Figura 10 muestra una correlación positiva ($r = 0.83$) y muy altamente significativo ($P < 0.001$) entre la concentración de clorofila- α y la proteorodopsina, lo que indica que regiones con altas concentraciones de clorofila- α tienden también a tener altas concentraciones de proteorodopsina.

La proteorodopsina presentó correlaciones estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con varias de las variables ambientales. Estas fueron positivas con temperatura y salinidad, y una correlación negativa con el oxígeno disuelto. En el caso de la clorofila- α , solo se identificó una correlación positiva con la salinidad, y una correlación negativa con el oxígeno disuelto. La temperatura presentó una correlación positiva con la salinidad y correlaciones negativas con el oxígeno disuelto y densidad. El oxígeno disuelto presentó una correlación positiva con la densidad y una correlación negativa con la salinidad (Figura 9 y Tabla 3 en Anexo). Los gráficos de dispersión se muestran en el Anexo.

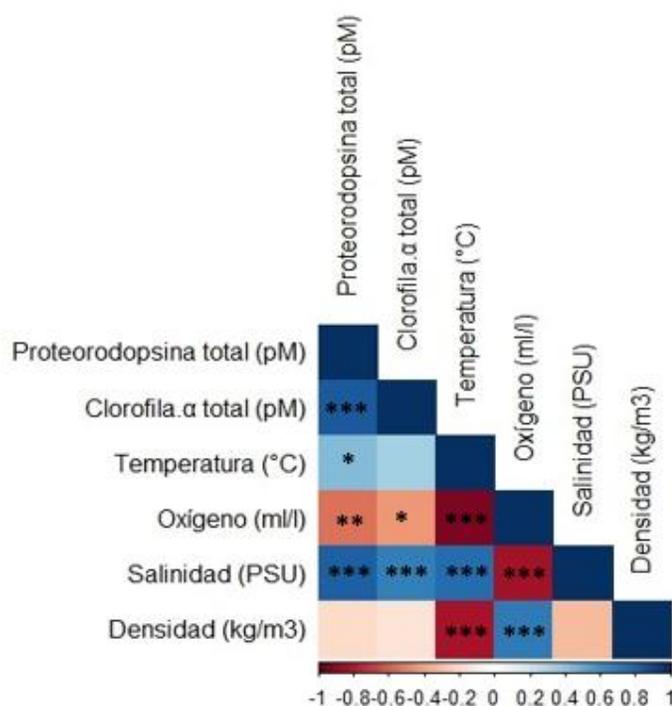


Figura 9. Heatmap de correlaciones r de Spearman entre pigmentos y parámetros ambientales. Los recuadros con asteriscos (***) para valor $P < 0.001$, ** para valor $P < 0.01$ y * para valor $P < 0.05$) representan las correlaciones estadísticamente significativas.

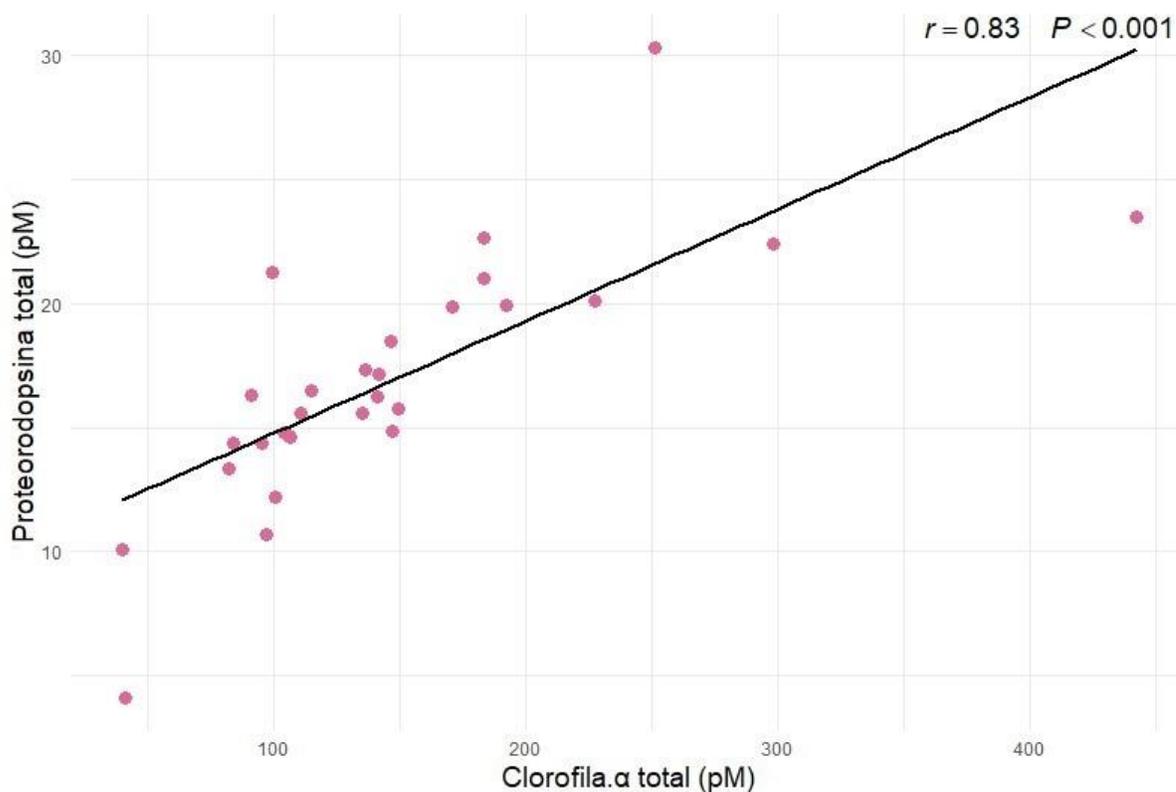


Figura 10. Gráfico de dispersión, correlación entre proteorodopsina y clorofila *a* totales.

3.4 Análisis de las comunidades microbianas

En el presente estudio, se pretendía inicialmente extraer ADN de los filtros de las fracciones de 0.2, 3.0 y 10 μm . Sin embargo, las muestras de 3.0 y 10.0 μm presentaron signos de degradación, así que se procesó únicamente la fracción de 0.2 μm para garantizar la obtención de amplicones 16S ARNr de calidad para su posterior secuenciación.

De las muestras procesadas, se obtuvo un total de 5 759 590 secuencias crudas que corresponden a las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S ARNr de los dominios Bacteria y Archaea (Tabla 4 en Anexo). Después las secuencias se sometieron a un proceso de filtrado, “denoising” y pareado, que incluyó la eliminación de secuencias de baja calidad y quimeras.

Como resultado, se recuperaron 3 315 094 secuencias, lo que representó aproximadamente un 58% de eficiencia. Además, estas secuencias fueron agrupadas en 15 898 ASVs, lo que proporciona una base robusta para la caracterización de la comunidad microbiana presente en las muestras.

3.4.1 Riqueza y diversidad de las comunidades microbianas

Para cada muestra analizada se calcularon los indicadores de diversidad y riqueza; el número total de ASVs observados representan la riqueza. La estación 100.35 presentó el mayor número de ASVs, un total de 2 354, mientras que las demás estaciones oscilaron entre 1 718 y 834. (Figura 11). Las estaciones con terminación .1 corresponden a las muestras colectadas a la profundidad del máximo de clorofila.

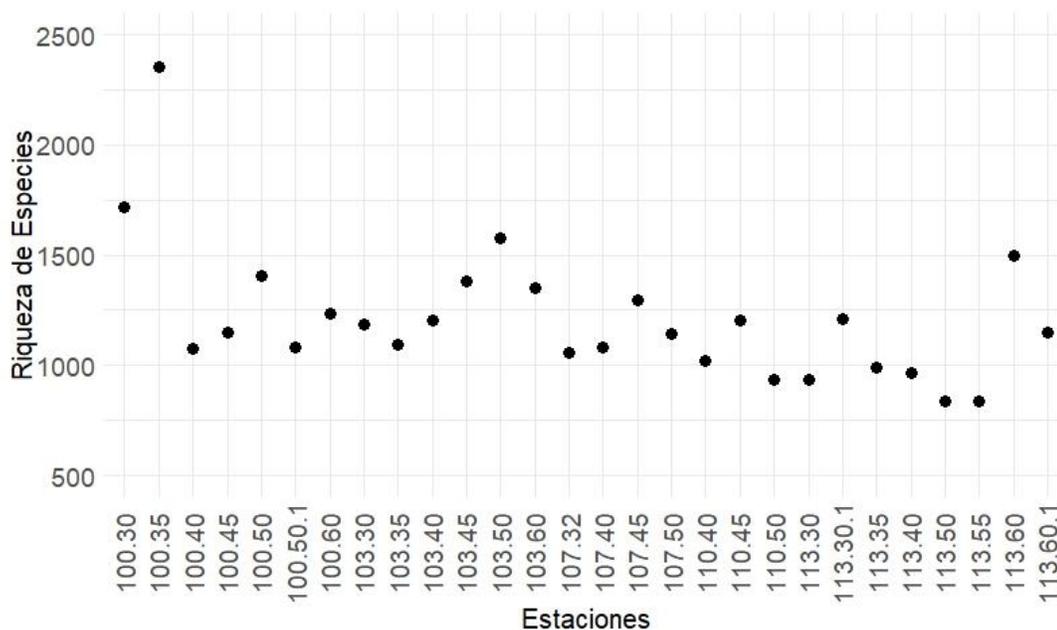


Figura 11. Riqueza de especies evaluada en la fracción 0.2 a 3.0 μm , ASVs observados. Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.

El índice de diversidad de Shannon-Weaver reveló que la estación 100.35 presentó el valor más alto de diversidad, 5.85. En contraste, las demás estaciones presentaron valores similares, que oscilaron entre 3.38 y 5.15, sugiriendo que estas estaciones comparten patrones similares en términos de diversidad de comunidades bacterianas. La estación 113.40 registró el valor más bajo 2.88, indicando una distribución menos equitativa de abundancias (Figura 12).

Se observó una disminución gradual de la diversidad a medida que se avanzó en las estaciones hacia el sur del crucero, la que podría estar relacionada con cambios en las variables oceanográficas a lo largo del gradiente latitudinal influyendo en esta variación de la diversidad bacteriana. En resumen, estos resultados resaltan la heterogeneidad en la diversidad de las comunidades bacterianas a lo largo de las estaciones del IMECOCAL 1911, lo que puede estar influenciado por factores ambientales.

