

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR MICROBIANA EN EL OCÉANO

Naiara Abad Trueba

Leioa, 2020

eman ta zabal 2020



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Actividad enzimática extracelular microbiana en el océano

Naiara Abad Trueba

Supervisoras

Dra. María Antonia Unanue Vivanco

Dra. María Begoña Ayo Millan



Leioa, 2020

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de Tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda del Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador No Doctor concedida por Gobierno Vasco en 2010. El trabajo presentado aquí ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación “Diversidad y Función del Bacterioplancton en el Cantábrico Oriental: Depredación y Recursos Como Motores del Cambio Estacional (CAMBIO)” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CTM2010-19308) y “Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CSD2008-00077).

A mi familia y amigas

RESUMEN

La materia orgánica de alto peso molecular no es directamente accesible para los procariotas, ya que su tamaño impide el transporte a través de las envolturas celulares. Mediante la actividad enzimática extracelular esta materia es transformada en compuestos de bajo peso molecular, de modo que ya pueden ser incorporadas y utilizadas. Por lo tanto, este proceso microbiano es fundamental en la regulación de la regeneración de los nutrientes inorgánicos y del flujo de carbono a través de la red trófica microbiana. En esta tesis doctoral se ha estudiado la distribución de un conjunto representativo de actividades enzimáticas extracelulares tanto en aguas superficiales costeras como en las zonas epi- y batipelágica de aguas oceánicas; adicionalmente, en el contexto actual de cambio climático, se ha analizado el efecto de la temperatura en las enzimas extracelulares de aguas superficiales oceánicas. El análisis interanual de las cinéticas evidenció la existencia simultánea de un sistema enzimático de alta afinidad y de baja afinidad, que son reflejo de la capacidad de los distintos grupos funcionales de bacterias para hacer frente a las fluctuaciones ambientales que ocurren durante el ciclo estacional. El estudio comparativo de las actividades enzimáticas extracelulares en posibles escenarios de calentamiento de las aguas superficiales oceánicas demostró un enriquecimiento en carbono de la materia orgánica de bajo peso molecular con respecto al nitrógeno y el fósforo, lo que contribuiría a la expansión de las áreas oligotróficas, especialmente en las zonas cercanas a los polos geográficos. Por último, se observó una estrecha conectividad funcional entre las aguas superficiales y profundas del océano tropical y subtropical, reflejo del aporte continuo de agregados orgánicos procedente de la zona epipelágica, tal y como explica la bomba biológica de carbono.

Tabla de contenidos

TABLA DE CONTENIDOS	VI
INTRODUCCIÓN	1
Actividad enzimática extracelular y materia orgánica en el océano	3
Estudio de la actividad enzimática extracelular	6
Efecto de la temperatura en la actividad enzimática extracelular	8
OBJETIVOS DE LA TESIS	11
Objetivos de la tesis	13
Desarrollo de los objetivos 1 y 2	15
Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, B- y α-glucosidasa en aguas superficiales costeras	
Justificación y objetivos	17
Material y métodos	18
Área de estudio y toma de muestras	19
Actividades enzimáticas extracelulares	20
Otras variables del ecosistema	23
Tratamiento estadístico	25
Resultados	26
Determinación de los parámetros cinéticos	26
Dinámicas temporales de las actividades enzimáticas extracelulares	29
Dinámicas temporales de los productores primarios del ecosistema	31
Dinámicas temporales de la composición de la comunidad bacteriana del ecosistema	34
Material suplementario	37
Desarrollo del objetivo 3	51
Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas B-glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano	
Justificación y objetivos	53
Material y métodos	56
Área de estudio y toma de muestras	56
Medida de las actividades enzimáticas extracelulares	56
Efecto de la temperatura en la actividad enzimática extracelular	58
Estequiometría de los productos liberados	60
Tratamiento estadístico	61
Resultados	61
Método de "sustitución de espacio por tiempo"	61

Manipulación experimental de la temperatura	62
Proyecciones en un escenario de calentamiento global de aguas oceánicas	67
Material suplementario	69
Desarrollo de los objetivos 4 y 5	77
La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo	
Justificación y objetivos	79
Material y métodos	82
Área de estudio y toma de muestras	82
Actividad enzimática potencial	84
Ensayos cinéticos	86
Estabilidad de las enzimas disueltas	89
Tratamiento estadístico	90
Resultados	91
Análisis comparativo de las zonas epi- y batipelágica del océano	91
Estabilidad de las enzimas extracelulares	97
Material suplementario	99
DISCUSIÓN	105
Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, β - y α -glucosidasa en aguas superficiales costeras	107
Consideraciones metodológicas	107
La relevancia ecológica de los sistemas enzimáticos de alta y baja afinidad	110
Relación entre los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares y las variables del ecosistema	112
Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano	117
La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo	121
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	135
Bibliografía	137

1

INTRODUCCIÓN.

1. Actividad enzimática extracelular y materia orgánica en el océano

La materia orgánica del agua de mar es una mezcla compleja de compuestos orgánicos de diversa composición química, estructura física y reactividad (Nagata, 2008) y constituye uno de los mayores almacenes de carbono del planeta, comparable al del CO₂ atmosférico (Hedges, 1992; Carlson y Hansell, 2015). Utilizando técnicas de ultrafiltración, los componentes de la materia orgánica se pueden separar en dos categorías: por un lado, materia orgánica de alto peso molecular (> 1 kDa), que supone un 22 % del carbono total del océano e incluye coloides y geles, macromoléculas y otros componentes disueltos. Por otro lado, materia orgánica de bajo peso molecular (< 1 kDa), que incluye moléculas disueltas tales como aminoácidos y monosacáridos y que habitualmente se encuentran en concentraciones <1 μM (Keil y Kirchman, 1994; Bronk, 2002; Nagata, 2008; Amon y Benner, 2015).

En aguas oceánicas, la materia orgánica muestra fluctuaciones temporales debido a los diversos mecanismos de producción (Passow, 2002; Simon *et al.*, 2002): producción primaria y secreción extracelular por parte de organismos autótrofos (Baines y Pace 1991; Biersmith y Benner, 1998; Mykkestad, 2000; Thornton, 2014), excreción mediada por procesos de depredación por parte del zooplancton o lisis celular (Middelboe *et al.*, 1996; Blackburn *et al.*, 1998; Suttle, 2007;), producción por parte de los procariotas (Herndl y Reinthaler, 2013) y solubilización de partículas y agregados (Simon *et al.*, 2002; Carlson y Hansell, 2015). Asimismo, se distribuye de manera heterogénea a lo largo de un continuo de tamaños, que están estrechamente relacionados con los procesos diagenéticos a los que ha sido sometida y al grado de reactividad: las partículas más grandes son de más reciente producción y, por tanto, más lábiles, mientras que las partículas más pequeñas tienden a ser más recalcitrantes (Amon y Benner, 1996; Benner y Amon, 2015).

Entre todos los mecanismos de producción mencionados, la producción primaria en la zona eufótica de la columna de agua y la subsiguiente liberación de productos extracelulares es uno de los factores más influyentes en la disponibilidad de materia orgánica (Mykkestad, 2000; Thornton, 2014). De hecho, la secreción de materia orgánica por parte del fitoplancton supone entre un 30-60 % del carbono orgánico

disuelto y representa la fuente primaria más importante para el sustento del metabolismo de la comunidad bacteriana (Biddanda y Benner, 1997; Mykkestad, 2000).

En lo que se refiere a la composición de la materia liberada, un 37 % corresponde con componentes de alto peso molecular (Aluwihare y Repeta, 1999) y está principalmente enriquecida en compuestos carbonatados y en menor medida nitrogenados (Thornton, 2014 y referencias en este documento). No obstante, la composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica (Biersmith y Benner, 1998; Becker *et al.*, 2014; Villacorte *et al.*, 2015) y/o las condiciones de crecimiento (Geider y La Roche, 2002; Bertilsson *et al.*, 2003) influyen en la composición bioquímica y en la cantidad de materia orgánica disuelta que es liberada al medio.

