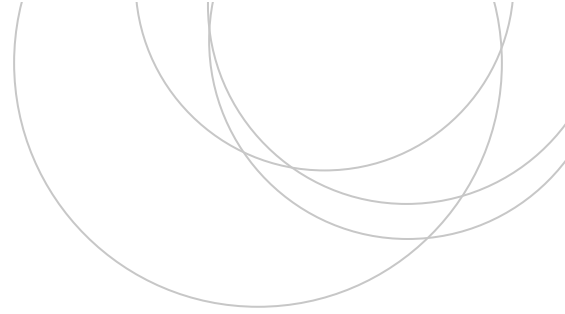




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biologiako Gradua / Grado en Biología

DEGRADACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EN EL MEDIO MARINO: CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PROTEASA EXTRACELULAR EN EL OCÉANO ATLÁNTICO

Egilea/Autor/a:
Janire Sevilla Fernández
Zuzendaria/Director/a:
María Begoña Ayo Millán

© 2019, Janire Sevilla Fernández

Leioa, 2019ko Ekainaren 20a /Leioa, 20 de Junio de 2019

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 2 |
| RESUMEN | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. OBJETIVOS..... | 7 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 3.1 Área de estudio y muestreo | 7 |
| 3.2 Densidad de procariotas..... | 9 |
| 3.3 Estimación de la actividad enzimática..... | 9 |
| 3.4 Obtención y análisis de datos | 10 |
| 3.5 Análisis estadísticos..... | 10 |
| 4. RESULTADOS..... | 11 |
| 4.1 Temperatura y densidad bacteriana | 12 |
| 4.2 Actividad enzimática total y disuelta..... | 12 |
| 4.3 Actividad enzimática específica | 15 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 16 |
| 6. CONCLUSIONES | 21 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 22 |

ABSTRACT

Heterotrophic prokaryotes are an essential component in the marine trophic chain. To transform and metabolize the dissolved or particulate organic matter, these microorganisms must carry out an extracellular enzymatic hydrolysis that reduces the size of the molecules so they can be uptaken by the cells. The necessary hydrolysis is carried out by extracellular enzymes (dissolved or cell-associated) secreted by the bacteria itself. Among those enzymes, we find the proteases like, leucine-aminopeptidase type, which is responsible for hydrolyzing peptides and proteins. In this study, the rates of total and dissolved potential hydrolysis of the extracellular enzymatic activity leucine-aminopeptidase, as well as the cell - specific activity, have been determined in the epi-, meso- and bathypelagic layers of the water column along a horizontal transect of the South Atlantic. The results indicate that the levels of both total and dissolved aminopeptidase extracellular enzymatic activity are much higher in the epipelagic zone than in deep waters. In the meso- and bathypelagic layers, the activity of the dissolved fraction was higher than the total sample, which can be related to errors in the processing of the sample. The cell - specific activity was higher in the bathypelagic zone, which suggests the transport along the water column of active enzymes that come from the upper layers.

Keywords: extracellular enzymatic activity, leucine aminopeptidase, Atlantic ocean, water column, epipelagic layer, mesopelagic layer, bathypelagic layer, dissolved enzymes, cell – especific activity.

RESUMEN

Los procariotas heterótrofos son un componente vital en la cadena trófica marina. Para transformar y metabolizar la materia orgánica disuelta o particulada, estos microorganismos deben realizar una hidrólisis enzimática extracelular que disminuya el tamaño de las moléculas para, posteriormente introducirlas al interior celular. La necesaria hidrólisis es llevada a cabo por las enzimas extracelulares, que son enzimas secretadas por los procariotas y que pueden estar libres (enzimas disueltas) o adheridas a la superficie celular, y entre las que encontramos las proteasas del tipo leucina-aminopeptidasa encargadas de hidrolizar péptidos y proteínas. En este trabajo se han determinado las velocidades de hidrólisis potencial total y disuelta de la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa, así como la velocidad de hidrólisis específica, en las capas epi-, meso- y batipelágica de la columna de agua a lo largo de un transecto horizontal del Atlántico Sur. Los resultados indican que los niveles de la actividad enzimática extracelular aminopeptidasa total y disuelta son muy superiores en la zona epipelágica con respecto al resto de la columna de agua. En las capas meso- y batipelágica se han detectado de forma habitual valores superiores de actividad en la fracción disuelta frente a la muestra total, lo que puede estar relacionado con errores en el procesado de la muestra. La velocidad de hidrólisis específica fue muy superior en la zona batipelágica, lo que sugiere el transporte a lo largo de la columna de agua de enzimas activos que proceden de las capas superiores.

Palabras clave: actividad enzimática extracelular, leucina-aminopeptidasa, océano Atlántico, columna de agua, capa epipelágica, capa mesopelágica, capa batipelágica, enzimas disueltas, velocidad de hidrólisis específica.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos procariotas heterótrofos son un componente imprescindible de la cadena trófica de los sistemas marinos, ya que intervienen en la descomposición de la materia orgánica, el ciclo de los nutrientes y el flujo de carbono en las redes tróficas acuáticas. Las principales fuentes de materia orgánica utilizable por estos microorganismos son la exudación fitoplanctónica, la liberación de material celular mediada por lisis vírica, los productos de excreción de microorganismos y macroorganismos, los aportes terrestres o fluviales y la propia biomasa bacteriana de los organismos cuando mueren (Cunha *et al.*, 2010).

Independientemente de su origen, las moléculas orgánicas se incorporan al “pool” de carbono orgánico disuelto del medio marino, y de todos los componentes de la red trófica marina, son únicamente los microorganismos procariotas heterótrofos quienes son capaces de utilizarlas como nutrientes. A lo largo de este proceso de heterotrofia, la actividad enzimática extracelular resulta fundamental (Hoppe, 1983). Para poder transformar y metabolizar los compuestos de alto peso molecular, los procariotas heterótrofos requieren una hidrólisis enzimática extracelular de las macromoléculas que genere moléculas orgánicas de bajo peso molecular ya directamente utilizables. De hecho, el transporte de nutrientes orgánicos a través de la pared de las bacterias Gram positivas no es tan restrictiva como la membrana externa de las Gram negativas, las cuales presentan proteínas denominadas porinas que forman canales entre la membrana externa y el espacio periplásmico que permiten la entrada de moléculas (Seltmann & Holst, 2002). Pero el posterior y necesario transporte de las moléculas orgánicas a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma está restringido a compuestos químicos de bajo peso molecular (≈ 600 Da) (Cunha *et al.*, 2010).

La hidrólisis de macromoléculas orgánicas en los sistemas marinos es llevada a cabo por las enzimas extracelulares secretadas por los procariotas, que se pueden subdividir en dos grandes grupos en función de su localización física. Por un lado, las ectoenzimas, que son aquellas enzimas asociadas a las capas externas de las células viables, y que por tanto incluyen las enzimas insertadas en la parte externa de la membrana plasmática, y las asociadas a la pared celular, que en el caso de las bacterias Gram negativas, están unidas a la superficie de la membrana externa (Chróst, 1991). Estas enzimas tienen la ventaja para el microorganismo productor de que no se pierden en el medio externo, y de que los productos de hidrólisis se generan en la inmediación de la célula productora, lo que puede facilitar su posterior captación e incorporación a la célula. Por otro lado, existen las enzimas extracelulares estrictas o disueltas, que están libres en el medio acuático y, que, por tanto, catalizan las reacciones a distancia de los organismos que las han producido (Chróst & Siuda, 2002). El origen de estas enzimas es diverso: pueden ser secretadas por células viables, liberadas tras un proceso de lisis inducido por virus o bien puede ser ectoenzimas que han perdido la adherencia a la célula microbiana.

Cualquier factor que afecte a la actividad, producción o disponibilidad de estas enzimas supondrá un gran impacto en la vía de remineralización marina, puesto que las enzimas extracelulares son las

encargadas de catalizar reacciones esenciales del ciclo de los nutrientes como el carbono, el nitrógeno o el fósforo. Las condiciones a las que se exponen las enzimas extracelulares en los sistemas marinos son, en general, bastante desfavorables. Tanto en la columna de agua como en la fase acuosa del sedimento, los sustratos disponibles se encuentran a menudo en concentraciones bajas y son muy diversos desde un punto de vista cualitativo (Arrieta *et al.*, 2015). Esto es particularmente evidente en las capas más profundas de la columna de agua: el océano profundo es el hábitat más extenso de la biosfera y se caracteriza por una alta presión y bajas temperaturas (Aristegui *et al.*, 2009). En muchas ocasiones, los sustratos disponibles forman complejos con sustancias húmicas, materia orgánica coloidal y detritus, que dificultan la unión enzima – sustrato (Busto & Pérez-Mateos, 1995), y pueden llegar incluso a provocar la separación entre las enzimas y el organismo que las ha producido. Estas enzimas que pasan a estar libres quedan expuestas a inhibidores de actividad, procesos de desnaturalización por factores físico – químicos o procesos de hidrólisis por parte de otras enzimas proteasas (Rao *et al.*, 2003).