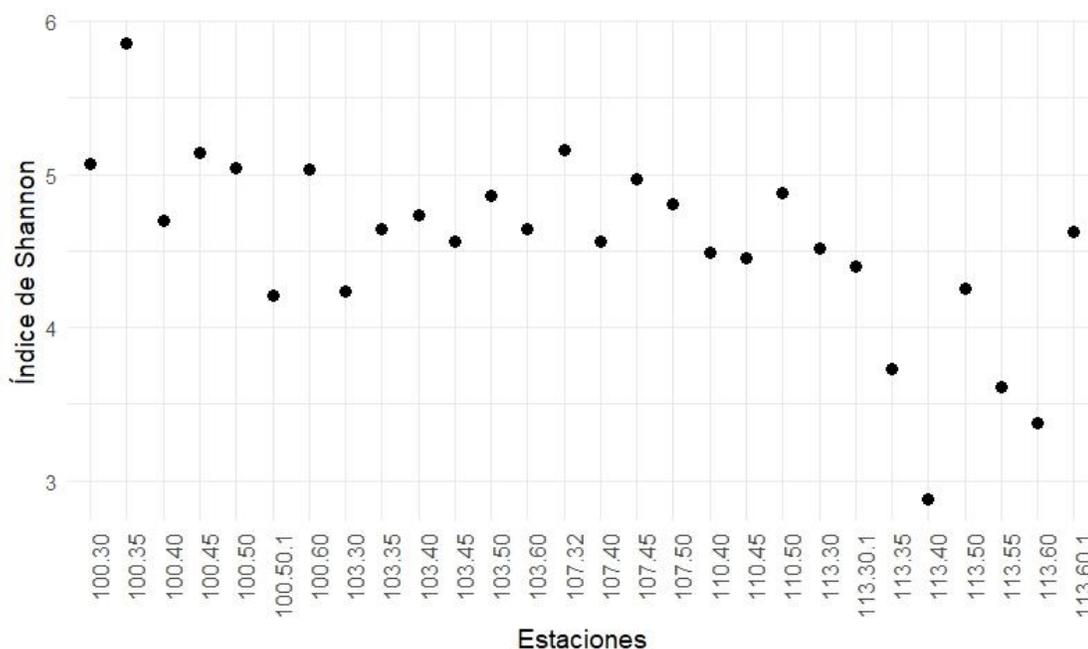


Figura 12. Índice de Shannon-Weaver (diversidad alfa) evaluada en la fracción 0.2 a 3.0 μm . Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.

3.4.2 Estructura de la comunidad microbiana

Al analizar la diversidad microbiana en la fracción 3.0 a 0.2 μm a nivel taxonómico de clase, la mayoría de secuencias se asignaron a los grupos Cyanophyceae, Alphaproteobacteria, Flavobacteriia y Gammaproteobacteria. Sin embargo, para obtener una mayor resolución filogenética, se examinó la abundancia relativa de los grupos taxonómicos de la comunidad bacteriana a nivel de orden. Como se observa en la Figura 13, la comunidad procariota en cada estación fue muy diversa y variada entre las muestras, los órdenes más abundantes identificados en las muestras del IMECOCAL 1911 fueron los Synechococcales, miembros del clado SAR11 y los Flavobacteriales. Los Synechococcales fueron los más predominantes con una abundancia relativa que osciló entre el 6 y 76%. Los microorganismos pertenecientes a este orden son fotoautótrofos. La abundancia relativa de miembros del clado SAR11 osciló entre 2 y 42% y los Flavobacteriales entre 4 y 25%. También se identificaron otros órdenes que contribuyeron en menor medida a la diversidad de la comunidad microbiana en las muestras analizadas. Estos incluyeron a los órdenes Actinomycetales, Rhodobacterales, Burkholderiales, Pirellulales, Alteromonadales, Verrucomicrobiales, Pseudomonadales, Puniceispirillales, Cellvibrionales, Sphingomonadales, Chroococcales, Cytophagales, Xanthomonadales, Lysobacterales, Rhodospirillales, Legionellales. La Tabla 1 presenta las estrategias metabólicas asociadas a las comunidades microbianas del crucero oceanográfico.

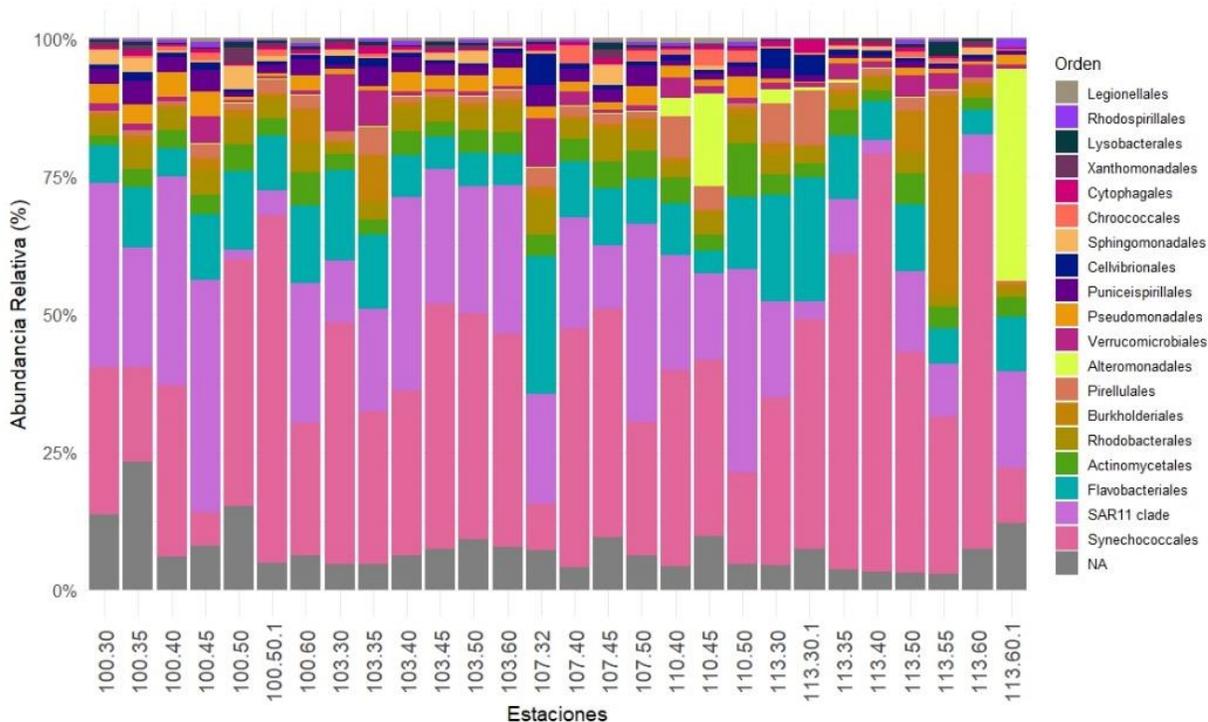


Figura 13. Abundancia relativa a nivel de orden de las comunidades microbianas presentes en la fracción 3.0 a 0.2 μm del cruceo IMECOCAL 1911. Las estaciones que terminan con .1 corresponden a las colectadas en el máximo de clorofila de esa estación.

Tabla 1. Estrategias metabólicas de las comunidades microbianas a nivel de orden del cruceo IMECOCAL 1911.

Orden	Estrategias metabólicas
Synechococcales	Fotoautótrofos
Clado SAR11	Fotoheterótrofos
Flavobacteriales	Fotoheterótrofos
Actinomycetales	Heterótrofos
Rhodobacterales	Fotoheterótrofos
Burkholderiales	Heterótrofos
Pirellulales	Heterótrofos
Alteromonadales	Fotoheterótrofos
Verrucomicrobiales	Fotoheterótrofos
Pseudomonadales	Heterótrofos
Puniceispirillales	Heterótrofos
Cellvibrionales	Heterótrofos
Sphingomonadales	Heterótrofos
Chroococcales	Fotoautótrofos
Cytophagales	Heterótrofos
Xanthomonadales	Heterótrofos
Lysobacterales	Heterótrofos
Rhodospirillales	Fotoheterótrofos
Legionellales	Heterótrofos

Capítulo 4. Discusión

4.1 Distribución de clorofila-*a* y proteorodopsina en aguas superficiales de la corriente de California

La concentración de clorofila-*a* es un indicador que sugiere cómo varía la limitación por nutrientes inorgánicos en los ecosistemas marinos. La distribución heterogénea de clorofila-*a*, como pigmento principal captador de luz y dominante en la zona fótica del océano, refleja las fluctuantes condiciones ambientales y biológicas en las distintas estaciones muestreadas. Se ha establecido que las cianobacterias que contienen este pigmento son predominantes en los procesos fototróficos en ambientes marinos (Johnson & Sieburth, 1979; Chisholm et al., 1988).

Las concentraciones máximas localizadas principalmente en estaciones cercanas a la costa pueden estar asociados a procesos de surgencias que aporta nutrientes esenciales como fosfatos y nitratos. En las regiones cercanas a San Quintín los afloramientos son particularmente intensos debido a que las corrientes y los vientos regionales controlan en gran medida su funcionamiento en esta zona costera (Ibarra-Obando et al., 2001). La costa del océano Pacífico se encuentra en una de las regiones de surgencia costera con mayor productividad a nivel mundial (Hutchings et al., 1995).

La proteorodopsina no solo se encuentra en las zonas costeras sino también se extiende a las zonas alejadas de la costa. Esta amplia distribución sugiere que las bacterias fotótrofas que sintetizan proteorodopsinas podrían tener un rol significativo en la captación de energía luminosa, incluso en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. La omnipresente presencia de la proteorodopsinas destaca su activo papel como pigmento captador de luz dominante en las aguas superficiales oceánicas, absorbiendo una cantidad significativa de energía luminosa comparable a la fototrofia basada en clorofila-*a* (Gómez-Consarnau et al., 2019). La proteorodopsina desempeña una función vital en la ecología de los océanos (Béjà et al., 2000), dependiendo del microorganismo pueden utilizarse para una variedad de funciones fisiológicas.

Se observó que en la proteorodopsina y la clorofila-*a*, la luz solar es un factor muy importante en la distribución de los microorganismos marinos ya que es una fuente de energía fácilmente disponible en la zona fótica. Las concentraciones más altas de clorofila-*a* y proteorodopsinas se detectaron en la fracción

0.2 a 3.0 μm , sugiriendo una significativa contribución del picoplancton a la biomasa total debido al pequeño tamaño de sus células y alta flotabilidad que en gran medida permanece en la zona fótica de la región de estudio.

Este hallazgo es consistente con lo registrado por Villarreal (2021), las mayores concentraciones de proteorodopsina las detectó en la fracción microbiana de 0.2 y 3.0 μm . Estos resultados contribuyen al entendimiento de la distribución y la importancia de diferentes sistemas fototróficos en los ecosistemas marinos, particularmente en la corriente de California.

4.2 Relación entre clorofila-*a*, proteorodopsina y parámetros ambientales

La capa superficial de toda la región de la corriente de California está caracterizada por agua fría y una menor salinidad. Estos resultados son similares a informes previos sobre la corriente de California, la cual, debido a su origen subártico, es relativamente fría (entre 10 °C y 20 °C), presenta niveles reducidos de salinidad (32.5-33.8 PSU) y alto contenido de oxígeno. Durante las estaciones de invierno y primavera domina la presencia de aguas subárticas, mientras que a finales del verano y otoño la influencia de aguas tropicales y subtropicales es comúnmente observada (Wooster & Jones, 1970; Lynn & Simpson, 1987; Durazo et al., 2010).

La correlación entre los parámetros ambientales y los pigmentos resulta relevante para discernir los patrones de las comunidades microbianas marinas, los cuales muestran una distribución heterogénea debido a las variaciones naturales de las propiedades fisicoquímicas del agua. La correlación positiva y estadísticamente significativa entre la concentración de clorofila-*a* y proteorodopsina, indica que zonas con alta concentración de clorofila-*a* tienden también a tener altas concentraciones de proteorodopsina.