La materia orgánica de alto peso molecular no es directamente accesible para los procariontes, ya que su tamaño impide el transporte a través de las envolturas celulares (Chróst, 1991; Arnosti, 2003). Mediante la síntesis y secreción de enzimas extracelulares, esta materia es hidrolizada en compuestos de bajo peso molecular, de modo que ya pueden ser incorporados por las células mediante difusión pasiva (Decad y Nikaido, 1976) o por transporte activo a través de porinas (Weiss *et al.*, 1991) para su posterior procesamiento. Una fracción es respirada liberando CO₂, otra es destinada a la producción, que se traduce en biomasa, y una fracción del carbono inicialmente captado se excreta como carbono orgánico disuelto (Arnosti, 2011). Por lo tanto, la actividad de las enzimas extracelulares juega un papel determinante en la transformación de la materia orgánica disuelta en biomasa, que puede transferirse a niveles superiores de la red trófica microbiana (Azam *et al.*, 1983), y en la regeneración de los nutrientes inorgánicos en los sistemas marinos (Goldman y Dennett, 2000).

Las bacterias heterótrofas, están consideradas como el núcleo esencial en la transformación y mineralización de la materia orgánica de la biosfera (Cho y Azam 1988), si bien es cierto que otros organismos como arqueas (Baltar *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2020), protistas (Karner *et al.*, 1994) y zooplancton (Bochdansky *et al.*, 1995) pueden contribuir en menor medida a la actividad enzimática extracelular. En lo que se refiere a las enzimas responsables de la hidrólisis de la materia orgánica de alto peso molecular, estas pueden ser ectoenzimas si están asociadas a las envolturas celulares, o enzimas extracelulares si son secretadas al medio (Chróst, 1991). Por simplicidad, a lo largo de esta tesis doctoral se utilizará el término genérico actividad enzimática extracelular, que engloba la actividad conjunta de ectoenzimas y enzimas extracelulares.

Son múltiples los factores que influyen en la síntesis y secreción de las enzimas por parte de las bacterias, entre otros, la presencia del sustrato (Alderkamp *et al.*, 2007) o percepción del quorum (Mislán *et al.*, 2014), entre otras. Dado que la secreción de enzimas es un proceso energéticamente costoso a nivel individual porque supone una pérdida de carbono y nitrógeno, resulta prioritario para las bacterias heterótrofas regular la producción de enzimas en función de la presencia del compuesto polimérico y rentabilizar la inversión metabólica realizada en forma de liberación de monómeros (Koch, 1985; Vetter *et al.*, 1998; Berkhout *et al.* 2013, Sinsabaugh *et al.* 2014, Traving *et al.*, 2015).

Bajo esta premisa, las ectoenzimas serían rentables desde el punto de vista energético para las células solitarias en un entorno de bajas concentraciones de sustrato (Vetter *et al.*, 1998; Traving *et al.*, 2015); por el contrario, cuando las concentraciones de sustrato son altas, la secreción de enzimas al medio puede resultar beneficiosa. Esta afirmación vendría secundada por diversos trabajos en los que se ha observado un aumento de la actividad hidrolítica en los agregados con respecto al agua circundante (Smith *et al.*, 1992; Azúa *et al.*, 2003; Grossart *et al.*, 2007; Jatt *et al.*, 2015) o durante períodos de *blooms* fitoplanctónicos (Teeling *et al.*, 2012 y 2016). De hecho, los agregados pueden ser una fuente de enzimas extracelulares y de liberación de monómeros por difusión, de la que pueden llegar a beneficiarse las comunidades de vida libre (Cho y Azam, 1988; Nagata *et al.*, 2000; Kiørboe y Jackson, 2001).

Por último, es importante resaltar que la relevancia de la actividad de las enzimas extracelulares en los ciclos biogeoquímicos de los océanos está directamente relacionada con su capacidad de dispersión y su vida media. Existe muy poca y muy variable información sobre la vida media de las enzimas extracelulares en sistemas marinos y los escasos estudios existentes estiman que puede ser de unas decenas de horas a varios días (Bochdansky *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Steen y Arnosti, 2011; Baltar *et al.*, 2013; Thomson *et al.*, 2019). Esta escala temporal permite sugerir que la actividad de las enzimas extracelulares puede tener efecto en sitios bien diferenciados de su lugar de producción (Wetzel, 1991; Ziervogel y Arnosti, 2008; Ziervogel *et al.*, 2010) y plantear si las enzimas disueltas que se producen en la zona eufótica de la columna de agua podrían llegar a ser una fuente potencial de actividad hidrolítica en el océano profundo.

2. Estudio de la actividad enzimática extracelular

Se han realizado multitud de estudios en diversos ecosistemas acuáticos a fin de caracterizar la actividad enzimática extracelular, bien mediante la adición de sustratos fluorogénicos o de sustratos de alto peso molecular marcados con fluorescencia (Arnosti, 2011; Sinsabaugh y Follstad Shah, 2012; Sinsabaugh *et al.*, 2014).

De entre todas las actividades enzimáticas, las más comunmente estudiadas incluyen la leucina y alanina aminopeptidasa, que hidrolizan dos de los más abundantes aminoácidos del extremo **N-terminal de los polipéptidos y las proteínas**; α - y β -1,4-glucosidasa, que hidrolizan los enlaces glicosídicos de los glucanos de almacenamiento y estructurales; N-acetil- β -D-1,4-glucosaminidasa, que cataliza la reacción terminal en la hidrólisis de la quitina; y la fosfatasa, que hidroliza enlaces de éster de monofosfato (Hoppe *et al.*, 2002; Sinsabaugh y Follstad Shah, 2012). No obstante, hay que tener en cuenta que una sola clase de enzima funcional puede presentar diversas estructuras **moleculares** (Domań-Pytka y Bardowski, 2004), tal y como demostraron Arrieta y Herndl (2002) en el caso de β -glucosidasa o Steen *et al.* en el caso de aminopeptidasa (2015). Por tanto, las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente son en realidad consecuencia de un conjunto heterogéneo de isoenzimas actuando de manera sinérgica sobre el sustrato añadido.

A la hora de estudiar la hidrólisis de la materia orgánica, son numerosos los trabajos que utilizan una única concentración saturante de sustrato (p. ej. Allison *et al.* 2012, Celussi y Negro 2012; Baña *et al.*, 2020). Si bien es cierto que conocer la variabilidad de la actividad potencial es de gran interés, la caracterización cinética de las enzimas extracelulares secretadas en condiciones ambientales específicas permite establecer conexiones entre la expresión de las enzimas y la disponibilidad de sustrato (Sinsabaugh *et al.*, 2014) y conocer, por tanto, el grado de adaptación de la comunidad bacteriana a la materia orgánica disuelta del ecosistema. Sin embargo, los estudios cinéticos son más bien escasos en la literatura, por lo que cabe preguntarse si no existe un importante déficit en conocimiento a este respecto.

Asimismo, a la hora de determinar los parámetros cinéticos, es habitual ajustar la curva respuesta a la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, dado que la materia orgánica del agua de mar es una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos y que las comunidades bacterianas secretan al medio un conjunto amplio de isoenzimas con

diferente afinidad (Williams, 1973; Vrba *et al.*, 1996), deberían considerarse modelos más complejos para la determinación de los parámetros cinéticos en muestras naturales (Vrba *et al.*, 1996). Aunque esta aproximación metodológica ha sido utilizada en estudios con muestras de suelo (Nannipieri *et al.*, 1982; Panikov *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 2001; Tischer *et al.*, 2015), son escasos y antiguos los estudios de cinéticas multifásicas de procesos de hidrólisis de la materia orgánica de alto peso molecular en sistemas acuáticos marinos (Talbot y Bianchi, 1997; Tholosan *et al.*, 1999; Unanue *et al.*, 1999).

En lo que se refiere a los ecosistemas marinos, la franja costera representa la zona de transición donde la tierra y el mar abierto interactúan entre sí, por lo que frecuentemente se caracterizan por tener patrones hidrográficos locales y por ser regiones dinámicas, lo que las convierte en un objeto de estudio de gran interés (Hoppe *et al.*, 2002). Es por ello por lo que actualmente se tiene conocimiento de sus dinámicas y son varios los estudios que apuntan hacia la variabilidad estacional en la producción primaria fitoplanctónica y en la composición de la comunidad bacteriana como importantes condicionantes de la degradación extracelular de la materia orgánica (Allredge *et al.*, 1995; Arrieta y Herndl, 2002; Teeling *et al.*, 2012 y 2016; Baña *et al.*, 2020).