El conjunto de factores ambientales que rodean a los microorganismos interactúa en la regulación de la actividad enzimática extracelular, de forma que modulan e inducen su expresión. Cuando los nutrientes se encuentran en cantidades limitadas, los microorganismos producen enzimas con el fin de hidrolizar las macromoléculas y aumentar la disponibilidad de nutrientes necesarios. Por otra parte, la producción de algunas enzimas por parte de los microorganismos acuáticos está reprimida cuando las células crecen con fuentes de materia orgánica disuelta fácilmente utilizable. Una vez que la concentración de sustratos utilizables decrece, la síntesis enzimática es activada. Mediante este mecanismo de represión, los microorganismos evitan la sobreproducción innecesaria de enzimas (Hoppe *et al.*, 1988).

La actividad hidrolítica de diversas enzimas en el medio marino se ha estudiado mediante diversas metodologías, entre las que destaca el uso de sustratos artificiales fluorogénicos mediante la técnica propuesta por Hoppe (Hoppe, 1983). Estos sustratos se componen de una molécula fluorescente artificial (fluorocromo) unida al compuesto de interés (glucosa, fosfato, leucina, etc.) por un enlace específico que, cuando se hidroliza debido a la presencia del enzima cuya actividad queremos estudiar, produce la liberación del fluorocromo. Estas moléculas, los productos de las respectivas hidrólisis enzimáticas, son solubles en agua y fluorescentes con propiedades ópticas diferentes a las del sustrato. La cantidad de fluorescencia generada se mide mediante un espectrofluorímetro a lo largo de un periodo de incubación variable, por lo que se obtiene información sobre la velocidad de hidrólisis de la actividad enzimática extracelular en la muestra de agua. El empleo de los sustratos modelos fluorogénicos se puede realizar sin interferir en la comunidad procariota ya que estos no resultan tóxicos para las células. Los estudios se realizan bajo concentraciones saturantes de los sustratos fluorogénicos, lo que permite obtener las velocidades potenciales de hidrólisis (Ayo *et al.*, 2012).

Entre las enzimas extracelulares que más se han estudiado en los sistemas marinos se encuentran las proteasas del tipo leucina-aminopeptidasa ampliamente distribuidas en los ambientes acuáticos y

cuyas actividades se asocian a los procariotas heterótrofos. Esta actividad leucina-aminopeptidasa hace referencia a la actividad de un grupo diverso de isoenzimas que, probablemente, presenten variaciones en función de las condiciones oceánicas con respecto al origen, composición, estructura molecular, regulación, vida media, sensibilidad a la temperatura, etc. (Christian & Karl, 1998; Arrieta & Herndl, 2002; Steen *et al.*, 2015).

Esta actividad está involucrada en la hidrólisis de péptidos y proteínas, y consecuentemente, en el ciclo del carbono y el nitrógeno. El nitrógeno orgánico disuelto habitualmente disponible para el consumo directo por parte de los procariotas heterótrofos consiste en una pequeña fracción de monómeros como los aminoácidos o la urea (Antia *et al.*, 1991). Sin embargo, la fracción dominante se compone de péptidos de alto peso molecular, cuya utilización requiere una hidrólisis previa hasta obtener moléculas más pequeñas como los monómeros o los oligómeros que pueden ser captados por las células (Stepanauskas *et al.*, 1999). Esta hidrólisis extracelular es llevada a cabo por los procariotas heterótrofos que poseen enzimas aminopeptidasas.

En estudios previos (Cunha & Almeida, 2009), se ha observado una correlación positiva entre la actividad aminopeptidasa y la limitación de fuentes de nitrógeno en el medio acuático. El nitrógeno es, habitualmente, un elemento limitante de la producción primaria en ecosistemas marinos (Ryther & Dunstan, 1971; Stepanauskas *et al.*, 1999) y el incremento del aporte de dicho elemento, en su forma orgánica disuelta, desde fuentes terrestres es uno de los responsables de la eutrofización de los ambientes costeros (Meybeck, 1982). Por estos motivos, es fundamental estudiar los factores encargados de regular el uso del nitrógeno orgánico disuelto para poder comprender la dinámica del ciclo del nitrógeno en sistemas acuáticos.

En el presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se caracteriza la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa en la columna de agua del Atlántico Sur, a fin de conocer la primera etapa de la degradación de materia orgánica de tipo proteico en este sistema marino. Esta caracterización se basa en el estudio de la importancia de la actividad leucina aminopeptidasa disuelta frente a la total, a fin de conocer la localización física de los enzimas activos, y en el análisis de las posibles diferencias en la actividad detectada en las capas epi-, meso- y batipelágicas, ya que los estudios acerca de las actividades biológicas del océano profundo son bastante escasos en comparación a los realizados en aguas superficiales.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente TFG es la caracterización de la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa en el océano Atlántico Sur. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar la actividad enzimática extracelular del tipo leucina-aminopeptidasa en la columna de agua a lo largo de un transecto horizontal situado en el sur del océano Atlántico
2. Determinar la importancia de las fracciones total y disuelta de dicha actividad
3. Establecer la importancia de dicha actividad en este sistema acuático en comparación con otras zonas marinas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este TFG está basado en un trabajo experimental llevado a cabo durante la Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010 (Duarte, 2015). Para una mejor comprensión del trabajo, se presenta una descripción de los materiales y métodos utilizados durante el proceso experimental que incluye el área de estudio y la toma de muestras, la densidad de procariotas y la actividad enzimática. La metodología específica de este TFG engloba la obtención y análisis de los resultados y el empleo de análisis estadísticos.

3.1 *Área de estudio y muestreo*

Las muestras de agua fueron tomadas a lo largo de un transecto en el océano Atlántico Sur (situado entre Río de Janeiro y Ciudad del Cabo) (Figura 1) a finales de enero y principios de febrero de 2011. Se muestrearon un total de siete estaciones en dicho recorrido, de las cuales sólo cinco se analizarán en el presente estudio.

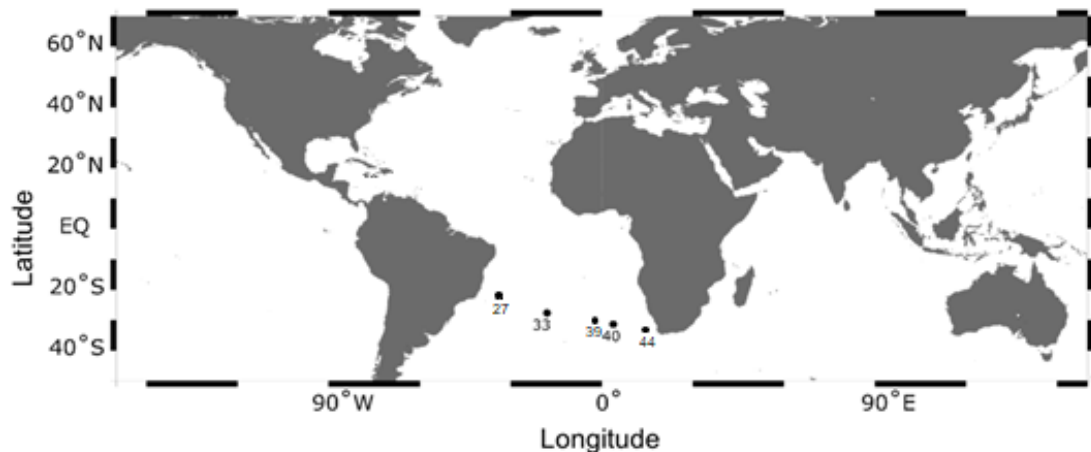


Figura 1. Localización de las estaciones muestreadas a lo largo del transecto en el océano Atlántico Sur. (Ayo et al., 2017, modificado).

Las muestras para el estudio de la actividad enzimática extracelular fueron recogidas a diferentes profundidades para estudiar la velocidad de hidrólisis de la leucina a lo largo de la columna de agua según se indica en la Tabla 1. Los muestreos se llevaron a cabo de 07:00 – 10:00 am. El agua superficial (3m) fue recogida con botellas Niskin de 30 L y las muestras de mayor profundidad se recogieron con un sistema en roseta (24 botellas Niskin de 12 L) equipado con un CTD (Figura 2).

Tabla 1. Profundidades de muestreo en cada una de las estaciones y su localización.

| Zona de la columna de agua | Profundidad de muestreo (m) | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Estación 27 | Estación 33 | Estación 39 | Estación 40 | Estación 44 |
| EPIPELÁGICO (0 – 200 m) | 3 129 | 3 120 | 3 110 | 3 70 | 3 56 |
| MESOPELÁGICO (200 – 1000 m) | 320 550 750 | 600 800 | 540 800 | 450 800 | 350 725 |
| BATIPELÁGICO (>1000 m) | 1850 4000 | 1120 2600 4000 | 1290 3080 4000 | 1300 2900 4000 | 1200 2600 3200 |
| Coordenadas | 24° 18'90" S 36° 13'33" W | 27° 33'20" S 18° 05'36" W | 30° 52'90" S 00° 58'07" E | 31° 18'45" S 03° 44'92" E | 33° 14'00" S 15° 20'37" E |

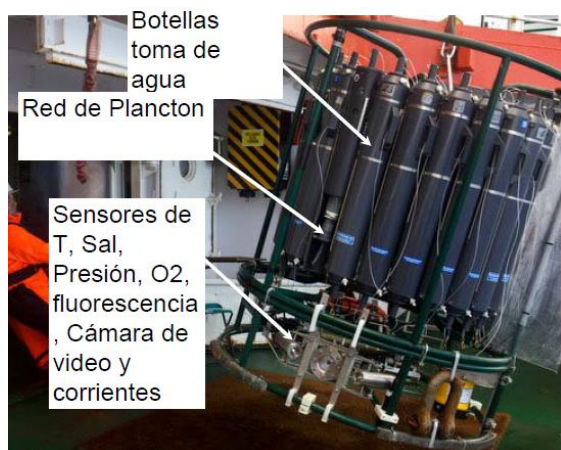


Figura 2. Sistema en roseta con 24 botellas Niskin de 12 L y equipado con un CTD.