La concentración de proteorodopsina total muestran una relación directamente proporcional con la temperatura y salinidad, lo que puede sugerir que los organismos fotoheterótrofos portadores de proteorodopsina prosperan en ambientes con mayor salinidad y temperatura. La correlación negativa con el oxígeno disuelto puede indicar que las bacterias con proteorodopsina se favorecen en condiciones donde el oxígeno es más limitado. La clorofila-*a* solo mostró una correlación positiva con la salinidad y una correlación negativa con el oxígeno disuelto. Esto destaca la importancia de la salinidad como factor clave en la distribución de organismos con proteorodopsina y clorofila-*a*.

Los principales determinantes de los patrones biogeográficos del picoplancton heterótrofo marino son la temperatura y la salinidad (Bouvier & del Giorgio, 2002). En la región de estudio de la corriente de California la temperatura y salinidad muestran una correlación positiva (Figura 9), variables consideradas clave para distinguir masas de agua con propiedades fisicoquímicas distintas. La correlación negativa y muy altamente significativa ($r = -0.93$, $P < 0.001$) de la temperatura con el oxígeno disuelto (Figura 23 en Anexo) refleja la solubilidad del oxígeno el cual aumenta a medida que la temperatura disminuye. Esta mayor solubilidad del oxígeno a temperaturas más bajas se evidenció en la correlación positiva entre el oxígeno y la densidad (Figura 27 en Anexo), indicando que las aguas más frías y densas contienen mayor concentración de oxígeno disuelto (ver Figuras 14, 15 y 17 en Anexo).

La correlación entre salinidad y densidad fue negativa (Figura 28 en Anexo); sin embargo, no fue significativa ($P = 0.05$), lo que indica que fue la temperatura y no la salinidad el factor determinante en la distribución de densidad (valores de r con densidad de -0.82 y -0.31 , respectivamente) en el área de estudio (ver Figuras 25 y 28 en Anexo). Esto podría sugerir que en la zona de estudio se encontraron dos masas de agua con características fisicoquímicas diferentes: al norte una masa de agua más densa y oxigenada con T y S más bajas que la del sur (ver distribuciones en Figuras 14 a 17 en Anexo).

Estos datos pueden tener implicaciones importantes para entender la distribución de los organismos fotoautótrofos y fotoheterótrofos, la producción primaria y las respuestas del ecosistema a los cambios ambientales en la corriente de California.

4.3 Grupos microbianos fotótrofos de la corriente de California

En este estudio se caracterizó, por primera vez, las comunidades procariotas presentes a lo largo del transecto del crucero IMECOCAL 1911, mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S de las regiones V4-V5, utilizando la plataforma Illumina Nova. Este análisis se enfocó exclusivamente en la fracción entre 3.0 y $0.2 \mu\text{m}$. Esta investigación representa una contribución para comprender la complejidad en la distribución de los ecosistemas marinos a nivel geográfico, de la que aún existe escasa información en cuanto a la estructura y composición de sus comunidades microbianas fotótrofas. Los resultados muestran similitudes con patrones de diversidad previamente reportados por Villarreal (2021), profundizando en la comprensión de la estructura y dinámica de la diversidad en la región de estudio.

La recuperación del 58% resalta la calidad de las muestras, aunque se limitó el estudio a la fracción de 0.2

a 3.0 μm , esta brindó una cantidad sustancial de información que permitió analizar la estructura de la comunidad microbiana. La variabilidad en la riqueza de especies y diversidad, como lo indican los ASVs y el índice de Shannon, sugiere que las condiciones ambientales en la estación 100.35 promueven una mayor diversidad de las comunidades microbianas, la similitud en los valores de diversidad entre las demás estaciones sugiere condiciones ambientales más homogéneas. La diversidad taxonómica encontrada refleja la complejidad de las interacciones ecológicas del ecosistema marino.

En la estación 113.40 se registró la mayor abundancia para *Synechococcus*, coincidiendo con la concentración más alta de salinidad. *Synechococcus*, integrante de las cianobacterias fotoautótrofas, incluye algunas especies capaces de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas. Estas cianobacterias pueden tolerar altos niveles de salinidad, lo que les permite evitar la competencia con otros organismos menos tolerantes (Rosales et al., 2005). Estas se distribuyen ampliamente en el océano, desde zonas polares ricas en nutrientes hasta regiones subtropicales y tropicales con bajas concentraciones de nutrientes. Estas especies ocupan una posición clave como productores primarios que sustentan la base de la red alimentaria marina (Waterbury et al., 1979; Sunagawa et al., 2015), destacando su papel central en la fotosíntesis de la región.

El clado SAR11 presentó su mayor abundancia en la estación 100.45, sin embargo, no se observó ninguna relación entre la abundancia relativa y las variables ambientales. Este clado pertenece a las Alphaproteobacterias fotoheterótrofas, es uno de los clados más comunes en la superficie del océano y constituye alrededor del 50% de las comunidades microbianas (Morris et al., 2002; Rappé et al., 2002). La alta abundancia de este grupo resalta la importancia de su papel en los ciclos biogeoquímicos marinos. El clado SAR11 (Pelagibacterales) estuvo entre los primeros grupos de microorganismos descubiertos por los métodos de secuenciación de ADN para estudiar la diversidad microbiana en el océano. *Pelagibacter* fue el primer miembro cultivado que demostró expresar el gen de la proteorodopsina tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Giovannoni et al., 1990; Giovannoni et al., 2005).

En la estación 107.32 se registró la mayor abundancia de Flavobacteriales fotoheterótrofas, coincidiendo con la concentración más alta de clorofila-*a* registrada en el crucero. La abundancia de este grupo está estrechamente relacionada con los eventos de proliferación natural e inducida del fitoplancton, desempeñando un papel crucial como principales descomponedores de materia orgánica en estos ambientes. Un porcentaje significativo de las bacterias que contienen proteorodopsinas pertenecen a este grupo, y son miembros del filo Bacteroidetes. Estas bacterias fotoheterótrofas son predominantemente abundantes en hábitats pelágicos costeros (Eiler, 2006). Las investigaciones realizadas en esta clase han

profundizado como las proteorodopsinas influyen en su fisiología y adaptación a cambios en la disponibilidad de luz (Gómez-Consarnau et al., 2016).

Con respecto a las Alteromonadales de la clase Gammaproteobacteria, registraron su mayor abundancia en la estación 113.60.1, no se observó relación con las variables ambientales. Estas bacterias pueden ser anaeróbicas facultativas y están ampliamente distribuidas en diversos hábitats marinos, incluyendo el hielo marino, las aguas superficiales y los sedimentos de aguas profundas (Bowman & McMeekin, 2005). Estudios como el de Arandia-Gorostidi et al. (2020) han identificado la presencia de proteorodopsinas en estas bacterias heterótrofas, sugiriendo que pueden aprovechar la luz para mejorar su crecimiento en ambientes oligotróficos.

En las Verrucomicrobiales del filo Verrucomicrobia, registraron su mayor abundancia en la estación 103.30, no se observó relación con las variables ambientales, aunque se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes marinos. No obstante, se desconoce su extensión y diversidad, así como los factores que determinan su distribución (Freitas et al., 2012). Dentro de este grupo de bacterias han encontrado la presencia de genes de proteorodopsinas, basándose en genomas ensamblados en metagenomas (MAGs) obtenidos de agua de mar colectada en el Mar Mediterráneo occidental (Haro-Moreno et al., 2018). La falta de cepas fotoheterótrofas cultivadas de Verrucomicrobiota ha impedido el esclarecimiento de las funciones específicas de proteorodopsinas en este grupo (Bar-Shalom et al., 2023).

Las Actinomycetales constituyen un grupo de microorganismos fotoheterótrofo del filo Actinobacteria. Es cosmopolita, sin embargo, los organismos son difíciles de aislar y cultivar, especialmente para aquellas que habitan en el medio marino (Yin et al., 2018). No se han reportado genes de proteorodopsina para este orden. Las bacterias del orden Rhodobacterales pertenecientes a microorganismos heterótrofos de las Alphaproteobacterias, están muy extendidas desde la costa hasta el océano abierto y desde el hielo marino hasta el fondo marino (González & Moran, 1997; Selje et al., 2004), participan activamente en los ciclos del carbono y el azufre (González et al., 1999), aun no se han reportado genes de proteorodopsina para este grupo.

En la corriente de California se encontraron varios órdenes bacterianos, como Burkholderiales, Pirellulales, Pseudomonadales, Puniceispirillales, Cellvibrionales, Sphingomonadales, Cytophagales, Xanthomonadales, Lysobacterales, Rhodospirillales y Legionellales. La incidencia de genes de proteorodopsinas en estos grupos varía (Lázaro, 2020), lo que indica una diversidad en las capacidades de aprovechamiento de la luz dentro de estos diferentes linajes. Actualmente, el conocimiento sobre la gran

diversidad de las comunidades microbianas marinas es limitado. Debido a que muchos de estos microorganismos aún no se han logrado cultivar en el laboratorio, resulta difícil establecer una conexión directa entre los organismos y los procesos biogeoquímicos en los que están involucrados.

Capítulo 5. Conclusiones

En las aguas superficiales de la corriente de California, la concentración de clorofila-*a*, muestra una distribución heterogénea que refleja las fluctuantes condiciones ambientales y biológicas en las diferentes estaciones. Las máximas concentraciones se registraron cerca de la costa y se asocian a procesos de surgencias que aportan nutrientes esenciales. La amplia distribución de la proteorodopsina en zonas costeras y alejadas de la costa sugiere que las bacterias con esta función son importantes para la captación de energía luminosa, incluso en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes.

Las bacterias fotoheterótrofas están adaptadas a rangos específicos de distintas variables ambientales, debido a que no todas las comunidades microbianas pueden prosperar bajo las mismas condiciones. Los factores que regulan su dinámica son la temperatura, salinidad y se favorecen en condiciones donde el oxígeno disuelto es más limitado.

Las comunidades procarióticas productoras de proteorodopsina de la zona fótica en la corriente de California estuvieron dominadas por el clado SAR11 y Flavobacteriales. Esto sugiere a la fotoheterotrofia como una estrategia adaptativa en estas aguas, indicando que estos grupos tienen roles importantes en los ciclos biogeoquímicos de estos ecosistemas marinos. La alta abundancia de Flavobacteriales se asoció con áreas de alta productividad primaria, evidenciada por las elevadas concentraciones de clorofila-*a* en el transecto oceanográfico.

Literatura citada

- Akram, N., Palovaara, J., Forsberg, J., Lindh, M. V., Milton, D. L., Luo, H., González, J. M., & Pinhassi, J. (2013). Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium *Vibrio* sp. AND4. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1400–1415. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12085>
- Arandia-Gorostidi, N., González, J. M., Huete-Stauffer, T. M., Ansari, M. I., Morán, X. A. G., & Alonso-Sáez, L. (2020). Light supports cell-integrity and growth rates of taxonomically diverse coastal photoheterotrophs. *Environmental Microbiology*, 22(9), 3823–3837. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15158>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Bar-Shalom, R., Rozenberg, A., Lahyani, M., Hassanzadeh, B., Sahoo, G., Haber, M., Burgsdorf, I., Tang, X., Squatrito, V., & Gomez-Consarnau, L. (2023). Rhodopsin-mediated nutrient uptake by cultivated photoheterotrophic *Verrucomicrobiota*. *The ISME Journal*, 17(7), 1063–1073. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01412-1>
- 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>
- Boeuf, D., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L., Lebaron, P., & Jeanthon, C. (2013). Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 417–432. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12130>
- Bouvier, T. C., & del Giorgio, P. A. (2002). Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 453–470. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0453>
- Bowman J P, & McMeekin T A. (2005). Order X. Alteromonadales ord. nov. En D J Brenner, N R Krieg, J T Stanley, & G M Garrity (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (p. 443). Springer. <https://www.springer.com/series/4157>
- Britschgi, T. B., & Giovannoni, S. J. (1991). Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1707–1713. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1707-1713.1991>
- Callahan, B. J. (2016). *DADA2* (Versión 1.30.0). [Software de computadora]. <https://benjineb.github.io/dada2/>
- Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B., & Welschmeyer, N. A. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334(6180), 340–343. <https://doi.org/10.1038/334340a0>
- Cruaud, P., Vigneron, A., Fradette, M., Charette, S. J., Rodriguez, M. J., Dorea, C. C., & Culley, A. I. (2017).