Asimismo, son numerosas las investigaciones de actividades enzimáticas extracelulares realizadas en aguas superficiales del océano abierto (p. ej. Davey *et al.*, 2001; Misic *et al.*, 2006; Ayo *et al.*, 2017). De manera general, las medidas de actividad enzimática en aguas superficiales suelen ser superiores a las de aguas profundas (Nagata *et al.*, 2010; Arnosti, 2011) y se han observado gradientes espaciales de actividad hidrolítica congruentes con la variabilidad espacial de la composición de las comunidades microbianas (Martiny *et al.*, 2006; Pommier *et al.*, 2007; Fuhrman *et al.*, 2008). Sin embargo, son muy escasos los estudios de actividades enzimáticas extracelulares en aguas de las zonas meso- y batipelágica del océano (Koike y Nagata, 1997; Hoppe y Ullrich, 1999; Tamburini *et al.*, 2002 y 2009; Baltar *et al.*, 2009, 2010 y 2013). Si tenemos en cuenta el enorme volumen de agua que abarcan, la falta de estudios realizados en aguas profundas limita notablemente la comprensión del funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos del océano (Arístegui *et al.*, 2009).

En contraposición a las aguas superficiales, donde existe una amplia disponibilidad de materia orgánica utilizable (Benner y Amon, 2015), la materia orgánica del océano profundo se caracteriza por unas ratios C:N superiores debido al consumo preferencial

del nitrógeno frente al carbono durante su descenso por la columna de agua (Benner, 2002) y que se atribuye principalmente a la actividad enzimática bacteriana (Baltar *et al.* 2013; Zhiao *et al.*, 2020). La transformación microbiana de la materia orgánica a lo largo de la columna de agua, que deriva en la producción de compuestos recalcitrantes y resistentes a la degradación, se denominó “bomba microbiana de carbono” (Jiao *et al.*, 2010) y está descrita como uno de los principales procesos de secuestro de carbono en el océano. Este paradigma ha sido recientemente cuestionado por Arrieta *et al.* (2015), que demostraron que el océano profundo contiene una gran variedad de pequeñas moléculas (200-700 Da) presentes en concentraciones muy bajas, lo que hace que la inversión energética necesaria para su captación y degradación no sea rentable a nivel celular.

Teniendo en cuenta ambas premisas, no dejan de ser asombrosos, por un lado, los altos niveles de actividad enzimática total y por célula medidos en la zona batipelágica del océano y, por otro lado, la mayor contribución de la fracción disuelta a la actividad total en aguas profundas que en aguas superficiales (Baltar *et al.* 2009, 2010 y 2013). Todos estos resultados conducen al planteamiento de nuevas hipótesis y ponen de manifiesto la necesidad de realizar un estudio en profundidad de las actividades hidrolíticas en distintas masas oceánicas desde la capa fótica hasta la zona batipelágica y de los factores que determinan su actividad.

3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática extracelular

El aumento antropogénico de las emisiones de los gases de efecto invernadero (predominantemente CO₂) ha generado una serie de cambios a escala global, entre los que se incluye el aumento generalizado de la temperatura (Sarmiento *et al.*, 2010). En concreto, la temperatura del océano superficial ha aumentado alrededor de 1 °C desde 1900 y se prevé un incremento progresivo de entre 1 y 3 °C a lo largo del siglo XXI (Collins *et al.*, 2013), provocando una cascada de cambios en el funcionamiento del océano global. En particular, se han encontrado evidencias de la expansión de los giros subtropicales oceánicos y, a consecuencia de ello, de las áreas oligotróficas del océano (Polovina *et al.*, 2008 y 2011). Asimismo, el aumento de la temperatura también reduce la densidad del agua y, por lo tanto, la estratificación y la circulación, lo que implica

una reducción en el flujo de nutrientes e incide aún más en la oligotrofización del océano (Sarmiento *et al.*, 2004).

La temperatura está considerada como un importante factor regulador de la actividad microbiana en los sistemas acuáticos, ya que afecta a la velocidad a la que ocurren la mayor parte de los procesos químicos y biológicos (Iriberry *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 2004). El efecto de la temperatura se puede caracterizar mediante la energía de activación (E_a), que es el parámetro que describe la sensibilidad intrínseca a la temperatura de una reacción bioquímica concreta (Arrhenius, 1889) y su valor se deduce a partir de la pendiente de la ecuación de Arrhenius.

Son numerosos los trabajos publicados analizando el efecto del aumento de temperatura sobre los distintos procesos microbianos en el medio marino. Gran parte de ellos se han centrado en los microorganismos fotosintéticos y la producción primaria (Morán *et al.*, 2010; Chavez *et al.*, 2011), pero son más escasos los trabajos sobre el efecto en la comunidad microbiana heterótrofa. En el caso de los procariontes, se ha estudiado principalmente el efecto del aumento de temperatura sobre los procesos de producción (Apple *et al.*, 2006; Huete-Stauffer *et al.*, 2015) y respiración (Apple *et al.*, 2006; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007; Regaudie-De-Gioux y Duarte, 2012). Adicionalmente, los resultados obtenidos parecen indicar que el aumento de temperatura tiene un mayor efecto sobre los procesos microbianos heterótrofos con respecto a los procesos autótrofos (López-Urrutia 2006; Regaudie-de-Gioux, 2012; Lara *et al.*, 2013; Vaquer-Sunyer *et al.*, 2013).

Sin embargo, la sensibilidad a la temperatura de la hidrólisis de la materia orgánica de alto peso molecular aún no ha sido analizada en profundidad, lo que genera incertidumbre en torno a cómo se van a ver alterados los ciclos biogeoquímicos del océano debido al calentamiento progresivo de las aguas. En lo que respecta a las actividades enzimáticas extracelulares, apenas existen trabajos y la mayoría de ellos se han centrado en sistemas árticos (Vetter y Deming, 1994 y referencias en este documento; Piontek *et al.*, 2014), lo que contrasta con la amplia bibliografía existente para sistemas terrestres (Trasar-Cepeda *et al.*, 2007; Wallenstein *et al.*, 2009; German *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2012; Steinweg *et al.*, 2013; Koyama *et al.*, 2013; Bárta *et al.*, 2014).

Aunque es evidente el papel crucial de los microorganismos dentro de un contexto de cambio climático, rara vez son objeto de debate y no se tienen en cuenta en la elaboración de políticas de gestión (Cavicchioli *et al.*, 2019). Existe todavía una gran

incertidumbre en torno a cómo afectará un incremento progresivo de la temperatura a la biodiversidad de las comunidades microbianas y, en consecuencia, a las actividades fisiológicas que llevan a cabo y las interacciones con la materia orgánica disuelta del océano futuro (Moran *et al.*, 2016). Por tanto, resulta imprescindible generar un mayor conocimiento a este respecto, dado que la capacidad de adaptación de los microorganismos a los nuevos nichos ecológicos que surjan condicionará a su vez la capacidad de otros organismos de responder al cambio climático (Cavicchioli *et al.*, 2019).

2

OBJETIVOS DE LA TESIS.

El objetivo principal de esta tesis es obtener conocimientos sobre la distribución de las actividades enzimáticas extracelulares tanto en aguas oceánicas de superficie y de la zona batipelágica como en aguas costeras, así como comprender los factores que influyen en su variabilidad, combinando diferentes aproximaciones metodológicas. En el contexto actual de cambio climático, se ha dedicado especial atención a analizar el efecto que el incremento de la temperatura tendrá sobre este proceso heterótrofo y las posibles consecuencias para el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos del océano. Para el estudio de la actividad enzimática en aguas oceánicas y el efecto de la temperatura se utilizó la base de datos de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico (tropical y subtropical) generada a lo largo de la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*. El análisis de la variabilidad estacional de los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa se realizó durante tres anualidades en la estación costera de Arminza (Bizkaia) que el grupo de investigación *Microbios marinos* (UPV/EHU) viene monitorizando desde 2011.

A continuación, se indican los objetivos específicos:

1. Identificar el modelo que mejor describe la cinética de las actividades leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa en aguas superficiales de la costa de Bizkaia durante tres anualidades e interpretar su relevancia ecológica.
2. Caracterizar la variación estacional de los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa en aguas superficiales costeras de la costa de Arminza (Bizkaia) y su relación con los productores primarios y con los cambios en la composición de la comunidad bacteriana.
3. **Determinar la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano en un gradiente latitudinal mediante la estimación de la energía de activación (E_a). Los datos obtenidos posibilitarán simular el incremento de las velocidades de hidrólisis en escenarios de calentamiento global y evaluar los posibles cambios en la estequiometría de los productos liberados y, consecuentemente, en el estado trófico de la zona eufótica del océano.**
4. Analizar comparativamente la actividad leucina aminopeptidasa en las zonas epipelágica y batipelágica en el océano y relacionar su variabilidad con el contexto ecológico particular de cada zona. El análisis contempla determinar los niveles de

actividad potencial total y disuelta, los parámetros cinéticos y su respuesta al incremento de temperatura en estos dos ecosistemas tan diferenciados.