3.2 Densidad de procariotas

La densidad total de procariotas heterótrofos presentes en las muestras fue analizada mediante un citómetro de flujo (FACSCalibur) equipado con una luz láser azul de 488 nm. La calibración de la velocidad de flujo se realizó diariamente para las estimaciones de densidad, y se usaron bolas de plástico (*beads*) fluorescentes de 1 μm como estándares internos (Gomes *et al.*, 2015).

Se recogieron dos alícuotas, una como réplica de seguridad y otra para medir a bordo la concentración total de procariotas heterótrofos. Las alícuotas fueron fijadas con paraformaldehído y glutaraldehído (1% + 0.05% concentraciones finales, respectivamente) y se mantuvieron a 4°C en condiciones de oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Para llevar a cabo la determinación de la densidad, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se mezclaron 0,4 ml de la muestra con 4 μl de una solución diluida 10x de SybrGreen I (Molecular Probes o Sigma) para teñirlas y se hicieron pasar por el citómetro a baja velocidad ($\sim 12 \mu\text{l min}^{-1}$) durante, aproximadamente 2 minutos (Gasol *et al.*, 2012).

3.3 Estimación de la actividad enzimática

Las medidas de actividad enzimática extracelular se realizaron siguiendo el método de hidrólisis de sustratos fluorogénicos inicialmente propuesto por Hoppe en 1983 (Hoppe, 1983) con ligeras modificaciones. La actividad se midió sobre la muestra total de agua, que contenía tanto las enzimas asociadas a las células como las enzimas disueltas, y sobre una muestra previamente filtrada a través de un tamaño de poro de 0,1 μm que contenía, únicamente, las enzimas disueltas. La filtración se realizó cuidadosamente, aplicando presiones suaves y evitando exponer al aire las células tras la filtración, y mediante filtros de membrana de baja retención proteica (Acrodisc® filters, Supor® membrane low protein binding) para evitar la adsorción de las enzimas al filtro (Baltar *et al.*, 2013).

Para medir la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa se utilizó un sustrato análogo fluorogénico, el L-leucina-7-amino-4-metil-cumarina (MCA-L). La utilización de este sustrato se basa en la emisión de un producto fluorescente, metilcumarina (MCA), una vez ha sido hidrolizada y escindida la molécula de interés, en este caso, la leucina. La cantidad de fluorescencia liberada indica la concentración de producto fluorescente liberado y, por tanto, el nivel de actividad enzimática extracelular en la muestra de agua.

La solución del sustrato en metanol al 40% congelada a -20°C y concentrada (x1000) se dejó a temperatura ambiente y se diluyó. Se añadieron 10 μl de estas soluciones a 240 μl de muestra total o muestra filtrada en placas de 96 pocillos, a fin de conseguir una concentración final de sustrato de 250 μM y 1000 μM . Se realizaron las determinaciones a dos concentraciones finales diferentes, 250 μM y 1000 μM , ya que no se tenía certeza de cual podía ser la concentración saturante para cada una de las

diferentes muestras analizadas. Se realizaron 4 réplicas de cada submuestra total y submuestra filtrada. Las placas se incubaron en oscuridad y a temperatura *in situ*. La fluorescencia de las placas se midió inmediatamente después de haber añadido el sustrato y, posteriormente, varias veces durante las siguientes 48 horas de incubación. La fluorescencia se determinó mediante un espectrofluorímetro Synergy 2 (Bio Tek) equipado con un lector de microplacas y sondas de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 365 y 445 nm, respectivamente.

La fluorescencia aumentó linealmente a lo largo del período de incubación. Las unidades de fluorescencia relativa se calibraron con estándares de metilcumarina (MCA) en el rango de 0 a 96 nM de concentración final. Se utilizaron submuestras sin sustrato fluorogénico como muestras control (blanco) para determinar la fluorescencia de fondo de las muestras (Ayo *et al.*, 2017).

3.4 Obtención y análisis de datos

Los valores de fluorescencia obtenidos con el fluorímetro (unidades de fluorescencia, UF) fueron transformados en unidades de concentración (nM) de producto generado mediante la siguiente fórmula:

$$UF = a + b [\text{producto (nM)}]$$

Donde a y b corresponden a los valores obtenidos en las curvas de calibrado para los estándares de MCA.

A partir de la concentración de producto generado, y en función del tiempo de incubación utilizado, se calcularon las velocidades de hidrólisis con sus respectivas medias y desviaciones estándar. Adicionalmente, en las muestras totales se calcularon las velocidades de hidrólisis específicas, normalizando la velocidad de hidrólisis en función de la densidad procariota correspondiente.

Los tiempos de incubación empleados para la realización de los gráficos fueron los más cortos en todas las estaciones y profundidades (7,2 – 8,7 h en la estación 27 y 17 – 18 h en el resto), a excepción de la Estación 33 a una profundidad de 4000 m, en la que se empleó el tiempo de incubación de 47 – 48,2 h debido a la ausencia de incubaciones más breves.

3.5 Análisis estadísticos

Las comparaciones de las velocidades de hidrólisis de cada estación entre las diferentes concentraciones de sustrato modelo empleadas (250 μM y 1000 μM) se realizaron mediante la prueba t de Student para muestras pareadas. Se realizó un ANOVA de un factor para comparar la velocidad de hidrólisis total o la velocidad de hidrólisis disuelta entre las diferentes zonas de la columna de agua (epipelágica, mesopelágica y batipelágica), seguida de un test *post-hoc* de Bonferroni para un total de

tres comparaciones. Y, por otro lado, en base a los resultados, se subdividió la columna de agua en dos zonas: epipelágica y meso – batipelágica, y se realizó una prueba t de Student para muestras pareadas comparando las velocidades de hidrólisis totales y disueltas en cada una de ellas. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$, excepto en el test de Bonferroni que fue de $p < 0,0167$. Todos los análisis se realizaron mediante el programa SPSS Statistics (versión 26).

4. RESULTADOS

Se presentan los valores obtenidos en este estudio resumidos en la Tabla 2. A continuación se realizará una descripción de los aspectos más significativos de dichos resultados.

Tabla 2. Temperatura, densidad bacteriana y velocidades de hidrólisis (total, disuelta y específica) a lo largo de la columna de agua para cada estación muestreada.

| Estación | Profundidad (m) | Temperatura (°C) | Densidad bacteriana (10^7 cél L ⁻¹) | Velocidad de hidrólisis | | |
|----------|-----------------|------------------|--|-----------------------------|--------------------------------|--|
| | | | | Total (nM h ⁻¹) | Disuelta (nM h ⁻¹) | Específica (amol cel ⁻¹ h ⁻¹) |
| 27 | 3 | 26,6 | 52,5 | 9,49 | 7,97 | 18,06 |
| | 129 | 21,0 | 26,3 | 8,68 | 8,13 | 32,98 |
| | 320 | 13,7 | 6,4 | 6,37 | 5,43 | 99,31 |
| | 550 | 9,1 | 5,9 | 4,99 | 5,57 | 83,80 |
| | 750 | 5,5 | 3,2 | 4,52 | 4,66 | 140,30 |
| | 1850 | 3,6 | 1,3 | 4,34 | 4,45 | 323,30 |
| | 4000 | 1,0 | 1,4 | 3,99 | 4,61 | 294,60 |
| 33 | 3 | 23,6 | 50,5 | 6,60 | 5,95 | 13,10 |
| | 120 | 17,9 | 74,7 | 4,59 | 4,62 | 6,14 |
| | 600 | 8,1 | 8,1 | 3,47 | 3,75 | 43,09 |
| | 800 | 4,8 | 5,6 | 3,24 | 3,08 | 57,80 |
| | 1120 | 3,3 | 3,7 | 3,23 | 3,37 | 86,96 |
| | 2600 | 2,8 | 1,6 | 2,98 | 3,22 | 184,70 |
| | 4000 | 1,5 | 1,5 | 1,56 | 1,66 | 101,40 |
| 39 | 3 | 21,7 | 40,0 | 6,41 | 4,94 | 16,03 |
| | 110 | 16,5 | 52,0 | 6,54 | 5,86 | 12,57 |
| | 540 | 8,5 | 15,7 | 3,62 | 4,12 | 22,99 |
| | 800 | 4,7 | 7,6 | 4,49 | 4,23 | 58,87 |
| | 1290 | 3,1 | 4,9 | 3,51 | 3,90 | 71,45 |
| | 3080 | 2,3 | 2,3 | 3,54 | 3,94 | 151,30 |
| | 4000 | 1,7 | 3,1 | 4,02 | 4,74 | 130,20 |
| 40 | 3 | 21,2 | 79,7 | 6,17 | 5,22 | 7,74 |
| | 70 | 16,6 | 62,8 | 6,70 | 4,84 | 10,68 |
| | 450 | 10,7 | 15,8 | 4,74 | 4,87 | 29,97 |
| | 800 | 5,2 | 8,6 | 3,77 | 3,61 | 43,91 |
| | 1300 | 3,2 | 5,2 | 3,60 | 3,81 | 69,26 |
| | 2900 | 2,4 | 2,5 | 3,47 | 3,62 | 137,20 |
| | 4000 | 1,5 | 2,4 | 3,83 | 3,77 | 156,70 |
| 44 | 3 | 20,7 | 115,0 | 8,30 | 6,94 | 7,25 |
| | 56 | 18,3 | 103,0 | 7,66 | 6,60 | 7,46 |
| | 350 | 9,4 | 29,8 | 5,37 | 5,42 | 18,01 |
| | 725 | 4,5 | 13,2 | 5,42 | 6,20 | 41,01 |
| | 1200 | 3,0 | 10,1 | 4,94 | 5,30 | 49,17 |
| | 2600 | 2,6 | 3,6 | 4,93 | 4,99 | 137,80 |
| | 3200 | 2,4 | 3,5 | 4,61 | 4,60 | 131,90 |