Open the Sterivex™ casing: an easy and effective way to improve DNA extraction yields. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(12), 1015–1020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/lom3.10221>

- DeLong, E. F., Franks, D. G., & Alldredge, A. L. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, 38(5), 924–934. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.5.0924>
- 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>
- Durazo, R. (2015). Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(2), 1173–1196. <https://doi.org/10.1002/2014JC010405>
- Durazo, R., Ramírez-Manguilar, A. M., Miranda, L. E., & Soto-Mardones, L. A. (2010). Climatology of hydrographic variables. En G. Gaxiola-Castro & R. Durazo (Eds.), *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California 1997-2007: Diez años de investigaciones Mexicanas de la Corriente de California* (pp. 25–57). SEMARNAT, INE, CICESE, UABC. <https://imecocal.cicese.mx/wp/wp-content/uploads/Durazo-Gaxiola-2010.pdf>
- Eiler, A. (2006). Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7431–7437. <https://doi.org/10.1128/AEM.01559-06>
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S., & Kandori, H. (2014). Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1), 126–163. <https://doi.org/10.1021/cr4003769>
- Falkowski, P. G. (1997). Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature*, 387(6630), 272–275. <https://doi.org/10.1038/387272a0>
- Finkel, O. M., Béjà, O., & Belkin, S. (2013). Global abundance of microbial rhodopsins. *The ISME Journal*, 7(2), 448–451. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.112>
- Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J. A., Huse, S. M., Mark Welch, D. B., Sogin, M. L., & Martiny, A. C. (2012). Global distribution and diversity of marine *Verrucomicrobia*. *The ISME journal*, 6(8), 1499–1505. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.3>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Garrido, J. L., & Roy, S. (2015). The use of HPLC for the characterization of phytoplankton pigments. En D B Stengel & S Connan (Eds.), *Natural products from marine algae: methods and protocols. Methods in molecular biology* (pp. 241–252). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_15
- Gibbons, S. M., Caporaso, J. G., Pirrung, M., Field, D., Knight, R., & Gilbert, J. A. (2013). Evidence for a

persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), 4651–4655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217767110>

- 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>
- Giovannoni, S. J., Bibbs, L., Cho, J.-C., Stapels, M. D., Desiderio, R., Vergin, K. L., Rappé, M. S., Laney, S., Wilhelm, L. J., Tripp, H. J., Mathur, E. J., & Barofsky, D. F. (2005). Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature*, 438(7064), 82–85. <https://doi.org/10.1038/nature04032>
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Schmidt, T. M., & Pace, N. R. (1990). Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2572–2575. <https://doi.org/10.1128/aem.56.8.2572-2575.1990>
- 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), e1000358. <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-B₁ acquisition in marine Flavobacteria. *The 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), eaaw8855. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8855>
- González, J. M., Kiene, R. P., & Moran, M. A. (1999). Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 3810–3819. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.3810-3819.1999>
- González, J. M., & Moran, M. A. (1997). Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4237–4242. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4237-4242.1997>
- Haro-Moreno, J. M., López-Pérez, M., de la Torre, J. R., Picazo, A., Camacho, A., & Rodríguez-Valera, F. (2018). Fine metagenomic profile of the Mediterranean stratified and mixed water columns revealed by assembly and recruitment. *Microbiome*, 6, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0513-5>
- Hassanzadeh, B., Thomson, B., Deans, F., Wenley, J., Lockwood, S., Currie, K., Morales, S. E., Steindler, L., Sañudo-Wilhelmy, S. A., & Baltar, F. (2021). Microbial rhodopsins are increasingly favoured over chlorophyll in high nutrient low chlorophyll waters. *Environmental Microbiology Reports*, 13(3), 401–406. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12948>

- Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1225–1228. <https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977>
- Hutchings, L., Pitcher, G. C., Probyn, T. A., & Bailey, G. W. (1995). The chemical and biological consequences of coastal upwelling. En C. P. Summerhayes, K. C. Emeis, M. V. Angel, R. L. Smith, & B. Zeitzschel (Eds.), *Upwelling in the ocean: modern processes and ancient records* (pp. 65–81). John Wiley and Sons Ltd. https://www.researchgate.net/profile/Grant-Pitcher/publication/270397114_The_chemical_and_biological_consequences_of_coastal_upwelling/links/54aa46b40cf2eecd56e6d126/The-chemical-and-biological-consequences-of-coastal-upwelling.pdf
- Ibarra-Obando, S. E., Camacho-Ibar, V. F., Carriquiry, J. D., & Smith, S. V. (2001). Upwelling and lagoonal ecosystems of the dry Pacific coast of Baja California. En U Seeliger & B Kjerfve (Eds.), *Coastal marine ecosystems of Latin America* (pp. 315–330). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04482-7_22
- IMECOCAL (Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California). (2023). *Acerca del IMECOCAL*. <https://imecocal.cicese.mx/wp/>
- Johnson, P. W., & Sieburth, J. M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and oceanography*, 24(5), 928–935. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.5.0928>
- Kämpf J, & Chapman P. (2016). The California current upwelling system. En J Kämpf & P Chapman (Eds.), *Upwelling Systems of the World* (pp. 97–160). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-42524-5>
- Karl, D. M. (2007). Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 759–769. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1749>
- Kirchman, D. L. (2002). The ecology of *Cytophaga*-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 91–100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x>
- Knap, A. H., Michaels, A., Close, A. R., Ducklow, H., & Dickson, A. G. (1996). Measurement of chlorophyll *a* and phaeopigments by fluorometric analysis. En A H Knap, A Michaels, A R Close, H Ducklow, & A G Dickson (Eds.), *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) core measurements* (pp. 119–122). UNESCO. https://www.researchgate.net/publication/258297929_Protocols_for_the_Joint_Global_Ocean_Flux_Study_JGOFS_core_measurements
- Ladau, J., Sharpton, T. J., Finucane, M. M., Jospin, G., Kembel, S. W., O'Dwyer, J., Koeppel, A. F., Green, J. L., & Pollard, K. S. (2013). Global marine bacterial diversity peaks at high latitudes in winter. *The ISME Journal*, 7(9), 1669–1677. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.37>
- Lázaro García, J. A. (2020). Identificación de bacterias fotoheterótrofas cultivables productoras de rodopsinas en la cuenca del sur de California y en bases de datos genómicas globales. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3338/1/tesis_Jaime%20Abdie%20L%20Garc%20A%2018%20nov%202020.pdf

- Lynn, R. J., & Simpson, J. J. (1987). The California current system: the seasonal variability of its physical characteristics. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 92(C12), 12947–12966. <https://doi.org/10.1029/JC092iC12p12947>
- Madigan, M. T., Martinko, J., & Parker, J. (2006). Diversidad metabólica. En M. T. Madigan, J. Martinko, & J. Parker (Eds.), *Brock: biología de los microorganismos* (pp. 549–611). Pearson Education. https://www.academia.edu/39077515/Biolog%C3%ADa_de_los_microorganismos_BROCK
- Marchetti, A., Catlett, D., Hopkinson, B. M., Ellis, K., & Cassar, N. (2015). Marine diatom proteorhodopsins and their potential role in coping with low iron availability. *The ISME Journal*, 9(12), 2745–2748. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.74>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). *Phyloseq* (Versión 1.46.0). [Software de computadora]. <https://joey711.github.io/phyloseq/>
- Miller, C. S., Handley, K. M., Wrighton, K. C., Frischkorn, K. R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2013). Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS ONE*, 8(2), e56018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A., & Giovannoni, S. J. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 420(6917), 806–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature01240>
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403–1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., & Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418(6898), 630–633. <https://doi.org/10.1038/nature00917>
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R., & Morales, E. (2005). Influencia de la salinidad sobre crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias marinas*, 31(2), 349–355. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-38802005000300003&script=sci_arttext
- Schlitzer, R. (2022). *Ocean Data View* (Versión 5.5.2). [Software de computadora]. <https://odv.awi.de/>
- Selje, N., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature*, 427(6973), 445–448. <https://doi.org/10.1038/nature02272>
- 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*, 6, e5798. <https://doi.org/10.7717/peerj.5798>
- Spudich, J. L., Yang, C.-S., Jung, K.-H., & Spudich, E. N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 365–392. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.365>
- 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), e19725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019725>
- Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., Djahanschiri, B., Zeller, G., Mende, D. R., & Alberti, A. (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348(6237), 1261359. <https://doi.org/10.1126/science.1261359>
- Thomas, A. C., & Strub, P. T. (1990). Seasonal and interannual variability of pigment concentrations across a California Current frontal zone. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 95(C8), 13023–13042. <https://doi.org/10.1029/JC095iC08p13023>
- Villarreal, P. E. (2021). Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre la regulación fototrófica del fitoplancton y bacterias con proteorodopsinas (PRs) [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.]. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3600/1/tesis_Estefany%20Villarreal%20Peralta_30%20julio%202021.pdf
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Guillard, R. R. L., & Brand, L. E. (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, 277(5694). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/277293a0>
- Williams, P. (2000). Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic material. En D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans* (pp. 153–200). Liss/Wiley. <https://www.wiley.com/en-us/Microbial+Ecology+of+the+Oceans-p-9780471299929>
- Wooster, W. S., & Jones, J. H. (1970). California undercurrent off northern Baja California. *Journal of Marine Research*, 28(2), 235–250. https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/1185
- Wright, J. J., Lee, S., Zaikova, E., Walsh, D. A., & Hallam, S. J. (2009). DNA extraction from 0.22 µM Sterivex filters and cesium chloride density gradient centrifugation. *Journal of Visualized Experiments*, 31, e1352. <https://doi.org/10.3791/1352>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yin, Q., Zhang, L., Song, Z.-M., Wu, Y., Hu, Z.-L., Zhang, X.-H., Zhang, Y., Yu, M., & Xu, Y. (2018). *Euzebya rosea* sp. nov., a rare actinobacterium isolated from the east China sea and analysis of two genome sequences in the genus *Euzebya*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2900–2905. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002917>

Anexos

Tabla 2. Posición geográfica de las estaciones donde se realizaron los muestreos para análisis de ADN, citometría de flujo y cuantificación de pigmentos durante la campaña IMECOCAL 1911.