5. Determinar la estabilidad de las enzimas disueltas leucina aminopeptidasa en aguas superficiales del océano a distintas temperaturas con el fin de predecir la persistencia de su actividad y evaluar su posible contribución a la actividad extracelular en la zona batipelágica.

3

Desarrollo de los objetivos 1 y 2:

Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, β - y α -glucosidasa en aguas superficiales costeras.

1. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

La materia orgánica de alto peso molecular no es directamente accesible para los procariotas, ya que su tamaño impide el transporte a través de las envolturas celulares (Chróst, 1991; Arnosti, 2003). Las bacterias heterótrofas, mediante la síntesis de enzimas extracelulares, son capaces de transformar esta materia en compuestos de bajo peso molecular (<600 Da) de modo que ya pueden ser incorporados por las células mediante difusión pasiva (Decad y Nikaido, 1976) o principalmente transporte activo mediante porinas (Weiss *et al.*, 1991). Este proceso heterótrofo llevado a cabo por las bacterias es un importante mecanismo de transformación de la materia orgánica disuelta y resulta esencial en la regulación de la regeneración de nutrientes inorgánicos y flujo de carbono a través de la red trófica microbiana (Azam y Cho, 1988).

La actividad enzimática extracelular en sistemas acuáticos ha sido ampliamente determinada tanto utilizando sustratos fluorogénicos (Hoppe, 1983; Somville y Billen, 1983) como sustratos marcados con fluorescencia (Pantoja *et al.*, 1997; Arnosti, 2000). Asimismo, son numerosos los trabajos que utilizan una única concentración saturante de sustrato (V_{sat}) para caracterizar el comportamiento enzimático en estudios de campo (Obayashi y Suzuki, 2008; Allison *et al.*, 2012; Celussi y Negro, 2012; Baña *et al.*, 2020), experimentos con micro- y mesocosmos (Alldredge *et al.*, 1995; Unanue *et al.*, 1998; Pinhassi *et al.*, 1999; Azúa *et al.*, 2003) y a lo largo de la columna de agua (Misic *et al.*, 2006; Baltar *et al.*, 2009 y 2010).

Por el contrario, existen relativamente pocos estudios cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares y suelen restringirse a muestreos que abarcan un período de corta duración (menos de un año de seguimiento). Sin embargo, la determinación de los parámetros cinéticos en condiciones medioambientales específicas resulta de gran interés dado que aporta información acerca del grado de adaptación de la comunidad bacteriana en la utilización de la materia orgánica disuelta del ecosistema y, por tanto, permite establecer conexiones entre la expresión de las enzimas y la disponibilidad de sustrato (Sinsabaugh *et al.*, 2014).

En la zona eufótica de los sistemas costeros, son varios los mecanismos de producción de materia orgánica disuelta descritos y, entre todos ellos, la producción autóctona por parte del fitoplancton representa la fuente primaria más importante para la comunidad bacteriana (Baines y Pace, 1991; Mykkestad, 2000). Dada la naturaleza compleja y heterogénea de la materia orgánica disuelta y teniendo en cuenta que un mismo sustrato puede ser hidrolizado por distintas isoenzimas con diferente afinidad

(Williams, 1973; Vrba *et al.*, 1996), resulta improbable que el comportamiento enzimático esté bien caracterizado en función del modelo de Michaelis-Menten “sustrato-enzima-producto”. En consecuencia, deberían considerarse modelos más complejos para la determinación de los parámetros cinéticos en muestras naturales (Vrba *et al.*, 1996; Talbot y Bianchi, 1997; Tholosan *et al.*, 1999; Unanue *et al.*, 1999).

Con todo lo mencionado anteriormente, se han planteado dos objetivos para este capítulo. El primero ha sido la determinación, mediante el ajuste a modelos de distinta complejidad, de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares (Chróst, 1991) leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa en aguas superficiales de la estación costera Armintza (Bizkaia). Estas actividades enzimáticas han sido elegidas debido a que los péptidos y carbohidratos constituyen la fracción mayoritaria de materia orgánica disuelta en el océano y tienen un papel fundamental en el crecimiento bacteriano en aguas oceánicas (Münster y Chróst, 1990). El segundo objetivo ha sido caracterizar la variabilidad de los parámetros cinéticos a lo largo del ciclo estacional durante tres anualidades. Partiendo de la hipótesis de que los cambios en la disponibilidad de materia orgánica y/o en la composición de la comunidad bacteriana tienen un efecto en el conjunto de enzimas secretadas, se han analizado las correlaciones contemporáneas y desplazadas en el tiempo entre los parámetros cinéticos y los productores primarios del ecosistema y los grupos filogenéticos más relevantes de la comunidad bacteriana. La representación de las correlaciones resultantes en mapas de relaciones permite profundizar en la relación de acontecimientos que tienen lugar dentro de las dinámicas complejas de un ecosistema natural (Ruan *et al.*, 2006).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa y su variabilidad a lo largo del ciclo estacional se llevó a cabo siguiendo la siguiente estrategia de trabajo (Figura 1).

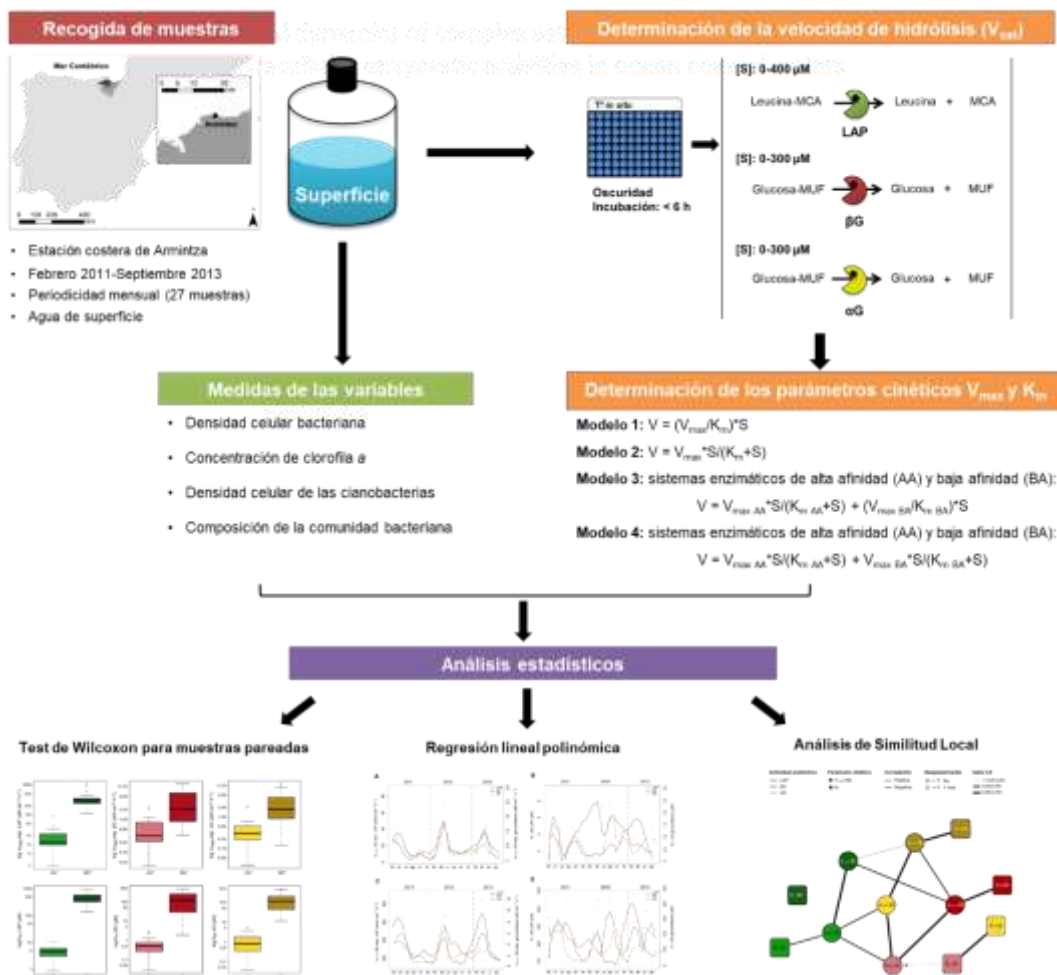


Figura 1: Esquema general de la estrategia de trabajo utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa, su variabilidad a lo largo del ciclo estacional y su relación con factores ambientales.