4.1 Temperatura y densidad bacteriana

La temperatura presentó un perfil vertical decreciente similar en todas las estaciones (Tabla 2 y Figura 3A). En la zona epipelágica se registraron los valores más altos, que oscilaron entre 20,7°C en la Estación 44 y 26,6°C en la Estación 27.

En las cinco estaciones, la temperatura del agua disminuyó bruscamente hasta la zona mesopelágica, y posteriormente, el descenso fue más suave hasta llegar a valores de 1,5 – 2,3°C en la zona más profunda, aproximadamente, 15 veces inferiores a los observados en la superficie.

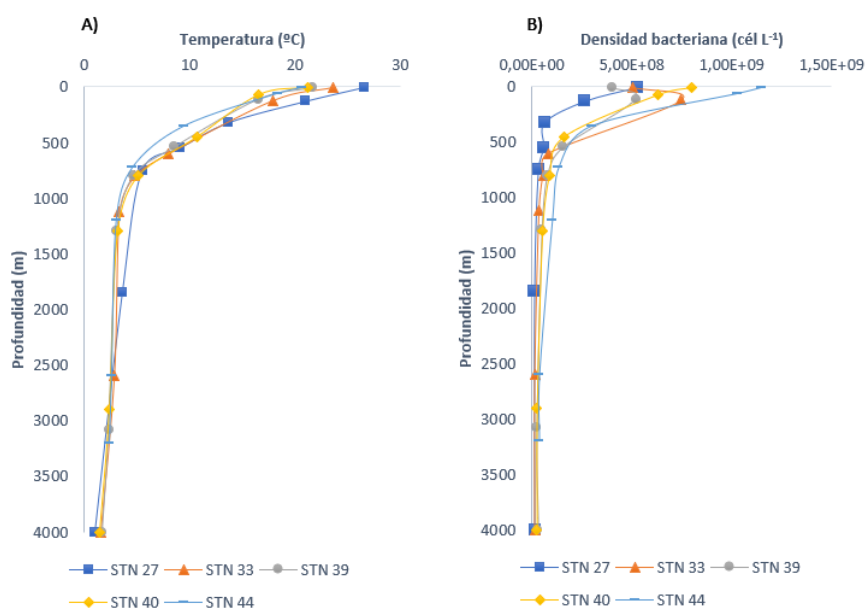


Figura 3. Perfil vertical de A) temperatura y B) densidad bacteriana en las estaciones muestreadas.

La densidad bacteriana no mostró un patrón de disminución lineal, ya que varias estaciones (33 y 39) experimentaron un pequeño aumento en la zona epipelágica subsuperficial seguido de un descenso (Tabla 2 y Figura 3B). La Estación 44 presentó los valores de densidad más altos de la zona epipelágica, que disminuyó en dos órdenes de magnitud hacia la zona más profunda. En el resto de las estaciones, la disminución de la densidad desde la zona epipelágica hasta la zona batipelágica fue de un orden de magnitud.

4.2 Actividad enzimática total y disuelta

La actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa bacteriana se determinó utilizando concentraciones de sustrato fluorogénico, 250 μ M y 1000 μ M. Estas dos concentraciones se utilizaron

con la intención de conseguir una concentración saturante de sustrato, y fueron escogidas tras un análisis de la literatura científica al respecto. Los valores de actividad enzimática extracelular obtenidos se compararon entre sí mediante un test de la t de Student para muestras pareadas que indicó la obtención de valores significativamente superiores ($p = 0,001$ en las estaciones 27 y 33; $p = 0,000$ en las estaciones 39, 40 y 44) en las estimaciones obtenidas con la concentración superior. Es por ello que se asumió la concentración de $1000 \mu\text{M}$ como la saturante, y el resto de obtención y análisis de los resultados se realizó con los datos obtenidos con esta concentración.

La actividad enzimática extracelular proteasa leucina-aminopeptidasa mostró patrones variables en función de la profundidad y la estación a la que pertenecían la muestras, tal y como se muestra en la Figura 4. Sin embargo, en todas las estaciones se pudo observar que la velocidad de hidrólisis total fue superior en la superficie y pasó a ser seis veces inferior en las muestras más profundas.

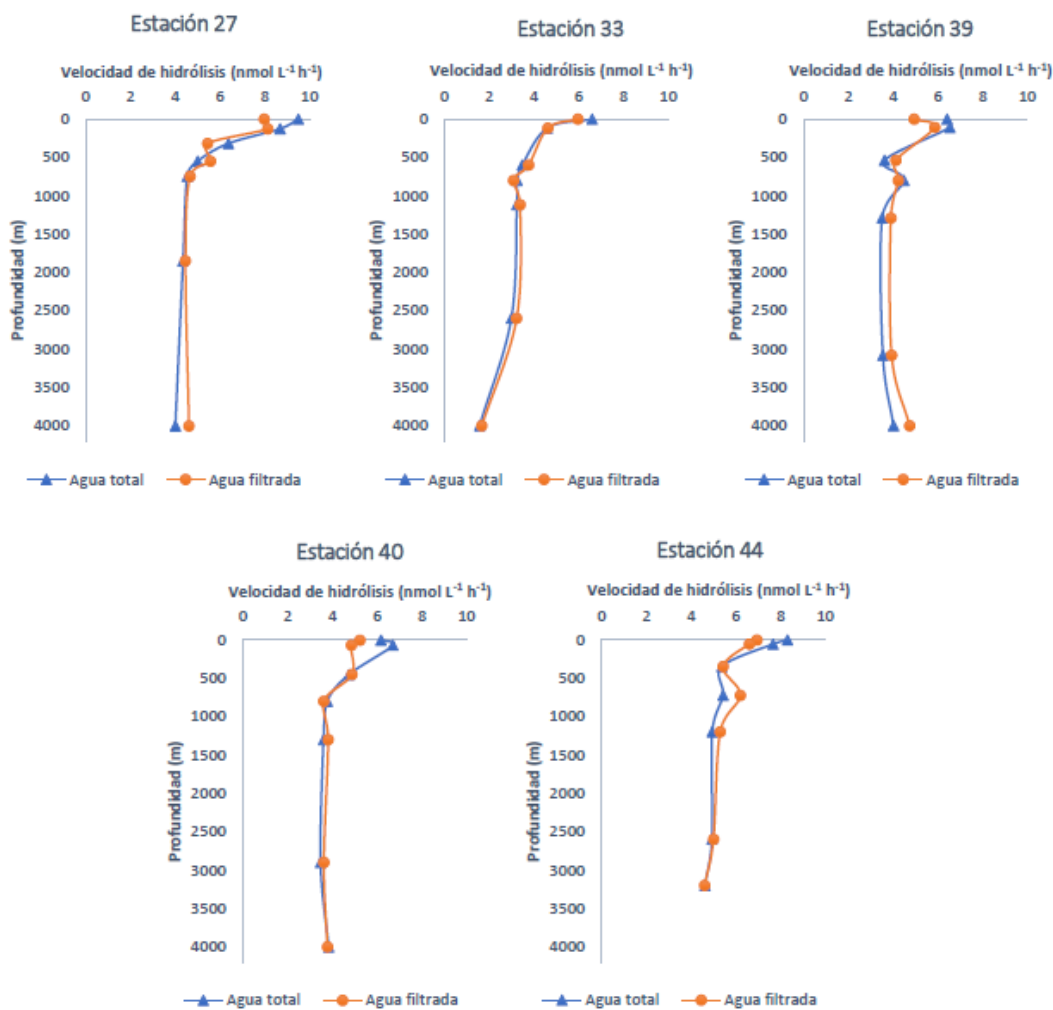


Figura 4. Perfiles verticales de la velocidad de hidrólisis de la leucina-aminopeptidasa de la muestra de agua total y la muestra de agua filtrada en cada una de las estaciones.