Lance	Crucero	Estación	Longitud (N)	Latitud (E)	Fecha (UTC)
1	IMECOCAL 1911	100.30	31°41.44	-116°46.42	30/11/2019
2	IMECOCAL 1911	100.35	31°31.36	-117°06.70	30/11/2019
3	IMECOCAL 1911	100.40	31°21.22	-117°27.30	01/12/2019
4	IMECOCAL 1911	100.45	31°11.23	-117°47.48	01/12/2019
5	IMECOCAL 1911	100.50	31°01.15	-118°07.49	01/12/2019
6	IMECOCAL 1911	100.55	30°51.08	-118°27.11	01/12/2019
7	IMECOCAL 1911	100.60	30°41.21	-118°47.53	01/12/2019
8	IMECOCAL 1911	103.60	30°06.76	-118°24.63	02/12/2019
9	IMECOCAL 1911	103.55	30°16.91	-118°04.56	02/12/2019
10	IMECOCAL 1911	103.50	30°26.86	-117°44.39	02/12/2019
11	IMECOCAL 1911	103.45	30°37.10	-117°24.47	02/12/2019
12	IMECOCAL 1911	103.40	30°46.93	-117°04.58	02/12/2019
13	IMECOCAL 1911	103.35	30°57.03	-116°44.58	02/12/2019
14	IMECOCAL 1911	103.30	31°06.84	-116°24.37	03/12/2019
15	IMECOCAL 1911	107.32	30°27.47	-116°09.83	03/12/2019
16	IMECOCAL 1911	107.40	30°11.53	-116°41.84	03/12/2019
17	IMECOCAL 1911	107.45	30°01.54	-117°01.66	03/12/2019
18	IMECOCAL 1911	107.50	29°51.46	-117°21.62	03/12/2019
19	IMECOCAL 1911	110.50	29°17.18	-116°59.18	04/12/2019
20	IMECOCAL 1911	110.45	29°27.24	-116°39.46	05/12/2019
21	IMECOCAL 1911	110.40	29°37.08	-116°19.57	05/12/2019
22	IMECOCAL 1911	110.35	29°47.23	-115°59.76	05/12/2019
23	IMECOCAL 1911	113.30	29°22.91	-115°18.35	05/12/2019
24	IMECOCAL 1911	113.35	29°21.43	-115°63.33	05/12/2019
25	IMECOCAL 1911	113.40	29°04.76	-115°96.05	06/12/2019
26	IMECOCAL 1911	113.45	28°88.21	-116°28.90	06/12/2019
27	IMECOCAL 1911	113.50	28°71.50	-116°61.76	06/12/2019
28	IMECOCAL 1911	113.55	28°54.75	-116°94.41	06/12/2019
29	IMECOCAL 1911	113.60	28°37.93	-117°26.96	06/12/2019

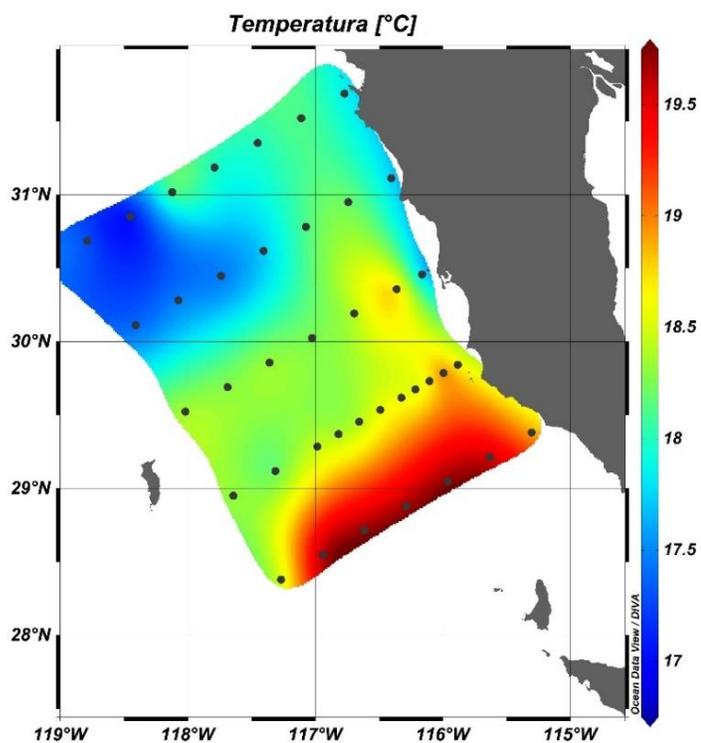


Figura 14. Mapa de la temperatura superficial del cruceo IMECOAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

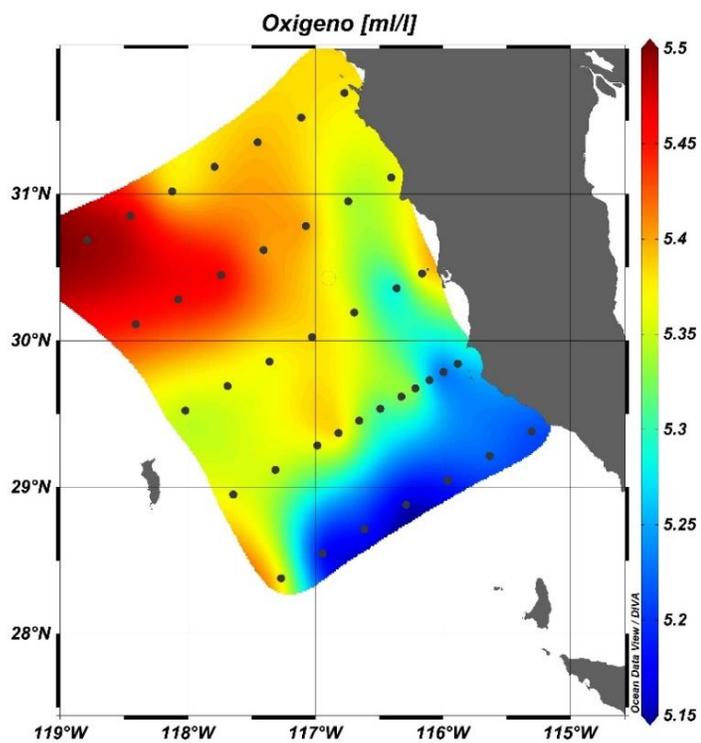


Figura 15. Mapa del oxígeno disuelto superficial del cruceo IMECOAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

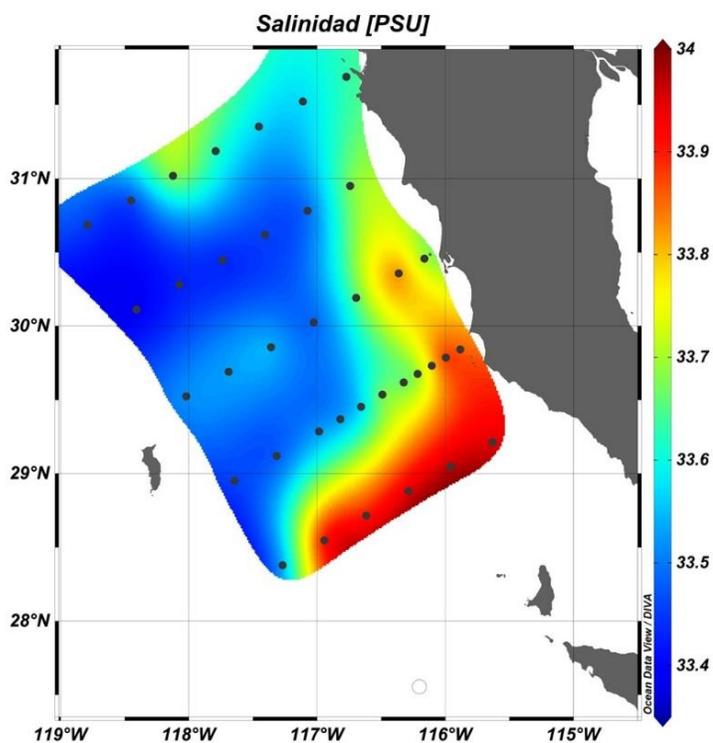


Figura 16. Mapa de la salinidad superficial del cruceo IMECOAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

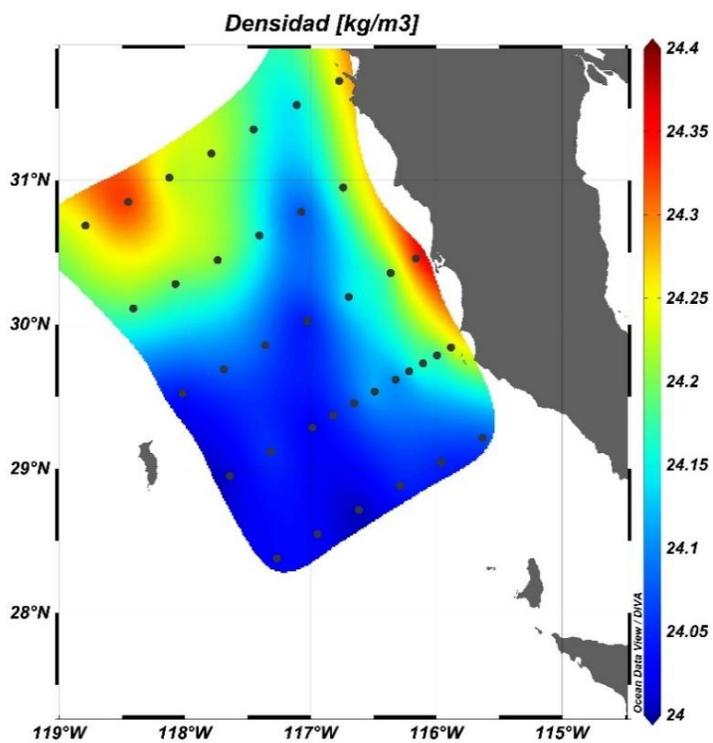


Figura 17. Mapa de la densidad del cruceo IMECOAL 1911. Los puntos negros indican las estaciones de muestreo.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Spearman (diagonal inferior) y su probabilidad (diagonal superior) categorizadas en $P < 0.05^*$ (significativo), $P < 0.01^{**}$ (altamente significativo), $P < 0.001^{***}$ (muy altamente significativo) y $P \geq 0.05$ (no significativo) de los parámetros ambientales.