2.1 Área de estudio y toma de muestras

Entre febrero de 2011 y septiembre de 2013 se recogieron con periodicidad mensual un total de 27 muestras. Debido a condiciones climatológicas adversas, no hubo recogida de muestras en diciembre 2011, septiembre 2012 y enero y mayo 2013. Los muestreos se realizaron entre las 9:00-9:30 de la mañana (hora local) en la estación costera de Arminza (43°44' N, 2°90' O), situada en la zona oriental del Mar Cantábrico (Figura 2). La estación se encuentra a 500 m de la línea de costa, tiene

aproximadamente 15-18 metros de profundidad, y se considera poco influida por descargas fluviales directas con aportes de origen antrópico.

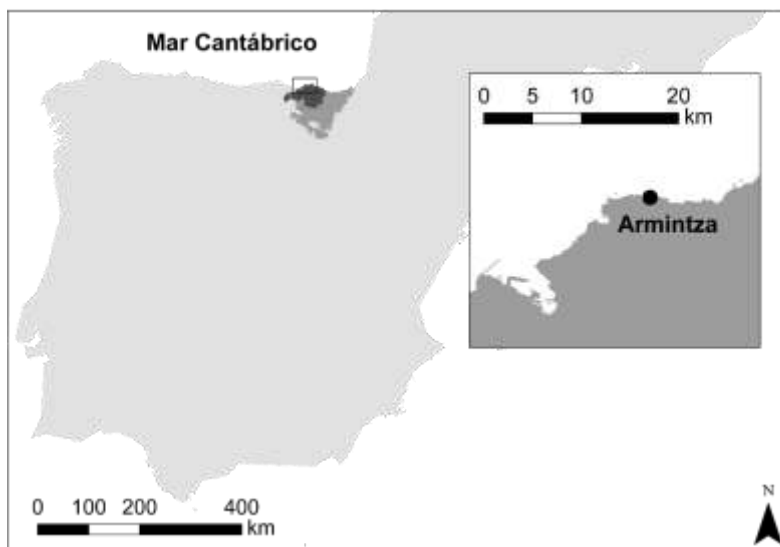


Figura 2: Localización geográfica de la estación costera de Armitza (43°44' N, 2°90' O), situada en la zona oriental del Mar Cantábrico.

Las muestras de agua de superficie se recogieron con un recipiente de 10 litros de polietileno y se prefiltraron *in situ* por 100 μm para eliminar zooplancton. Una vez almacenadas en bidones de 10 litros, las muestras se mantuvieron en oscuridad y en frío y fueron transportadas hasta el laboratorio del grupo *Microbios Marinos* de la UPV/EHU para su análisis. Todo el material había sido previamente lavado con ácido clorhídrico al 1 % y aclarado con agua Milli-Q.

2.2 Actividades enzimáticas extracelulares

2.2.1 Preparación de las muestras y los reactivos

El volumen de agua necesario para realizar la medición de las actividades enzimáticas extracelulares se recogió en una botella opaca quemada a 400 °C durante 4 horas.

Las velocidades de hidrólisis se determinaron mediante el uso de sustratos fluorogénicos (Hoppe, 1983). Los sustratos análogos fueron de hidrocloreuro de L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina, 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido y 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido para la estimación de las actividades

potenciales de leucina aminopeptidasa (LAP), β -glucosidasa (β G) y α -glucosidasa (α G) respectivamente. Las unidades de fluorescencia se transformaron en concentración de producto liberado mediante rectas de calibrado de 7-amino-4-metilcumarina para LAP y 4-metilumbeliferona para β G y α G. Las soluciones concentradas de los reactivos fueron preparadas disolviendo el producto en polvo en metanol al 40 % y se guardaron congeladas (-35 °C) y en oscuridad hasta su uso.

Las soluciones de trabajo de los reactivos se prepararon en una microplaca el mismo día del ensayo cinético mediante diluciones seriadas a la mitad con agua Mili-Q. Se añadieron 10 μ l de cada dilución a 240 μ l de muestra de agua de mar con el objetivo de conseguir en cada pocillo las 12 concentraciones experimentales finales deseadas, que estuvieron en el rango de 0-400 μ M para LAP y 0-300 μ M para β G y α G. Se siguió el mismo procedimiento para conseguir las concentraciones finales de producto en las rectas de calibrado, que fueron de 0-1000 nM para MCA y 0-500 nM para MUF.

Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas negras de 96 pocillos (Nunc) que se midieron en un espectrofluorímetro (Synergy 2, Biotek) en longitudes de onda de 365 nm excitación/445 nm emisión. Las microplacas se incubaron a temperatura *in situ* y se realizaron medidas a lo largo de las siguientes 24 h de incubación, aunque en la mayoría de los casos, un tiempo de incubación de 3-6 h fue suficiente para detectar incrementos lineales significativos de fluorescencia. Las medidas se realizaron por cuadruplicado y se utilizaron submuestras sin sustrato para determinar la fluorescencia intrínseca de la muestra. Experimentos previos realizados con agua marina costera hervida demostraron que la hidrólisis abiótica de sustrato no era significativa.

Los datos brutos fueron tratados a través del software de análisis de datos *Gen5*[™], y las velocidades de hidrólisis se expresaron como nanomoles de producto (MUF o MCA) liberado por litro y por hora ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$).

Debido a errores en el procedimiento experimental, no se obtuvieron medidas enzimáticas de leucina aminopeptidasa en las muestras de julio 2011 y julio 2013.

2.2.2 Determinación de los parámetros cinéticos

La velocidad máxima de la reacción enzimática (V_{max} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$) y la constante de saturación de Michaelis (K_m , μM), que indica la afinidad enzima-sustrato, fueron

calculadas mediante la regresión de mínimos cuadrados no lineales utilizando la función *nls* del paquete *stats* del software R (R Development Core Team, Austria). Para ello, se siguió la estrategia de trabajo propuesta por Vrba *et al.* (1996), basada en el ajuste progresivo a cuatro modelos cinéticos de las curvas respuesta obtenidas. Los cuatro modelos, ordenados según su complejidad son los siguientes:

Modelo 1: representa un sistema monofásico en la región de orden 1 de la cinética:

$$V = T_t \cdot S$$

Donde V es la velocidad de hidrólisis de la reacción, T_t es el tiempo de recambio (equivalente al recíproco de la ratio V_{\max}/K_m) y S es la concentración de sustrato.

Modelo 2: representa un sistema monofásico que se ajusta a la ecuación convencional propuesta por Michaelis-Menten (Michaelis y Menten, 1913):

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S}$$

donde V_{\max} es la velocidad máxima de la reacción obtenida a concentración saturante de sustrato y K_m es la concentración de sustrato a la cual se obtiene $\frac{1}{2}$ de V_{\max} .

Modelo 3: representa un sistema bifásico, resultado de dos grupos de isoenzimas independientes con diferente afinidad por el sustrato y cuyas cinéticas se ajustan al modelo 2, para el sistema enzimático de alta afinidad (AA), y al modelo 1, para el de baja afinidad (BA), respectivamente:

$$V = \frac{V_{\max AA} \cdot S}{K_{m AA} + S} + T_{t BA} \cdot S$$

Modelo 4: representa un sistema bifásico, resultado de dos grupos de isoenzimas independientes con diferente afinidad por el sustrato y cuyas cinéticas se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten. Los índices corresponden con el sistema enzimático de alta afinidad (AA) y baja afinidad (BA):

$$V = \frac{V_{\max AA} \cdot S}{K_{m AA} + S} + \frac{V_{\max BA} \cdot S}{K_{m BA} + S}$$

La bondad del ajuste de cada uno de los modelos se examinó mediante el criterio de información de Akaike corregido (AICc), dado que la prueba F de Fisher tiene tendencia a elegir el modelo más simple cuando los modelos que se están comparando

entre sí son similares, incluso cuando el modelo complejo es más correcto (Ludden *et al.*, 1994; Glatting *et al.*, 2007). El modelo más complejo fue considerado válido para un posterior análisis cuando mejoró de manera significativa el ajuste del modelo más simple, es decir, cuando se obtuvo un menor valor del AICc.