En la zona superficial o epipelágica (0 – 200 m), los valores de la velocidad de hidrólisis total descendieron desde 9,49 nmol L⁻¹ h⁻¹ hasta 4,59 nmol L⁻¹ h⁻¹, alcanzando las actividades más elevadas en la Estación 27 seguida de la Estación 44 (Figura 4). Dicha velocidad de hidrólisis continuó disminuyendo, presentando un rango de 3,24 – 6,37 nmol L⁻¹ h⁻¹ en la zona mesopelágica (200 – 1000 m) y un rango de 1,56 – 4,94 nmol L⁻¹ h⁻¹ en la batipelágica (1000 – 4000 m). Los análisis de ANOVA revelaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las tres zonas de la columna de agua, y el test *post-hoc* de Bonferroni determinó que la región epipelágica difería de la meso- y batipelágica ($p < 0,0167$), siendo estas últimas similares entre sí ($p > 0,0167$).

En cuanto a la velocidad de hidrólisis disuelta, se observó una tendencia similar a la de la velocidad de hidrólisis total: se detectó un máximo en la superficie y un valor en profundidad cinco veces inferior al observado en la zona epipelágica. En la zona epipelágica, la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa presentó un rango de entre 4,6 y 8,3 nmol L⁻¹ h⁻¹, que disminuyó ligeramente hacia la región mesopelágica (3,1 – 6,2 nmol L⁻¹ h⁻¹). La velocidad de hidrólisis de las enzimas disueltas continuó disminuyendo en la zona más profunda, oscilando entre 1,7 y 5,3 nmol L⁻¹ h⁻¹ en la capa batipelágica. Este rango fue superior al observado en la zona batipelágica para la velocidad de hidrólisis total (Figura 4). Los análisis de ANOVA obtenidos indicaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las tres zonas de la columna de agua y el test *post-hoc* de Bonferroni mostró que la región epipelágica se diferenciaba de la meso- y batipelágica ($p < 0,0167$), en tanto que estas últimas presentaban similitudes entre sí ($p > 0,0167$).

A fin de determinar la importancia relativa de la actividad de los enzimas extracelulares disueltos frente a la actividad total, se analizó la evolución del porcentaje de actividad disuelta en las distintas profundidades de las cinco estaciones (Figura 5). Sorprendentemente, la actividad enzimática leucina-aminopeptidasa disuelta en la profundidad del océano fue más elevada que la correspondiente a la de la muestra de agua total a varios niveles de profundidad en todas las estaciones.

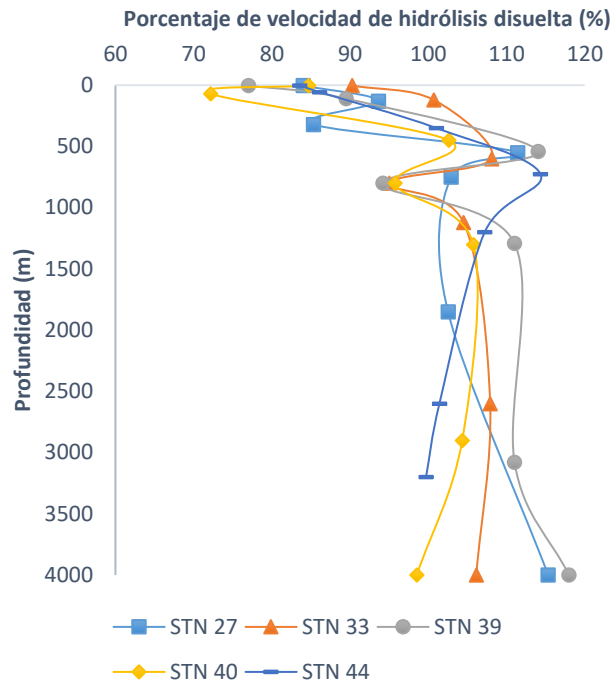


Figura 5. Porcentaje de la velocidad de hidrólisis disuelta LAP en cada estación a lo largo de la columna de agua.

Con el fin de conocer las diferencias en la velocidad de hidrólisis entre la actividad total y disuelta en cada una de las zonas diferenciadas de la columna de agua, es decir, en la zona epipelágica y en la zona meso-batipelágica, se realizó una prueba t de Student que indicó que en ambos casos se observaban diferencias en las actividades entre las dos fracciones ($p < 0,001$ para la zona epipelágica y $p = 0,022$ para la zona meso-batipelágica). En la zona epipelágica, la velocidad de hidrólisis total predominó sobre la disuelta, a diferencia de la zona meso-batipelágica, en la que la fracción disuelta fue ligeramente superior.

4.3 Actividad enzimática específica

La velocidad de hidrólisis específica, analizada a partir de la muestra total, mostró valores muy bajos en la zona epipelágica, inferiores a $40 \text{ amol cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que fueron aumentando a lo largo de la columna de agua hasta una profundidad de 2000 – 3000 m en las que se detectaron valores superiores a $100 \text{ amol cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A mayores profundidades se observó una ligera disminución de este valor, a excepción de la Estación 40, que mostró un incremento progresivo a medida que aumentaba la profundidad (Figura 6).

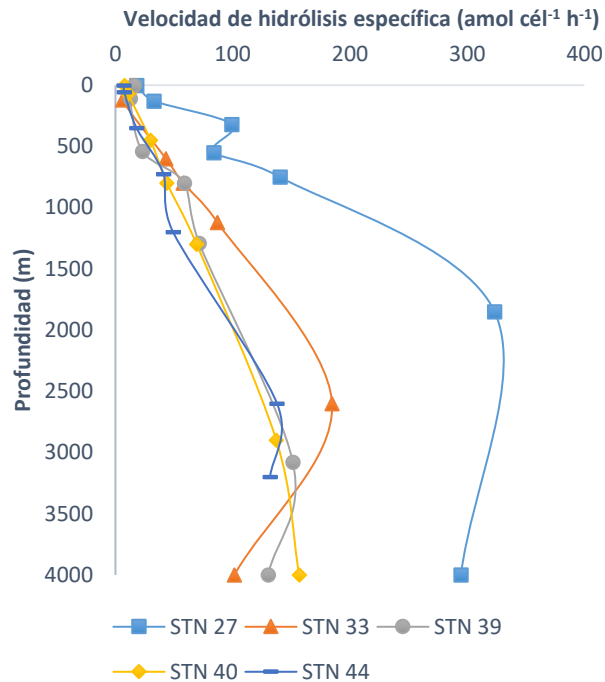


Figura 6. Perfiles verticales de la velocidad de hidrólisis específica obtenida a partir de la muestra de agua total para cada una de las estaciones.

Las variaciones más notorias se observaron en la Estación 27, que mostró un aumento elevado hasta una profundidad de 1850 m, donde se detectaron hasta 323 amol cél⁻¹ h⁻¹.

5. DISCUSIÓN

La actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa contribuye a dos de los ciclos biogeoquímicos más importantes del ambiente marino: el ciclo de carbono y el ciclo del nitrógeno, ya que actúa en la primera etapa de la hidrólisis de material proteico de alto peso molecular. Su estudio mediante el empleo de una concentración saturante de sustratos fluorogénicos proporciona información acerca de la actividad potencial de dicha enzima. Los sustratos naturales son muy diversos y presentan concentraciones desconocidas, probablemente, más bajas que las empleadas durante las incubaciones a lo largo del estudio (Zaccone *et al.*, 2003), por lo que las velocidades de hidrólisis detectadas no son representativas de las velocidades *in situ*. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis potencial sí es indicativa de la capacidad máxima de hidrólisis de un tipo determinado de sustrato por las comunidades microbianas residentes, y permiten la comparación con otras zonas oceánicas en las que también se hayan estudiado velocidades potenciales, por lo que su estimación ayuda a comprender el papel de los microorganismos en el funcionamiento del ecosistema acuático.

En este trabajo se ha comprobado la actividad leucina-aminopeptidasa a dos concentraciones de sustrato modelo, observándose que, en todas las determinaciones, la concentración de 1000 μM generó valores de hidrólisis superiores a los observados para la concentración de 250 μM . En base a esto, se consideró la concentración más elevada como la correcta para conseguir condiciones de saturación necesaria para obtener datos sobre la velocidad de hidrólisis potencial de esta proteasa. En otros estudios se ha observado el empleo de distintas concentraciones del sustrato modelo. Tamburini *et al.* (2002) determinaron 5 μM como la concentración saturante en la región mediterránea. No obstante, a lo largo del Atlántico, el rango de variación en la concentración de sustrato fluorogénico empleado es mucho más amplio, y en general, más elevado, ajustándose al empleado en este trabajo (1 – 2000 μM , Davey *et al.*, 2001; 0,6 – 1200 μM , Baltar *et al.*, 2009; 0,98 – 2000 μM , Baltar *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos indican diferencias entre las capas epipelágica frente a la meso – batipelágica, en la actividad leucina-aminopeptidasa tanto total como disuelta, alcanzándose valores más elevados en las capas superficiales. Asimismo, se observaron diferencias entre la velocidad de hidrólisis total y disuelta en ambas regiones, siendo la fracción total dominante en la capa epipelágica a diferencia de lo que ocurre en la región meso-batipelágica, donde la velocidad de hidrólisis disuelta es ligeramente superior a la total.