Parámetros ambientales	Proteorodopsina total	Clorofila- <i>a</i> total	Temperatura	Oxígeno	Salinidad	Densidad
Proteorodopsina total	----	$P < 0.001^{***}$	$P < 0.05^*$	$P < 0.01^{**}$	$P < 0.001^{***}$	$P > 0.05$
Clorofila- <i>a</i> total	0.83	----	$P > 0.05$	$P < 0.05^*$	$P < 0.001^{***}$	$P > 0.05$
Temperatura	0.43	0.33	----	$P < 0.001^{***}$	$P < 0.001^{***}$	$P < 0.001^{***}$
Oxígeno	-0.54	-0.43	-0.93	----	$P < 0.001^{***}$	$P < 0.001^{***}$
Salinidad	0.81	0.68	0.76	-0.83	----	$P = 0.05$
Densidad	-0.18	-0.14	-0.82	0.70	-0.31	----

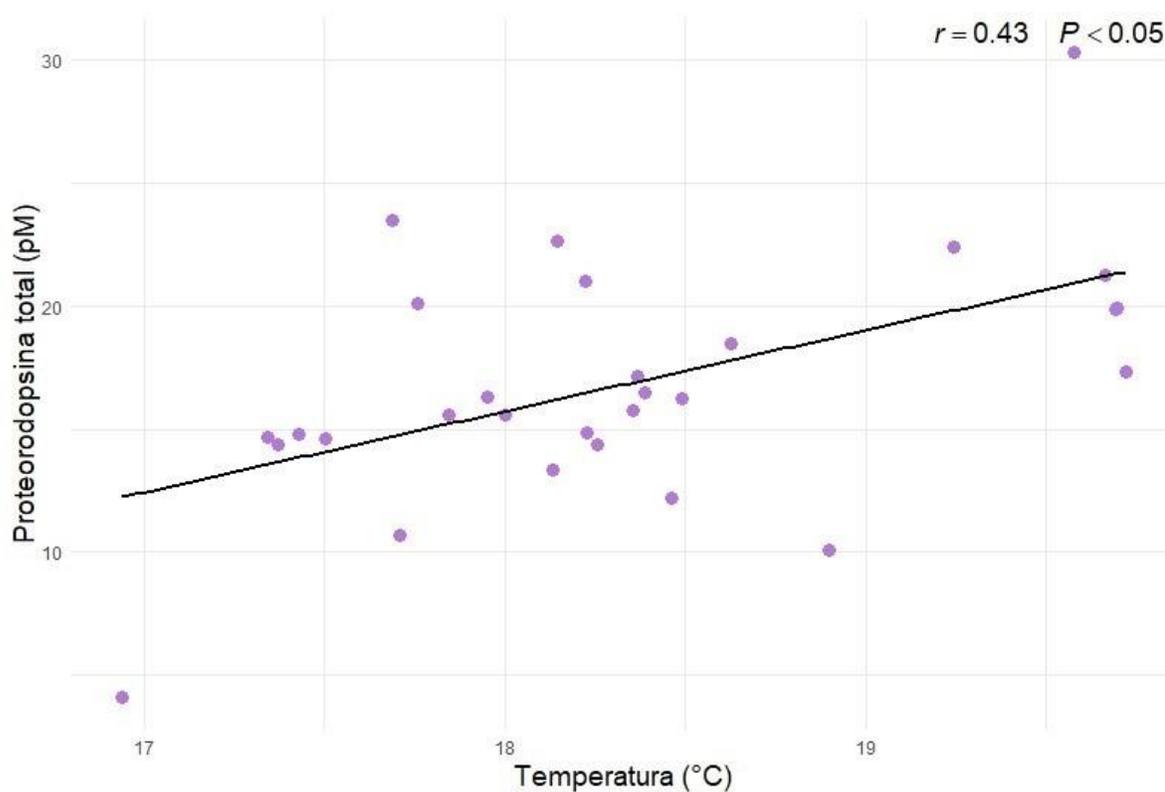


Figura 18. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Proteorodopsina.

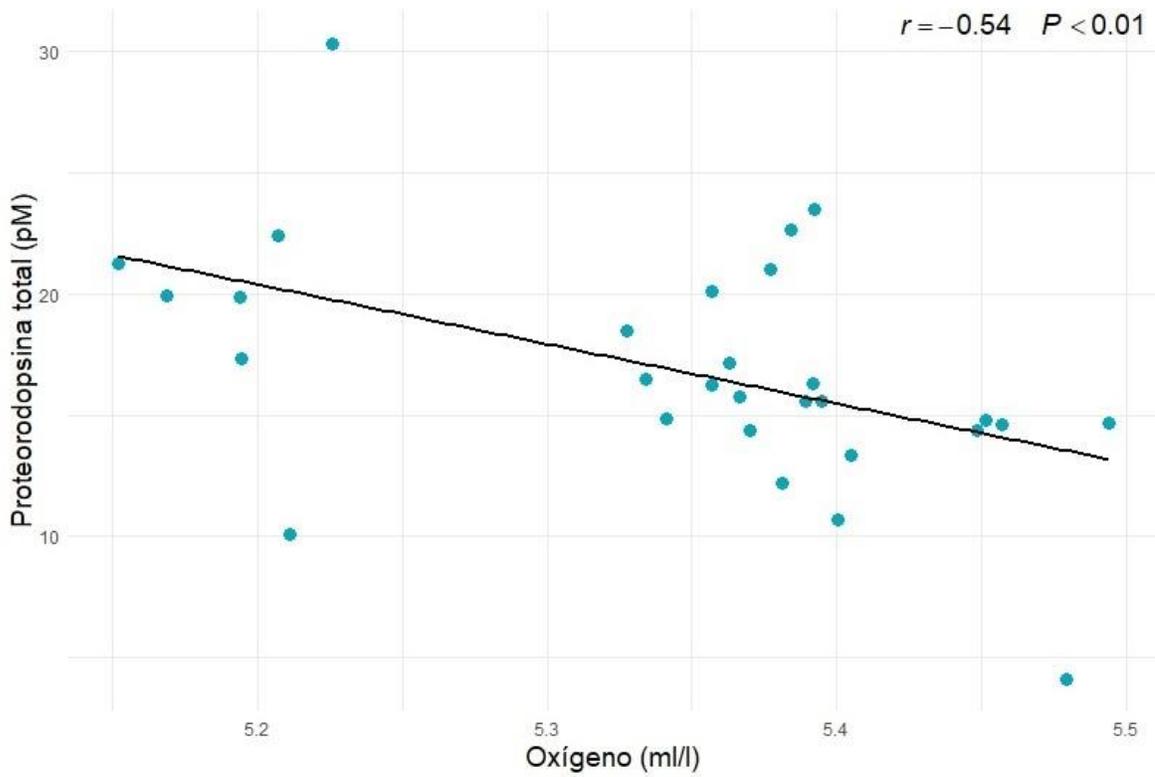


Figura 19. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Proteorodopsina.

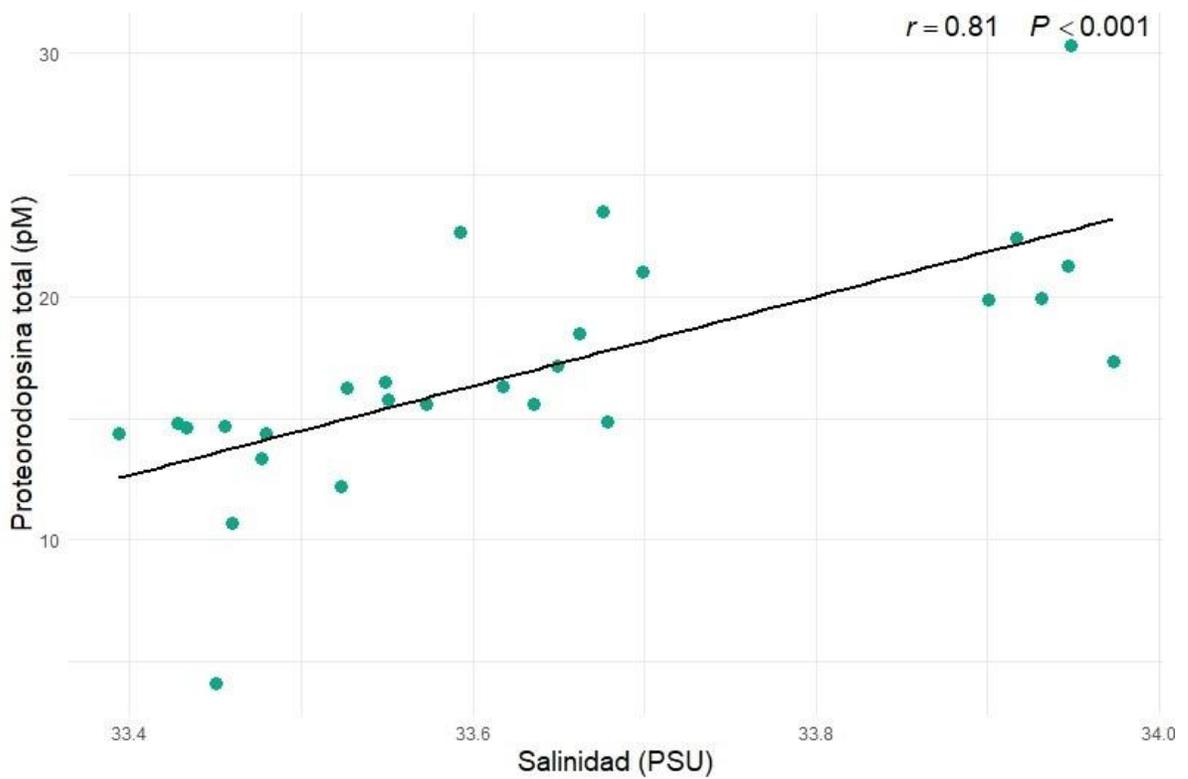


Figura 20. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Proteorodopsina.

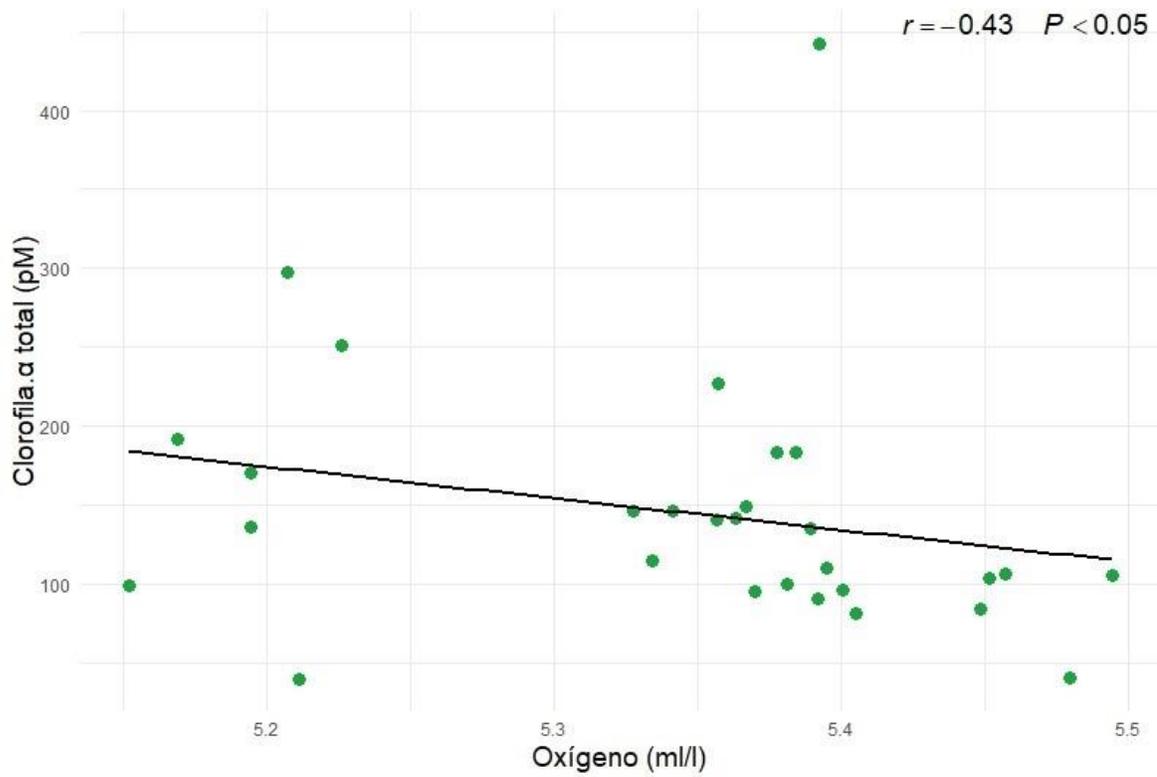


Figura 21. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Clorofila-*a*.