La velocidad máxima específica (V_{\max} esp) se calculó dividiendo la velocidad máxima de la reacción enzimática por la densidad bacteriana (ver apartado 2.3. *Otras variables del ecosistema*) correspondiente a cada muestra.

2.3 Otras variables del ecosistema

2.3.1 Densidad celular bacteriana

La densidad celular bacteriana se determinó mediante microscopía de epifluorescencia siguiendo el protocolo establecido por Porter y Feig (1980). En cada muestreo se tomaron volúmenes de 10 ml de agua de mar, y se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico (concentración final 2 % v/v). Submuestras fijadas de 1 ml se tiñeron con DAPI (4´6´-diamidino-2-fenilindol) (concentración final 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 10-15 minutos en oscuridad y se filtraron a través de filtros negros de policarbonato de 25 mm y 0,22 μm de tamaño de poro. En cada filtro se contaron al menos 400 bacterias en 20 campos de microscopio escogidos al azar. La densidad celular bacteriana ($\text{cel}\cdot\text{l}^{-1}$) se calculó aplicando un factor de conversión específico del microscopio.

2.3.2 Concentración de clorofila *a*

Los datos de concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) se obtuvieron del satélite AQUA-MODIS de la Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio (NASA). En concreto, se utilizaron los ficheros de nivel 3 (L3) con una resolución espacial de 4 km x 4 km. Los ficheros se trataron con el paquete *RNetCDF* del software R (R Development Core Team, Austria).

2.3.3 Densidad celular de cianobacterias

La determinación de la densidad celular de los organismos fitoplanctónicos *Synechococcus* y *Prochlorococcus* se llevó a cabo con citometría de flujo siguiendo la técnica descrita por Marie *et al.* (1999). La muestra de agua natural sin fijar se analizó en un citómetro Becton-Dickinson FACScalibur equipado con un láser de emisión a 488 nm. Para cada muestra, se realizó una calibración mediante el uso de una

suspensión de microesferas fluorescentes de 1 μm ($10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$). Las muestras se analizaron con flujo alto durante 10 minutos o hasta la adquisición de 100.000 eventos. La separación e identificación se realizó en función la dispersión lateral de la luz como aproximación al tamaño relativo de las células y la emisión de fluorescencia en los espectros de luz naranja (585/42 nm), indicador de la presencia de ficoeritrina, y rojo (670 nm), indicador de la presencia de clorofila. Por último, se sumaron las densidades celulares de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* como una aproximación a la densidad de las cianobacterias.

2.3.4 Composición de la comunidad bacteriana

La composición de la comunidad bacteriana se determinó mediante la técnica CARD-FISH siguiendo el protocolo establecido por Pernthaler *et al.* (2002). Se fijaron 25 ml de muestra de agua de mar con paraformaldehído (concentración final 2 % v/v) y se mantuvieron durante 24 h a 4 °C en oscuridad. Tras este periodo, las muestras se **filtraron a través de filtros de policarbonato de 0,22 μm (Millipore GTTP)**, se lavaron con agua Milli-Q y se conservaron congelados (-20 °C).

Para el procesamiento, los filtros se embebieron en agarosa de bajo punto de solidificación y se incubaron con lisozima durante 1 h a 37 °C. Los filtros se hibridaron con oligonucleótidos específicos marcados con peroxidasa de rábano (HRP). Las sondas utilizadas fueron: Eub338 (I) para detectar Eubacterias generales (Amann *et al.*, 1990), Eub338 (II y III) para detectar Planctomicetales y Verrucomicrobiales (Daims *et al.*, 1999), SAR11-441R para detectar miembros del grupo SAR11, ROS537 para detectar miembros de *Roseobacter* y miembros de SAR83, Gam42a para detectar *Gammaproteobacteria* (Manz *et al.*, 1992) y CF319a para detectar *Bacteroidetes* (Manz *et al.*, 1996). La sonda Non338 (Wallner *et al.*, 1993) se utilizó como control negativo. La incubación se llevó a cabo durante 2 h a 35 °C seguidas de 15 min de amplificación con Tiramida-Alexa488. La concentración de formamida en el tampón de hibridación fue específica para cada sonda: 55 % en todos los casos, con la excepción de Alf968 (45 %) y Non338 (20 %). Por último, los filtros se tiñeron con DAPI y se contaron por microscopía de epifluorescencia. Las proporciones relativas de los distintos grupos se calcularon respecto a la densidad celular total de procariotas en la muestra.

2.4 Tratamiento estadístico

Las diferencias entre los parámetros cinéticos de los sistemas de alta y baja afinidad de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas fueron analizadas con el prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas ($p \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *IBM SPSS Statistics* (versión 24) para Windows.

Los datos experimentales de V_{\max} específica y K_m se modelizaron mediante regresión local polinómica utilizando la función *loess* del paquete *stats* del software R (R Development Core Team, Austria) con el objetivo de eliminar ruido de fondo y poder encontrar patrones estacionales a lo largo del período de estudio. Tras un análisis previo del ajuste de ecuaciones polinómicas a los datos experimentales de los parámetros cinéticos y validado con el método AICc, se consideró ajustar las curvas a una ecuación polinómica de orden 1 con un período de 0,15.

En la modelización posterior se excluyeron algunas muestras debido a que el valor anómalo de los parámetros cinéticos enmascaraba la detección de patrones estacionales. La muestra de febrero de 2011 se excluyó en el análisis de la V_{\max} específica de alta afinidad para β -glucosidasa y α -glucosidasa y del análisis de V_{\max} específica de baja afinidad para leucina aminopeptidasa y α -glucosidasa. Asimismo, se excluyó la muestra de septiembre de 2013 en el análisis de K_m de leucina aminopeptidasa y β -glucosidasa.

Las asociaciones entre las dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas y las variables del ecosistema se analizaron mediante el *Análisis de Similitud Local* (LSA, Ruan *et al.*, 2006). El LSA calcula correlaciones contemporáneas y desplazadas en el tiempo basándose en datos normalizados y ordenados en rangos. De esta forma, genera coeficientes de correlación, denominados *local similarity correlations (ls)*, que son análogos al coeficiente de correlación de Spearman.

En el análisis se incluyeron los parámetros cinéticos V_{\max} específica y K_m de alta y baja afinidad de las tres actividades enzimáticas estudiadas junto con otras variables del ecosistema. Por un lado, se incluyeron la concentración de clorofila *a* y la densidad celular de cianobacterias como indicadores de cambios en el tipo de materia orgánica presente en el ecosistema a lo largo del ciclo estacional. Por otro lado, se incluyeron los

grupos filogenéticos más abundantes de la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo estacional como representativos de la liberación de las distintas enzimas.

La matriz de análisis estuvo compuesta por 32 filas y 18 columnas, siendo cada fila una muestra y cada columna una variable. En los casos concretos en los que no se disponía de datos, dado que las fechas de recogida de muestra estaban separadas entre sí por un período de un mes, se asumió un cambio gradual de las variables del ecosistema y se aplicó una interpolación lineal de los valores perdidos (Ruan *et al.*, 2006).

El análisis LSA se realizó con 1000 permutaciones y aceptando un desplazamiento máximo de un mes. Las asociaciones significativas ($p \leq 0,05$) que fueron consideradas para una interpretación posterior se eligieron según los siguientes criterios. Por un lado, el valor de la tasa de falso descubrimiento o valor Q, que por definición es la estimación de la fracción de falsos positivos cuando una correlación es declarada significativa, debía ser inferior a 0,05. Por otro lado, la longitud de las muestras alineadas debía ser superior a 16 muestras, lo que equivaldría a considerar aquellas asociaciones que tuvieron lugar en al menos la mitad de las muestras del estudio. De entre todas aquellas asociaciones que cumplieron estos requisitos, se eligió aquella con el mejor valor de correlación de similitud local (*ls score*) en la mayor longitud de secuencia posible.

Las matrices de correlación resultantes se representaron en un mapa de relaciones utilizando el programa Cytoscape 3.7.2 (Shannon *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de los parámetros cinéticos

La **Figura 3** muestra los cuatro modelos utilizados para determinar los parámetros cinéticos de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas. De acuerdo con el criterio estadístico aplicado, el modelo 4 fue el que mejor se ajustó a las cinéticas de leucina aminopeptidasa (LAP) en todas las muestras analizadas (**Tabla S2**). En el caso de las glucosidasas, el modelo 4 también fue el más representativo (94 % de los casos), con las excepciones de las muestras de octubre y noviembre de 2011 de β -glucosidasa (β G), para las cuales el modelo 2 fue el más adecuado, y la muestra de noviembre de 2011 para α -glucosidasa (α G), que se ajustó mejor al modelo 3 (**Tabla S2**). Por lo tanto, podría afirmarse que, de manera general, las curvas respuesta de las cinéticas se

ajustaron mejor al modelo 4 y pusieron de manifiesto la existencia de dos sistemas enzimáticos diferentes, de alta y baja afinidad, a lo largo de todo el estudio.