El rango de variación de la velocidad de hidrólisis leucina-aminopeptidasa total encontrado en la zona epipelágica del presente trabajo (4,6 – 9,6 nM h^{-1}) difiere notablemente del obtenido en otras regiones oceánicas globales (Tabla 3). En el Atlántico Sur, Hoppe *et al.* (2002) encontraron actividades muy superiores (11,5 – 151,4 nM h^{-1}), al igual que ocurre con los resultados reportados para el Atlántico Norte (21,9 – 87,6 nM h^{-1} ; Davey *et al.*, 2001) y el Mar de Ross (0,8 – 33,7 nM h^{-1} , Misic *et al.*, 2002; 5 – 470,0 nM h^{-1} , Celussi *et al.*, 2009). Las diferencias observadas frente al trabajo de Hoppe *et al.* (2002) pueden explicarse por la escasa profundidad de muestreo que presenta dicho estudio (0 – 11 m). En cuanto al trabajo de Davey *et al.* (2001), la diferencia puede estar relacionada con la concentración de sustrato fluorogénico empleado. Por otro lado, no se ha encontrado ninguna explicación que aclare las diferencias observadas con los datos obtenidos en el Mar de Ross, en el cuál tanto la temperatura a la que fueron recogidas todas las muestras como la concentración de sustrato fluorogénico empleado son inferiores a las del presente estudio (0 – 1°C y 1 – 200 μM , respectivamente), siendo la densidad bacteriana del mismo orden a la obtenida en el Atlántico Sur ($\approx 10^8$ cél L^{-1}). Sin embargo, nuestros resultados de la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa fueron superiores a aquellos observados en el Mediterráneo Noroeste (1,4 – 1,7 nM h^{-1} ; Tamburini *et al.*, 2002), en el Mediterráneo Oeste (0,04 – 1,5 nM h^{-1} ; Zaccone *et al.*, 2012) y en el Mar Jónico (1,3 – 7 nM h^{-1} , Zaccone *et al.*, 2003; 1,5 – 5,4 nM h^{-1} , Zaccone *et al.*, 2010), en los cuales, la concentración de sustrato empleada es muy inferior a la utilizada en este trabajo. En este caso, la explicación subyacente a estas diferencias puede estar relacionada con la diferencia del sistema marino, ya que habitualmente las actividades microbianas detectadas en el Mar Mediterráneo son más bajas que las detectadas en otras zonas del océano global.

Tabla 3. Actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa en el océano global.

| A-ZONA EPIPELÁGICA (0-200 m) | | | | | |
|------------------------------|----------------------------------|---|-------------|--|--------------------------------|
| Rango de profundidad (m) | Región oceánica | Velocidad de hidrólisis (nM h ⁻¹) | | Concentración sustrato fluorogénico (μM) | Referencia |
| | | TOTAL | DISUELTA | | |
| 5 – 200 | Atlántico Norte | 21,9 – 87,6 | 15,9 – 48,1 | 1 – 2000 | Davey <i>et al.</i> , 2001 |
| 0 – 11 | Atlántico Norte | 4,2 – 24,9 | - | 0,1 – 100 | Hoppe <i>et al.</i> , 2002 |
| 5 – 200 | Noreste Atlántico | 2,0 – 20,0 | 1,2 – 2,6 | 500 | Baltar <i>et al.</i> , 2013 |
| 0 – 100 | Atlántico Central | 6,8 | 5,8 | 0,98 – 2000 | Baltar <i>et al.</i> , 2010 |
| 5 – 200 | Atlántico | 0,1 – 0,7 | - | 0,1 – 20 | Zaccone <i>et al.</i> , 2012 |
| 0 – 250 | Atlántico | 10,1 – 12,4 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 0 – 250 | (Sub)tropical Oeste Atlántico | 8,1 – 9,9 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 0 – 11 | (Sub)tropical Este Atlántico Sur | 11,5 – 151,4 | - | 0,1 – 100 | Hoppe <i>et al.</i> , 2002 |
| 3 – 129 | Atlántico Sur | 4,6 – 9,6 | 4,6 – 8,3 | 1000 | <i>Este trabajo</i> |
| 10 – 200 | Mediterráneo Noroeste | 1,4 – 1,7 | - | 5 | Tamburini <i>et al.</i> , 2002 |
| 5 – 200 | Mediterráneo Oeste | 0,04 – 1,5 | - | 0,1 – 20 | Zaccone <i>et al.</i> , 2012 |
| 0 – 70 | Mar Tirreno | 7,4 – 21,7 | - | 5 | Tamburini <i>et al.</i> , 2009 |
| 5 – 100 | Mar Jónico | 1,3 – 7,0 | - | 0,1 – 20 | Zaccone <i>et al.</i> , 2003 |
| 5 – 200 | Mar Jónico | 1,5 – 5,4 | - | - | Zaccone <i>et al.</i> , 2010 |
| 5 – 200 | Mediterráneo Este | 0,4 – 4,9 | - | 0,1 – 20 | Zaccone <i>et al.</i> , 2012 |
| 5 – 200 | Océano Índico | 6 – 25,0 | - | 250 | Hoppe & Ullrich, 1999 |
| 1 – 200 | Mar de Ross | 5,0 – 470,0 | - | 200 | Celussi <i>et al.</i> , 2009 |
| 0 – 200 | Mar de Ross | 0,8 – 33,7 | 0,3 – 23,3 | 1 – 100 | Misic <i>et al.</i> , 2002 |

| B-ZONA MESOPELÁGICA (200-1000 m) | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|---|-----------|--|--------------------------------|
| Rango de profundidad (m) | Región oceánica | Velocidad de hidrólisis (nM h ⁻¹) | | Concentración sustrato fluorogénico (μM) | Referencia |
| | | TOTAL | DISUELTA | | |
| 200 – 1000 | Noreste Atlántico | 1,0 – 9,0 | - | 500 | Baltar <i>et al.</i> , 2013 |
| 250 – 1200 | Atlántico Central | 3,4 – 7,0 | 3,2 – 6,2 | 0,98 – 2000 | Baltar <i>et al.</i> , 2010 |
| 250 – 900 | Atlántico | 5,0 – 10,4 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 250 – 900 | (Sub)tropical Oeste Atlántico | 5,0 – 12,9 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 320 – 800 | (Sub)tropical Este Atlántico Sur | 3,2 – 6,4 | 3,1 – 6,2 | 1000 | <i>Este trabajo</i> |
| 200 – 2000 | Mediterráneo Noroeste | 0,2 – 0,5 | - | 5,0 | Tamburini <i>et al.</i> , 2002 |
| 300 – 700 | Mar Tirreno | 0,1 – 3,8 | - | 5,0 | Tamburini <i>et al.</i> , 2009 |
| 200 – 1500 | Mar Jónico | 0,3 – 1,2 | - | 0,1 – 20 | Zaccone <i>et al.</i> , 2003 |
| 200 – 1000 | Océano Índico | 6,0 – 12,5 | - | 250 | Hoppe & Ullrich, 1999 |
| 200 – 1900 | Mar de Ross | 2,2 – 5,0 | - | 200 | Celussi <i>et al.</i> , 2009 |
| 200 – 430 | Mar de Ross | 3,3 – 6,2 | 0,1 – 0,3 | 1 – 100 | Misic <i>et al.</i> , 2002 |

| C-ZONA BATIPELÁGICA (>1000 m) | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|---|-----------|--|--------------------------------|
| Rango de profundidad (m) | Región oceánica | Velocidad de hidrólisis (nM h ⁻¹) | | Concentración sustrato fluorogénico (μM) | Referencia |
| | | TOTAL | DISUELTA | | |
| 1000 – 3000 | Noreste Atlántico | 0,10 – 5,50 | 1,4 – 2,0 | 500 | Baltar <i>et al.</i> , 2013 |
| 1750 – 3750 | Atlántico Central | 1,80 – 3,20 | 2 – 2,80 | 0,98 – 2000 | Baltar <i>et al.</i> , 2010 |
| 1800 – 2750 | Atlántico | 4,2 – 7,0 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 1800 – 4000 | (Sub)tropical Oeste Atlántico | 2,0 – 6,2 | - | 0,6 – 1200 | Baltar <i>et al.</i> , 2009 |
| 1120 – 4000 | (Sub)tropical Este Atlántico Sur | 1,6 – 4,9 | 1,7 – 5,3 | 1000 | <i>Este trabajo</i> |
| 2500 – 3500 | Mar Tirreno | 0,3 – 8,6 | - | - | Tamburini <i>et al.</i> , 2009 |
| 2000 – 3500 | Mar Jónico | 0,04 – 0,8 | - | 0,1 – 20,0 | Zaccone <i>et al.</i> , 2003 |
| 1000 – 3000 | Océano Índico | 7,0 – 12,0 | - | 250 | Hoppe & Ullrich, 1999 |

En este trabajo también se ha determinado la actividad enzimática leucina-aminopeptidasa disuelta, que no ha sido habitualmente analizada por la comunidad científica (Tabla 3). La velocidad de hidrólisis disuelta mostró una disminución en función de la profundidad, que fue más pronunciada en la región epipelágica (Figura 4). En su estudio, Davey *et al.* (2001) observaron que la actividad de la enzima leucina-aminopeptidasa disuelta en el Atlántico Norte no mostraba apenas variación en los 200 m de profundidad estudiados, datos muy opuestos a los que se exponen en este trabajo, puesto que es en esos primeros 200 m donde la actividad disuelta presenta mayor disminución. Es probable que estas diferencias estén relacionadas con la diferente variación en la temperatura de ambos sistemas oceánicos, ya que en nuestro sistema varió entre los 16 y 26°C y en el estudio de Davey *et al.* (2001), el rango de temperaturas fue notablemente más estrecho, entre 8 y 11°C.