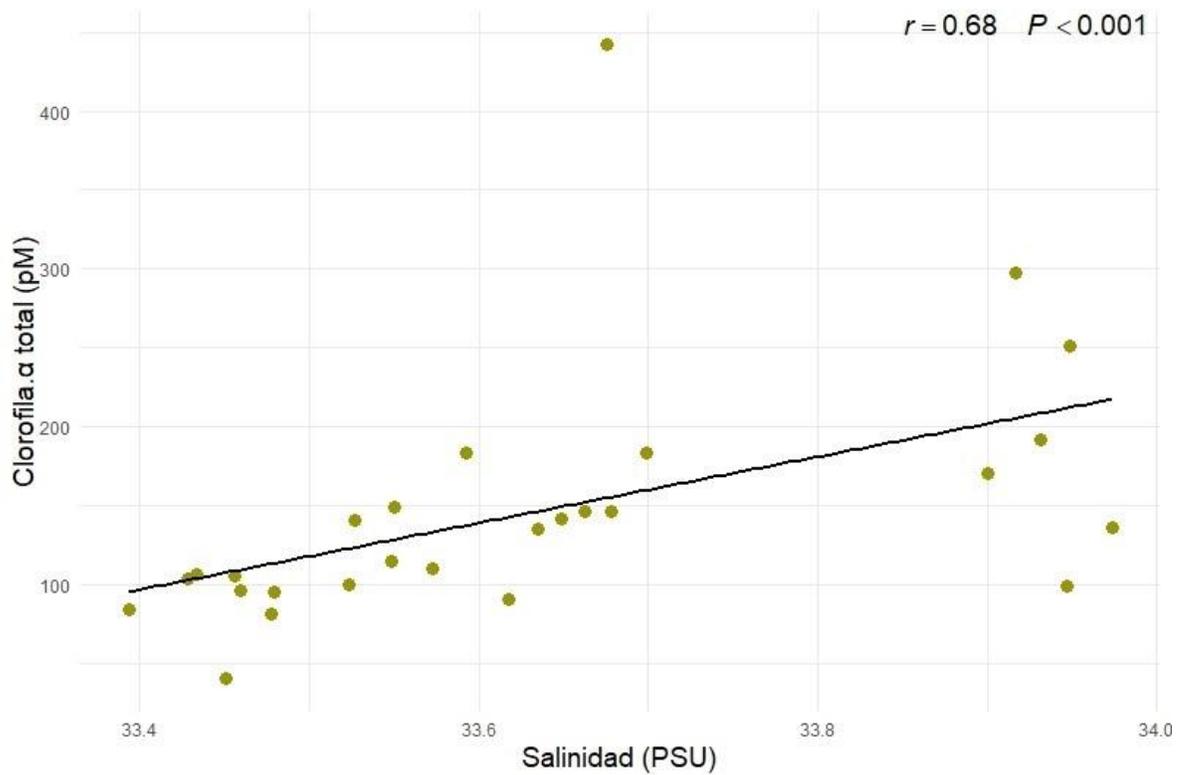


Figura 22. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Clorofila-*a*.

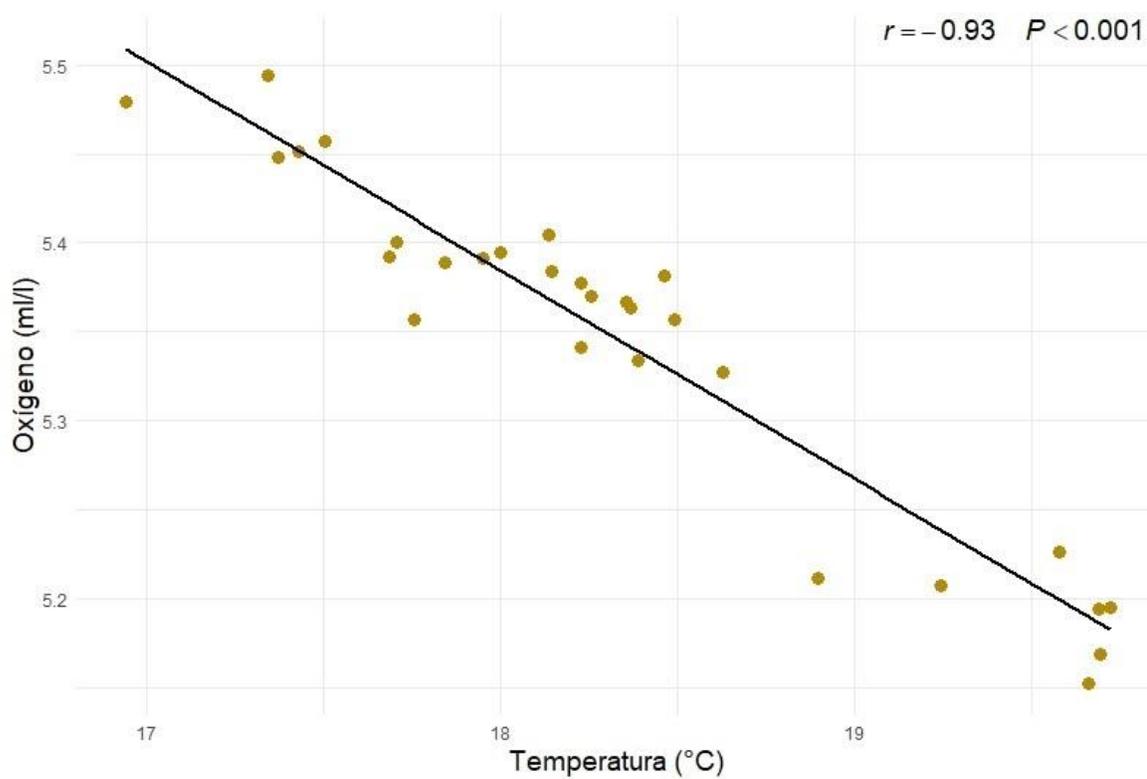


Figura 23. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Oxígeno.

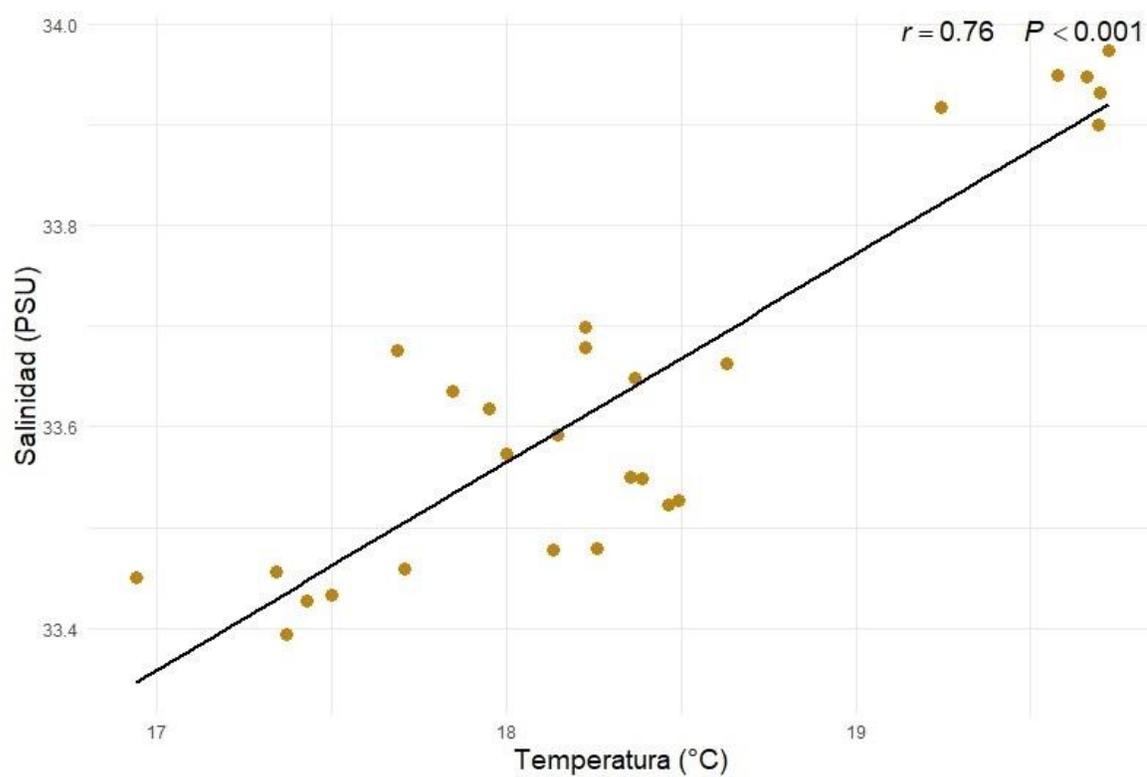


Figura 24. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Salinidad.

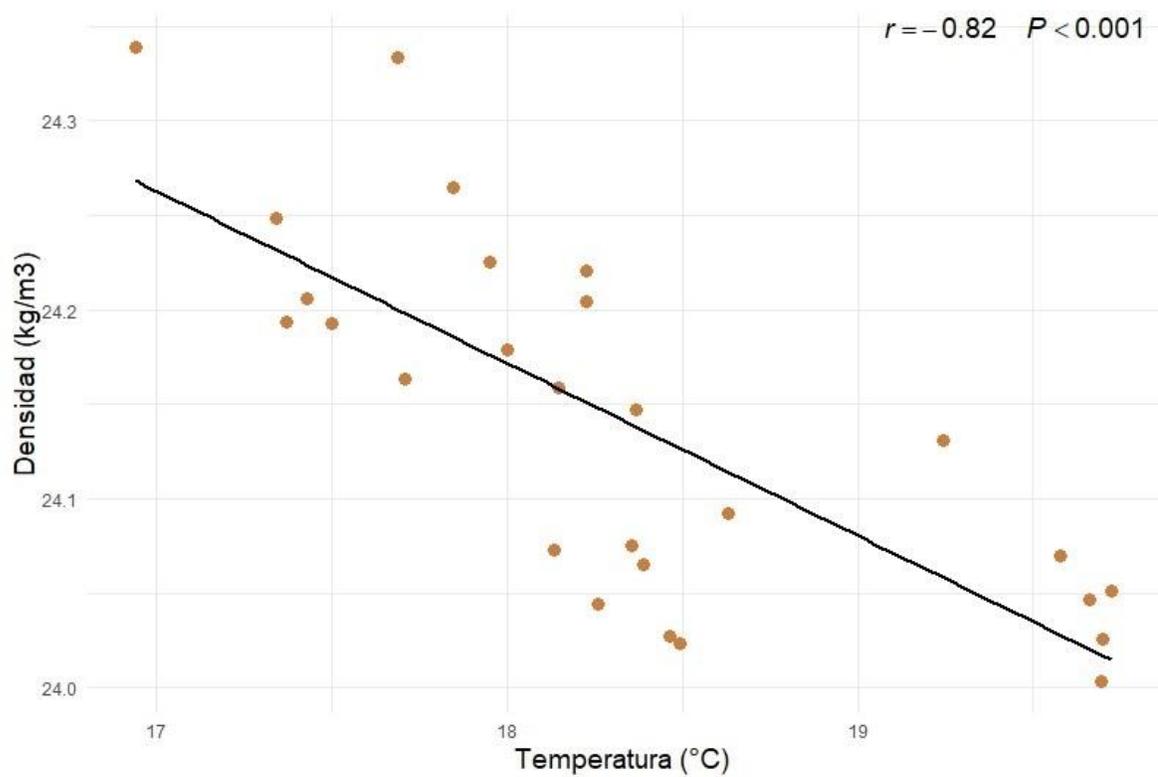


Figura 25. Gráfico de dispersión, correlación entre Temperatura y Densidad.