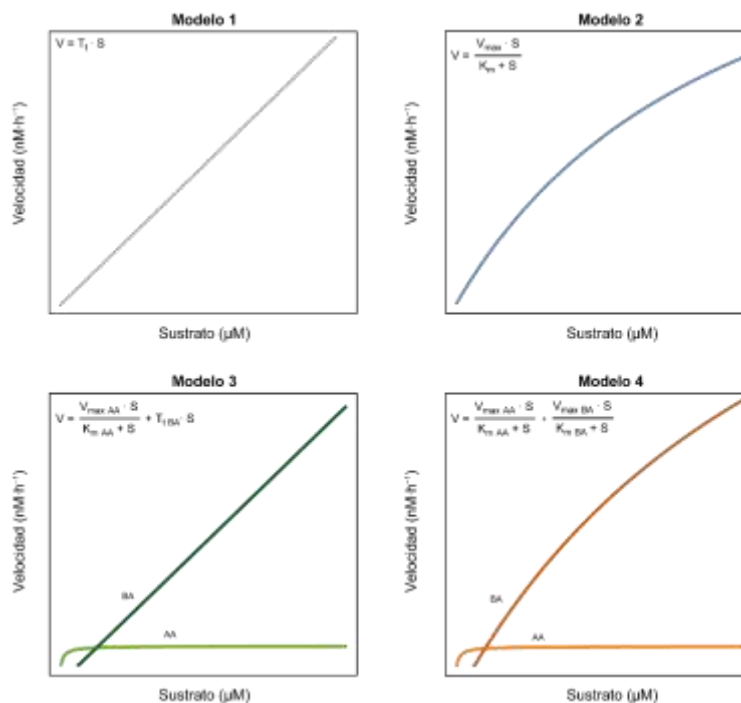


Figura 3: Representación de los cuatro modelos utilizados para determinar los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa (AA: alta afinidad; BA: baja afinidad).

El sistema enzimático de alta afinidad prevaleció a bajas concentraciones de sustrato, en concreto $<25 \mu\text{M}$ en el caso de LAP, $<19 \mu\text{M}$ en el caso de βG y, por último, $<38 \mu\text{M}$ para αG (Figura 4 y Tabla S3). En el caso de LAP, los dos sistemas enzimáticos se distinguieron claramente tanto en los valores de velocidad máxima específica (V_{\max} esp $_{AA}$: $2\text{-}90 \text{ amol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ vs. V_{\max} esp $_{BA}$: $116\text{-}1083 \text{ amol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) como en los valores de la constante de saturación de Michaelis ($K_{m AA}$: $0,9\text{-}11 \mu\text{M}$ vs. $K_{m BA}$: $143\text{-}983 \mu\text{M}$) (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, $n=26$ y $p \leq 0,01$ en todos los casos). No obstante, los parámetros cinéticos de LAP para el sistema de baja afinidad deben interpretarse con cautela, dado que el rango de concentraciones de sustrato utilizado en los ensayos cinéticos está muy alejado de las condiciones de saturación.

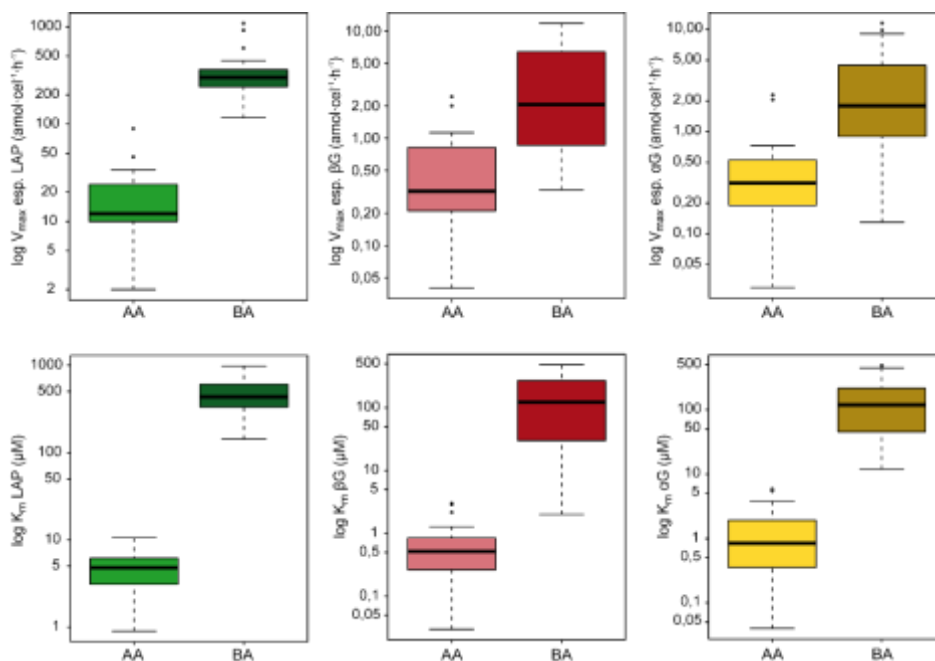


Figura 4: Diagrama de cajas de los parámetros cinéticos V_{max} específica (arriba) y K_m (abajo) de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas: leucina aminopeptidasa (LAP, verde), β -glucosidasa (β G, granate) y α -glucosidasa (α G, amarillo). Los parámetros cinéticos se han distinguido en color claro para el sistema de alta afinidad (AA) y color oscuro para el sistema de baja afinidad (BA). En todos los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos sistemas enzimáticos (prueba de Wilcoxon, $p \leq 0,01$).

De la misma forma, los valores de los parámetros cinéticos de las glucosidasas también se distinguieron tanto por lo que respecta a la velocidad máxima (V_{max} esp_{AA}: 0,04-2,40 amol·cel⁻¹·h⁻¹ vs. V_{max} esp_{BA}: 0,3-11,8 amol·cel⁻¹·h⁻¹ para β G y V_{max} esp_{AA}: 0,03-2,30 amol·cel⁻¹·h⁻¹ vs. V_{max} esp_{BA}: 0,1-11,5 amol·cel⁻¹·h⁻¹ para α G) como a la K_m (K_{mAA} : 0,03-3 μ M vs. K_{mBA} : 2-481 μ M para β G y K_{mAA} : 0,04-6 μ M vs. K_{mBA} : 12-486 μ M para α G) (prueba de Wilcoxon para muestras pareadas, $n=25$ y $p \leq 0,01$ en todos los casos). En el caso de la K_m del sistema de baja afinidad de las glucosidasas, algunos valores también excedieron la máxima concentración de sustrato añadida en el ensayo cinético (27 % del número total de muestras en β G y el 15 % en la actividad α G). En las escasas muestras en las que las ecuaciones de los modelos 2 y 3 fueron las que mejor modelizaron las curvas respuesta de velocidad de hidrólisis, las estimaciones de los parámetros cinéticos estuvieron dentro del rango de valores mencionado anteriormente.

3.2 Dinámicas temporales de las actividades enzimáticas extracelulares

El comportamiento de las V_{\max} esp de las tres actividades enzimáticas estudiadas fue similar en ambos sistemas enzimáticos (Figura 5, A y C). Se observó un incremento de los valores de V_{\max} esp entre febrero y abril en las tres anualidades, que fue más acusado en los años 2012 y 2013. Una vez alcanzado su valor máximo, se observó un descenso en el que se restituyeron los valores previos al pico de actividad máxima y que se mantuvieron hasta finales de año. En el caso de la K_m de los dos sistemas enzimáticos, el comportamiento no fue tan regular como en la V_{\max} esp. Sin embargo, se observaron picos simultáneos de la K_m de alta afinidad de las tres actividades enzimáticas entre marzo-mayo de 2011 y julio-septiembre de 2011 y 2012 (Figura 5, B). Asimismo, se detectaron picos de la K_m de baja afinidad entre febrero y abril de las tres anualidades (Figura 5, D).