Los estudios que presentan perfiles verticales de la actividad enzimática en el océano abierto que se extiendan hasta las regiones meso- y batipelágica son mucho más escasos que los que estudian la capa epipelágica, esto se debe a la difícil accesibilidad que presentan estas zonas. Así pues, la información que se presenta en este TFG sobre estas capas profundas de la columna de agua puede considerarse como un aporte significativo al escaso conocimiento de las actividades microbiana en los fondos oceánicos, permitiendo conocer más acerca de la importante actividad microbiana que alberga la columna de agua.

En el rango de profundidades mesopelágicas, nuestros datos para la velocidad de hidrólisis total en el Atlántico Sur (3,2 – 6,4 nM h⁻¹) fueron similares a los encontrados en el Atlántico Central por Baltar *et al.* (2010), cuyos resultados oscilan entre 3,4 – 7,0 nM h⁻¹; y los reportados por Misic *et al.* (2002) en el Mar de Ross (3,3 – 6,2 nM h⁻¹). Además, nuestros datos se mantuvieron por encima de las cifras para las regiones mediterráneas, al igual que ocurría en la capa más superficial (Tabla 3). En la zona más profunda de la columna de agua (batipelágica), los datos de este trabajo se ajustaron a los rangos de las velocidades de hidrólisis proporcionados por otros estudios (Zaccone *et al.*, 2003; Baltar *et al.*, 2009; Baltar *et al.*, 2010; Baltar *et al.*, 2013), probablemente porque en los fondos oceánicos las condiciones son más estables y generalizadas.

En cuanto a la actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa de la fracción disuelta, de nuevo escasamente estudiada por la comunidad científica, la región mesopelágica del Atlántico Sur mostró unos datos similares a los obtenidos por Baltar *et al.* (2010) en el océano Atlántico central. No obstante, nuestros datos fueron muy superiores a los observados en el Mar de Ross en un rango de profundidades menor (200 – 430m; Misic *et al.*, 2002) (Tabla 3). Hacia la zona batipelágica, la velocidad de hidrólisis de la fracción disuelta presentó un rango superior al observado en la fracción total de nuestro estudio y duplicó el valor más alto de actividad leucina-aminopeptidasa disuelta registrada en otros estudios (Baltar *et al.*, 2010; Baltar *et al.*, 2013).

La zona epipelágica se caracterizan por presentar mayores niveles de actividad, lo cual puede deberse a que esta capa oceánica presenta mayor abundancia de nutrientes utilizables, temperaturas más cálidas y presiones más bajas, lo que facilita el desarrollo de las comunidades procariotas (Davey *et al.*, 2001; Zacccone *et al.*, 2012). La capa superficial marina se caracteriza por ser la más productiva gracias a los productores primarios (algas unicelulares y cianobacterias) que llevan a cabo la fotosíntesis; y que generan grandes cantidades de macromoléculas que pueden ser empleadas por los procariotas heterótrofos ubicadas en la misma zona epipelágica (Aristegui *et al.*, 2009). Este fenómeno puede observarse en las cinco estaciones muestreadas, donde se han detectado los valores más elevados de la actividad leucina-aminopeptidasa de todo el estudio.

No obstante, los procariotas de la capa epipelágica no hidrolizan todas las macromoléculas presentes, por lo que estas van transportándose hacia abajo en la columna de agua. Durante este proceso de transporte, las moléculas de alto peso molecular siguen siendo hidrolizadas, pero a velocidades más bajas que las que se dan en la zona epipelágica. Los microorganismos de las zonas meso- y batipelágicas, con respecto a los de la superficie, se consideran menos activos debido a distintos factores como son el descenso de la temperatura, la presión hidrostática más severa y la escasez en la disponibilidad de sustratos (Zacccone *et al.*, 2010). Es por ello que esta región oceánica presenta valores de actividad enzimática extracelular leucina-aminopeptidasa inferiores a los observados en la región epipelágica. Sin embargo, es en la capa meso – batipelágica donde se registra una mayor importancia relativa de la velocidad de hidrólisis disuelta frente a la total. Las razones de este fenómeno no son claras, y se han propuesto distintas explicaciones.

Baltar *et al.* (2013) proponen que la alta proporción de actividad enzimática disuelta en el océano abierto ha podido ser originada por los microorganismos asociados a partículas que han sido fragmentadas durante el muestreo y la posterior filtración. Por otro lado, Obayashi y Suzuki (2008), revelan que la adsorción de las enzimas al filtro empleado durante el proceso de filtración depende del material del que este compuesto. Durante este proceso, las enzimas adheridas a las células pueden desprenderse, provocando una sobreestimación de la actividad enzimática disuelta. Por lo que respecta al presente trabajo, es razonable pensar que durante el proceso de filtrado se pudo aplicar una presión superior a la requerida, lo que provocó la rotura de material celular y por tanto, la sobreestimación de la fracción disuelta debido al desprendimiento de enzimas adheridas a la superficie microbiana o incluso la liberación al medio externo de enzimas propias del interior celular..

La profundidad provoca que descienda la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, ralentizando el metabolismo procariota, y con ello, la actividad enzimática. Por estos motivos, la densidad bacteriana se ve disminuida en la zona batipelágica respecto de las capas superiores. A pesar de ello, la velocidad de hidrólisis específica obtenida en este estudio revela que los valores más elevados se encuentran precisamente en esa zona más profunda. Otros autores también observaron resultados muy similares (Tamburini *et al.*, 2002; Zacccone *et al.*, 2003; Baltar *et al.*, 2009; Zacccone *et al.*, 2010). En

nuestro estudio, el perfil de la Estación 27 destacó sobre el resto, ya que presentó velocidades de hidrólisis hasta dos veces superiores a las de los otros puntos muestreados, a pesar de que la densidad bacteriana fuese del mismo orden de magnitud. Esto provocó que la actividad enzimática específica observada también fuese más elevada que en el resto de las estaciones.

Una posible explicación al desajuste que suponen estos resultados es la adhesión de las enzimas libres activas a partículas coloidales que provienen de capas superficiales donde la actividad procariota es más elevada. Esta asociación podría aumentar la resistencia de dicha enzima a la degradación físico-química que puede sufrir durante su transporte vertical (Baltar *et al.*, 2013). Estos autores también proponen que las bajas temperaturas del océano profundo pueden intervenir en la estabilización de las enzimas libres, facilitando su preservación.

Otra posible interpretación plantea que los microorganismos de aguas profundas pueden expresar una mayor cantidad de enzimas que aquellos que viven en la zona epipelágica para poder lograr una misma tasa de hidrólisis (Tamburini *et al.*, 2002; Zaccone *et al.*, 2010). De este modo, a pesar de que la densidad bacteriana sea un orden inferior a la densidad que encontramos en la zona epipelágica, los microorganismos batipelágicos podrían igualar la velocidad de hidrólisis a la de aquellos microorganismos de las capas más superficiales del océano.

Debido a las altas velocidades de hidrólisis que se observan en la capa epipelágica, lo que implica una elevada producción de enzimas extracelulares por parte de las comunidades microbianas residentes, es probable que nuestros elevados valores de velocidad de hidrólisis específica se deban a enzimas que alcanzan la capa batipelágica en estado activo. Dichos enzimas han podido asociarse con partículas que sedimentan y les proporciona mayor protección. Bajo las condiciones de temperatura encontradas en la zona batipelágica de este transecto del Atlántico Sur, la hipótesis que plantea una mayor expresión de enzimas por los procariotas del océano profundo no resulta muy factible.

6. CONCLUSIONES

Este estudio aporta información acerca de la velocidad de hidrólisis de la enzima extracelular leucina-aminopeptidasa a lo largo de la columna de agua de la zona oceánica del Atlántico Sur, tanto para la fracción total que incluye enzimas libres y enzimas adheridas a células, como para la fracción disuelta que hace referencia a las enzimas libres.

1. La actividad enzimática leucina-aminopeptidasa, tanto la asociada a las células como la presente de forma libre en la masa de agua, es máxima en la capa epipelágica de la columna de agua. Su valor disminuye a medida que aumenta la profundidad, aunque el grado de disminución es inferior al que presenta la densidad de procariotas o la temperatura.
2. La velocidad de hidrólisis disuelta en la zona batipelágica presenta mayor importancia relativa que la correspondiente a la fracción total, lo que puede indicar que, durante el proceso de muestreo o filtración, se han producido errores que han conllevado a una sobrestimación de esta actividad. Probablemente, el procedimiento de filtración ha provocado que una cantidad de enzimas adheridos a células se hayan desprendido de su microorganismo productor.
3. Los elevados valores de actividad enzimática por célula en la región meso-batipelágica, a pesar de las bajas densidades bacterianas, sugiere que en esa zona se acumula una gran cantidad de enzimas provenientes de las capas superiores, que llegan a las regiones más profundas y mantienen un cierto grado de actividad.
4. En el transecto estudiado en el Atlántico Sur, en general, las capas epipelágica, mesopelágica y batipelágica presentan niveles de actividad inferiores a los observados en regiones del océano Atlántico Norte. No obstante, los rangos de velocidades obtenidos son superiores a los observados en el Mediterráneo. Estas diferencias pueden deberse a la concentración de sustrato empleada o a diversos factores ambientales, como puede ser la temperatura.