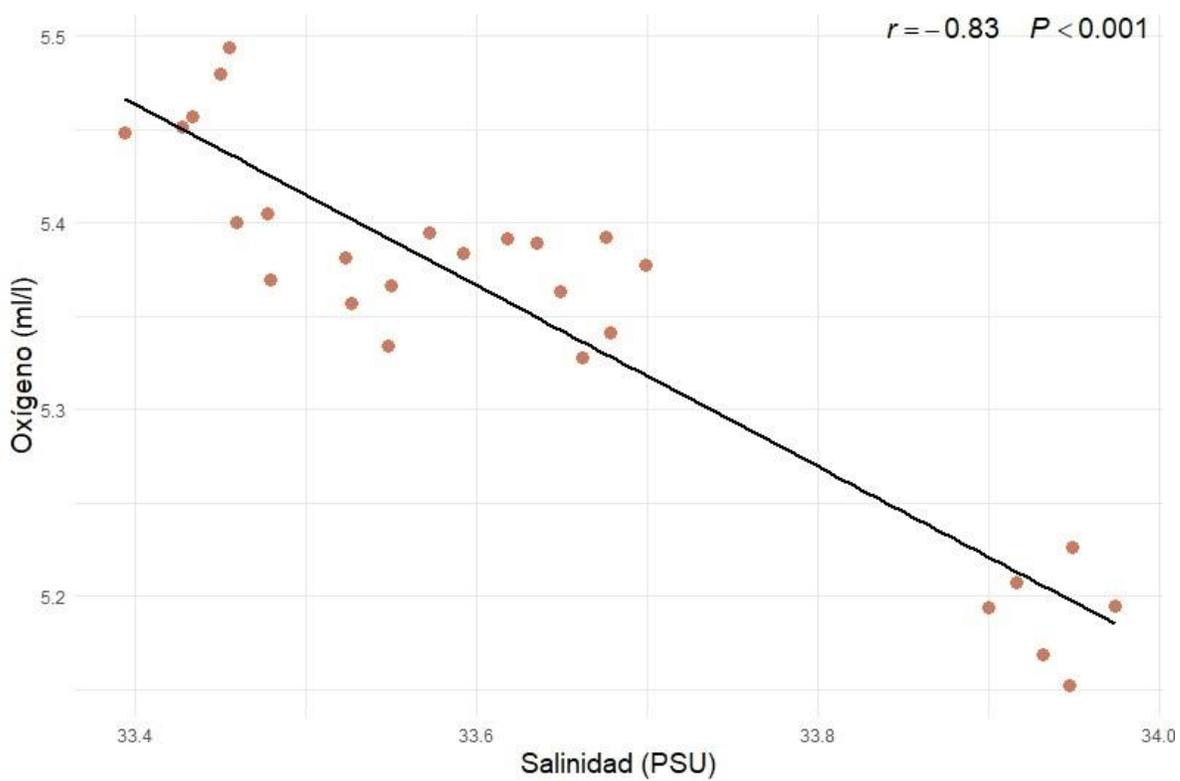


Figura 26. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Oxígeno disuelto.

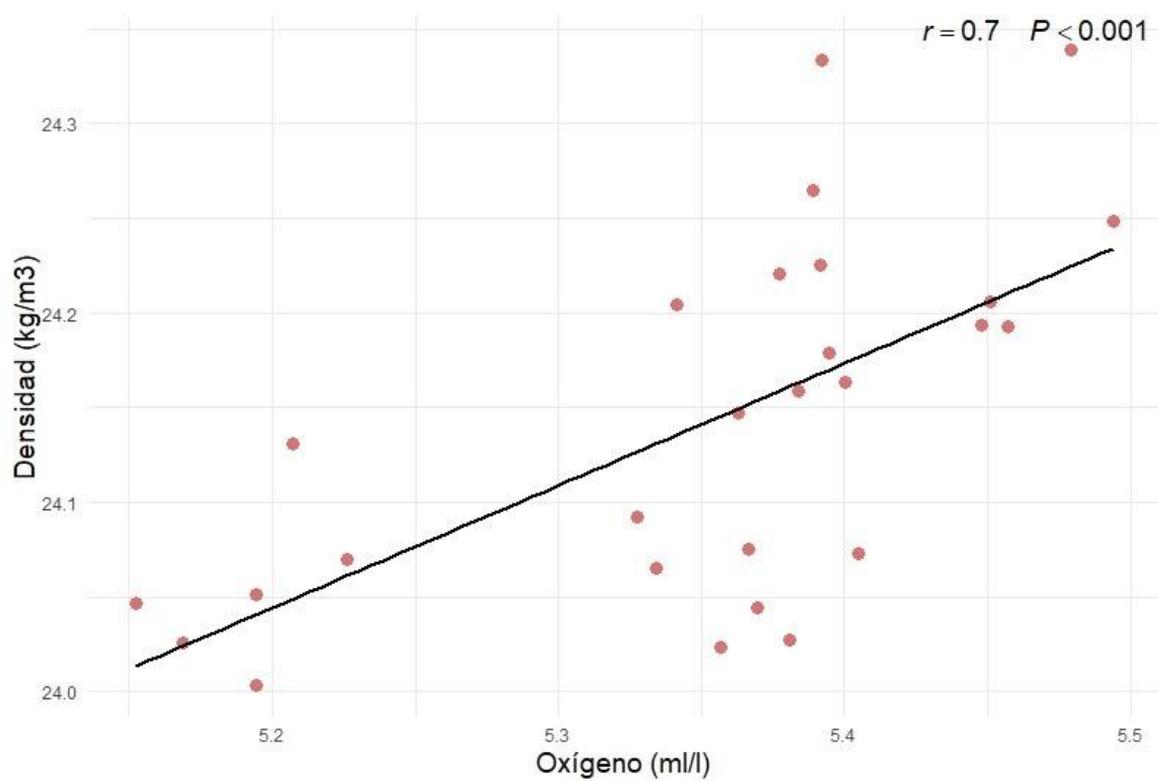


Figura 27. Gráfico de dispersión, correlación entre Oxígeno disuelto y Densidad.

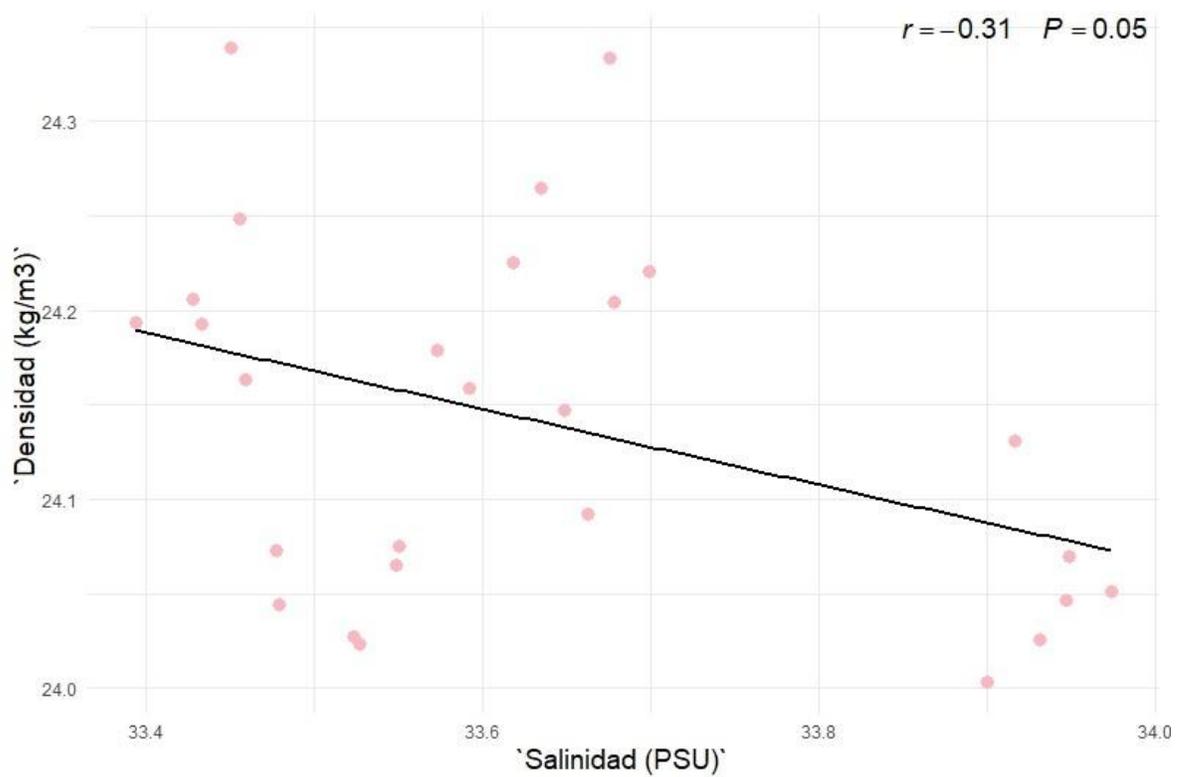


Figura 28. Gráfico de dispersión, correlación entre Salinidad y Densidad.

Tabla 4. Número de secuencias obtenidas en el filtro con tamaño de poro de 0.2 μm del crucero IMECOCAL 1911.

Estaciones	Secuencias crudas	Secuencias filtradas	Secuencias Inferidas Forward	Secuencias Inferidas Reverse	Secuencias pareadas	Secuencias no quiméricas
100.30	203340	189447	182455	181160	150001	83018
100.35	214191	199201	188830	189253	146661	98971
100.40	204126	188732	184554	184276	163802	115105
100.45	206759	190911	188266	188278	178254	158947
100.50.1	202174	187849	183235	182880	161286	92803
100.50	210926	196532	191299	190450	165467	80223
100.60	203705	189261	184923	184788	169133	140849
103.30	202415	187955	182445	181607	151756	96965
103.35	202325	187392	182953	182994	164837	137340
103.40	205818	190442	186077	185309	164528	117432
103.45	217721	202416	195806	195113	163589	95168
103.50	204830	189812	182804	182671	154110	86379
103.60	205160	191378	186027	185954	164855	126858
107.32	205122	189961	186423	186073	171681	155904
107.40	206543	192592	188848	188618	173554	138494
107.45	204452	189386	183567	182677	152488	74887
107.50	205275	190307	186344	185931	168410	132222
110.40	205948	190504	186615	186182	169007	131291
110.45	203106	188086	182233	181615	153604	91706
110.50	205419	189523	186690	186959	176437	149955
113.30.1	203841	189922	181869	182542	144524	90535
113.30	203080	187815	183635	183741	165494	135074
113.35	205738	191076	187186	186634	169082	139616
113.40	203924	189779	186193	185877	168508	135876
113.50	206097	190397	187582	187378	174841	144869
113.55	205840	189826	187147	187425	176167	146213
113.60.1	205150	189905	185277	183915	158047	98735
113.60	206565	193223	186159	186642	160104	119659
TOTAL	5759590	5343630	5205442	5196942	4580227	3315094