7. BIBLIOGRAFÍA

Antia, N.J., Harrison, P.J. & Oliveira, L. (1991) The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia*, 30(1), 1 – 89. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-30-1-1.1>.

Arístegui, J., Gasol, J. M., Duarte, C. M., & Herndl, G. J. (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnology and Oceanography*, 54(5), 1501 – 1529.

Arrieta, J. M., & Herndl, G. I. (2002). Changes in bacterial β -glucosidase diversity during a coastal phytoplankton bloom. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 594 – 599. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0594>.

Arrieta, J. M., Mayol, E., Hansman, R. L., Herndl, G. J., Dittmar, T. & Duarte, C. M. (2015). Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science*, 348(6232), 331 – 333. DOI: 10.1126/science.1258955originally

Ayo, B., Abad, N., Baña, Z., Unanue, M. & Iriberry, J. (2012). Actividad enzimática de los procariotas planctónicos. In Moreno-Ostos, E. *Expedición de circunnavegación Malaspina 2010: cambio global y*

exploración de la biodiversidad del océano: libro blanco de métodos y técnicas de trabajo oceanográfico. Madrid: Editorial CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Ayo, B., Abad, N., Artolozaga, I., Azua, I., Baña, Z., Unanue, M., ... Iriberrí, J. (2017). Imbalanced nutrient recycling in a warmer ocean driven by differential response of extracellular enzymatic activities. *Global Change Biology*, 23(10), 4084 – 4093. <https://doi.org/10.1111/gcb.13779>

Baltar, F., Arístegui, J., Sintés, E., Van Aken, H. M., Gasol, J. M. & Herndl, G. J. (2009). Prokaryotic extracellular enzymatic activity in relation to biomass production and respiration in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environmental Microbiology*, 11(8), 1996 – 2014. DOI:10.1111/j.1462-2920.2009.01922.x

Baltar, F., Arístegui, J., Gasol, J. M., Sintés, E., Van Aken, H. M. & Herndl, G. J. (2010). High dissolved extracellular enzymatic activity in the deep central Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 58, 287 – 302. DOI: 10.3354/ame01377

Baltar, F., Arístegui, J., Gasol, J. M., Yokokawa, T. & Herndl, G. J. (2013). Bacterial versus archaeal origin of extracellular enzymatic activity in the Northeast Atlantic deep waters. *Microbial Ecology*, 65, 277 – 288. DOI 10.1007/s00248-012-0126-7

Busto, M.D. & Pérez-Mateos, M. (1995). Extraction of humic- β -glucosidase fractions from soil. *Biology and Fertility of Soils*, 20(1), 77 – 82.

Celussi, M., Cataletto, B., Umani, S. F. & Del Negro, P. (2009). Depth profiles of bacterioplankton assemblages and their activities in the Ross Sea. *Deep – Sea Research I*, 56, 2193 – 2205.

Christian, J. R., & Karl, D. M. (1998). Ectoaminopeptidase specificity and regulation in Antarctic marine pelagic microbial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(3), 303 – 310. <https://doi.org/10.3354/ame015303>.

Chróst, R. J. (1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In Chróst R.J. (Eds), *Microbial enzymes in aquatic environments* (pp. 29 – 59). Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. New York: Springer, NY.

Chróst, R. J. & Siuda, W. (2002). Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems, In Burns, R. C. and Dick, R. P., *Microbial Enzymes in the Environment Activity, Ecology, and Applications* (pp. 35 – 72). New York: Marcel Dekker, Inc; 2002.

Cunha, A., & Almeida, A. (2009). Inorganic nutrient regulation of bacterioplankton heterotrophic activity in an estuarine system (Ria de Aveiro, Portugal). *Hydrobiologia*, 628(1), 81 – 93.

- Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F. J. R. C., Gomes, N. C. M., Oliveira, V., & Santos, A. L. (2010). Bacterial extracellular enzymatic activity in globally changing aquatic ecosystems. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial Biotechnology*, 1, 124 – 135.
- Davey, K. E., Kirby, R. R., Turley, C. M., Weightman, A. J. & Fry, J. C. (2001). Depth variation of bacterial extracellular enzyme activity and population diversity in the northeastern North Atlantic Ocean. *Deep – Sea Research II*, 48, 1003 – 1017.
- Duarte, C. M. (2015). Seafaring in the 21st Century: The Malaspina 2010 Circumnavigation Expedition. *Limnology and Oceanography Bulletin*, 24, 11 – 14. <https://doi.org/10.1002/lob.10008>.
- Gasol, J.M., Sarmiento, H., Morán, X. A. G. (2012). Determinación de la abundancia y la actividad individual de bacterias y arqueas mediante citometría de flujo. In Moreno-Ostos, E. *Expedición de circunnavegación Malaspina 2010: cambio global y exploración de la biodiversidad del océano: libro blanco de métodos y técnicas de trabajo oceanográfico*. Madrid: Editorial CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).
- Gomes, A., Gasol, J.M., Estrada, M., Franco – Vidal, L., Díaz – Pérez, L., Ferrera, I. & Morán, X.A.G. (2015). Heterotrophic bacterial responses to the winter – spring phytoplankton bloom in open waters of the NW Mediterranean. *Deep – Sea Research I*, 96, 59 – 68. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2014.11.007>
- Hoppe, H. G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, 11, 299 – 308.
- Hoppe, H. G., Kim, S. J., & Gocke, K. (1988). Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake. *Applied Environmental Microbiology*, 54(3), 784 – 790.
- Hoppe, H. G. & Ullrich, S. (1999). Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 139 – 148.
- Hoppe, H. G., Gocke, K., Koppe, R. & Begler, C. (2002). Bacterial growth and primary production along a north–south transect of the Atlantic Ocean. *Nature* 416(6877), 168 – 172.
- Meybeck, M. (1982) Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *American Journal of Science*, 282(4), 401 – 450.
- Misic, C., Povero, P. & Fabiano, M. (2002). Ectoenzymatic ratios in relation to particulate organic matter distribution (Ross Sea, Antarctica). *Microbial Ecology*, 44, 224 – 234. DOI: 10.1007/s00248-002-2017-9.
- Obayashi, Y. & Suzuki, S. (2008). Adsorption of extracellular proteases in seawater onto filters during size fractionation. *Journal of Oceanography*, 64(3), 367 – 372.

- Rao, M., Sannino, F., Nocerino, G., Puglisi, E. & Gianfreda, L. (2003). Effect of air-drying treatment on enzymatic activities of soils affected by anthropogenic activities. *Biology and Fertility of Soils*, 38(5), 327 – 332.
- Ryther, J.H. & Dunstan, W.M. (1971). Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171(3975), 1008 – 1013. DOI: 10.1126/science.171.3975.1008
- Seltmann, G. & Holst, O. (2002). *The Bacterial Cell Wall*. Berlin, New York : Springer – Verlag. DOI : 10.1007/978-3-662-04878-8.
- Steen, A. D., Vazin, J. P., Hagen, S. M., Mulligan, K. H., & Wilhelm, S. W. (2015). Substrate specificity of aquatic extracellular peptidases assessed by competitive inhibition assays using synthetic substrates. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(3), 271–281. <https://doi.org/10.3354/ame01755>.
- Stepanauskas, R., Edling, H., & Tranvik, L.J. (1999). Differential dissolved organic nitrogen availability and bacterial aminopeptidase activity in limnic and marine waters. *Microbial Ecology*, 38(3), 264 – 272.
- Tamburini, C., Garcin, J., Ragot, M. & Bianchi, A. (2002) Biopolymer hydrolysis and bacterial production under ambient hydrostatic pressure through a 2000m water column in the NW Mediterranean. *Deep – Sea Research II*, 49, 2109 – 2123.
- Tamburini, C., Garel, M., Al Ali, B., Mérigot, B., Kriwy, P., Charrière, B. & Budillon, G. (2009). Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the different water masses of the Tyrrhenian Sea. *Deep – Sea Research II*, 56, 700 – 712.
- Zaccone, R., Monticelli, L. S., Santinelli, C., Azzaro, M., Boldrin, A., La Ferla, R. & Ribera d’Alcalà, M. (2003). Bacterial processes in the intermediate and deep layers of the Ionian Sea in winter 1999: Vertical profiles and their relationship to the different water masses. *Journal of geophysical research*, 108 (C9). DOI:10.1029/2002JC001625
- Zaccone, R., Caruso, G., Azzaro, M., Azzaro, F., Crisafi, E., Decembrini, F., ... Bruni, V. (2010). Prokaryotic activities and abundance in pelagic areas of the Ionian Sea. *Chemistry and Ecology*, 26, 169 – 197. DOI: 10.1080/02757541003772914
- Zaccone, R., Boldrin, A., Caruso, G., La Ferla, R., Maimone, G., Santinelli C. & Turchetto, M. (2012). Enzymatic activities and prokaryotic abundance in relation to organic matter along a West – East Mediterranean transect (TRANSMED Cruise). *Microbial Ecology*, 64, 54 – 66. DOI 10.1007/s00248-012-0011-4