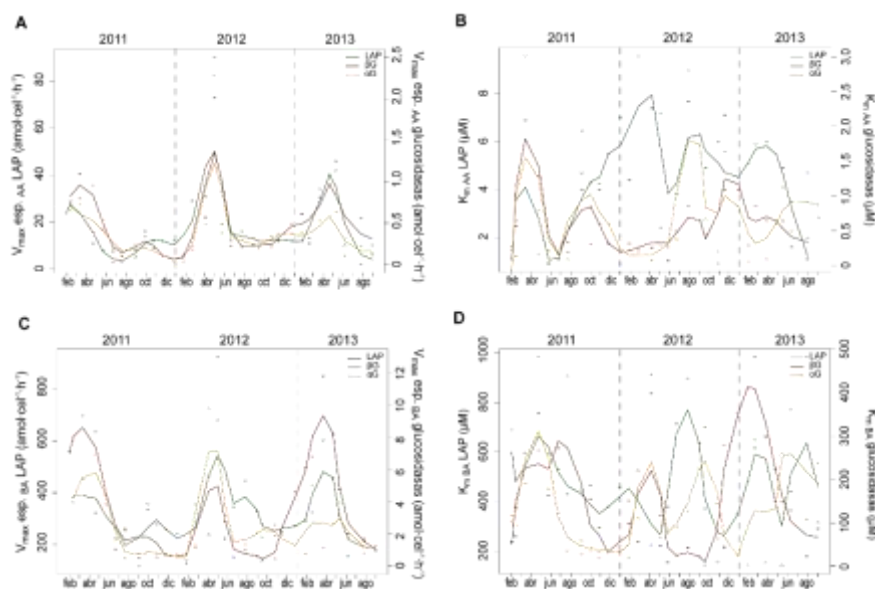


Figura 5: Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas: leucina aminopeptidasa (LAP, verde), β -glucosidasa (β G, granate) y α -glucosidasa (α G, amarillo). Se presentan con puntos los datos experimentales de la V_{\max} específica (A y C) y la K_m (B y D) junto con las curvas obtenidas utilizando la función *loess* para una ecuación polinómica de orden 1 y período 0,15.

Las correlaciones estudiadas mediante el análisis LSA entre los parámetros cinéticos de las tres actividades enzimáticas extracelulares se presentan en la Figura 6 (ver

también **Tabla S4**). De manera general, se encontró una correlación positiva entre las V_{max} esp y K_m de un mismo sistema enzimático. Las excepciones fueron el sistema de baja afinidad de LAP y el sistema de alta afinidad de α G, para los cuales no se obtuvo correlación significativa.

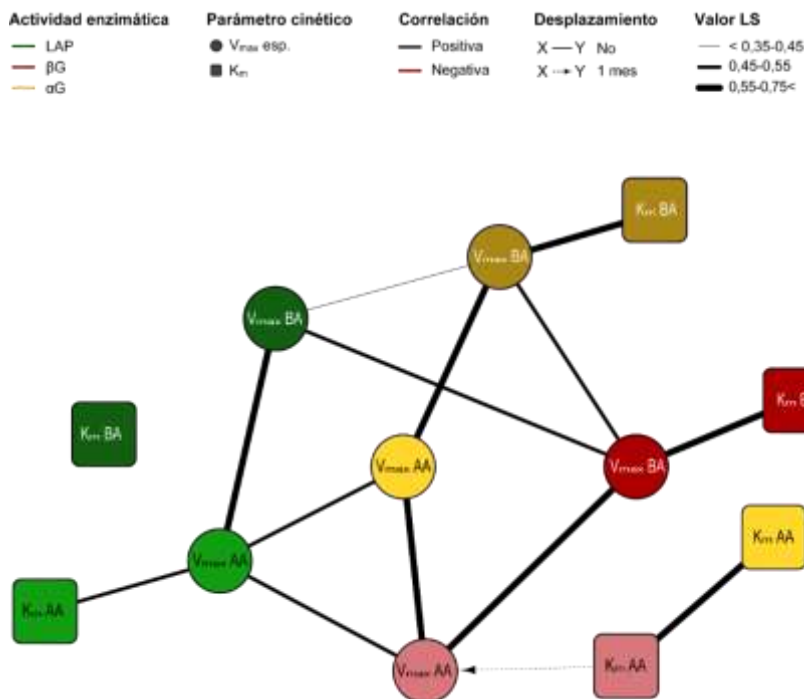


Figura 6: Mapa de relaciones entre los parámetros cinéticos de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas. Los nodos indican las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa (LAP, verde), β -glucosidasa (β G, granate) y α -glucosidasa (α G, amarillo). Los parámetros cinéticos se han distinguido en color claro para el sistema de alta afinidad (AA) y color oscuro para el sistema de baja afinidad (BA). Las líneas que unen los nodos indican si el tipo de correlación ha sido contemporánea (línea sólida) o desplazada en el tiempo 1 mes (flecha con línea discontinua). El color de las líneas diferencia si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo) y el grosor de la línea diferencia el rango de valores del coeficiente de correlación (ver leyenda).

Se observó una correlación positiva y contemporánea entre las V_{max} específicas de alta y baja afinidad para cada actividad enzimática. Por el contrario, no se detectaron correlaciones entre las K_m de alta y baja afinidad para ninguna de las actividades enzimáticas estudiadas. Asimismo, se observaron correlaciones positivas y contemporáneas entre las V_{max} específicas de las tres actividades enzimáticas y, en ambos sistemas enzimáticos, la correlación fue más estrecha entre las actividades β - y α -glucosidasa que entre LAP con ambas glucosidasas. Tampoco se detectó ninguna

correlación entre las K_m de las distintas actividades enzimáticas, a excepción de la correlación positiva entre las de las glucosidasas de alta afinidad.

3.3 Dinámicas temporales de los productores primarios del ecosistema

El análisis de la concentración de clorofila *a* y de la densidad celular de *Synechococcus* y *Prochlorococcus* puso de manifiesto la existencia de dos *blooms* de fitoplancton recurrentes y claramente separados en el tiempo. Al principio de la primavera, se observaron picos en la concentración de clorofila *a* que se prolongaron entre 1-2 meses y a finales de verano se observaron picos de la densidad de las cianobacterias que se prolongaron hasta principios del otoño (Figura 7 y Tabla S5).

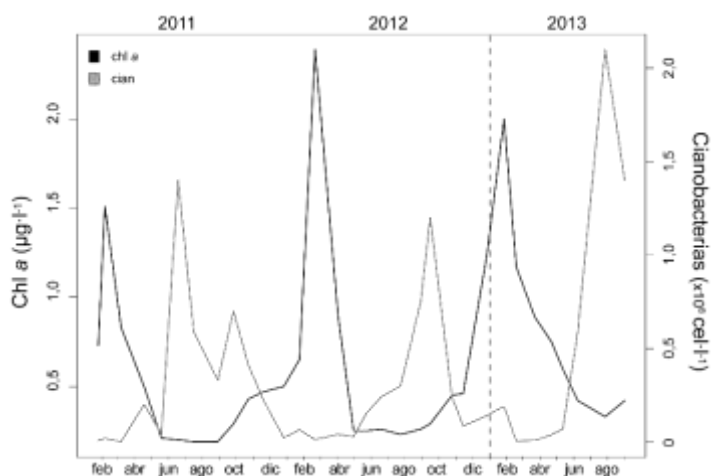


Figura 7: Variabilidad de la concentración de clorofila *a* (chl *a*, negro) y de la densidad celular de cianobacterias (cian, gris) a lo largo del período de estudio.

Los resultados obtenidos de las correlaciones entre los parámetros cinéticos y la concentración de clorofila *a* (como aproximación de la abundancia de fitoplancton eucariota) y la densidad de las cianobacterias se presentan en la **Figura 8** (ver también **Tabla S6**). Tanto en el caso de la leucina aminopeptidasa como de las actividades glucosidasa, se observó una correlación positiva entre la concentración de clorofila *a* y la V_{max} específica para los dos sistemas enzimáticos (**Figura 9**). Además, en todos los casos, el mejor resultado se obtuvo con un mes de desplazamiento, lo que indica que la variación de la V_{max} específica de las tres actividades enzimáticas se produce un mes después de la variación en la concentración de clorofila *a*. En lo que respecta a las K_m , los resultados obtenidos mostraron una relación positiva entre la concentración de clorofila *a* y LAP de alta afinidad y β G de baja afinidad, respectivamente. En el caso de

la actividad α G, se detectó una correlación negativa con la K_m de ambos sistemas enzimáticos.

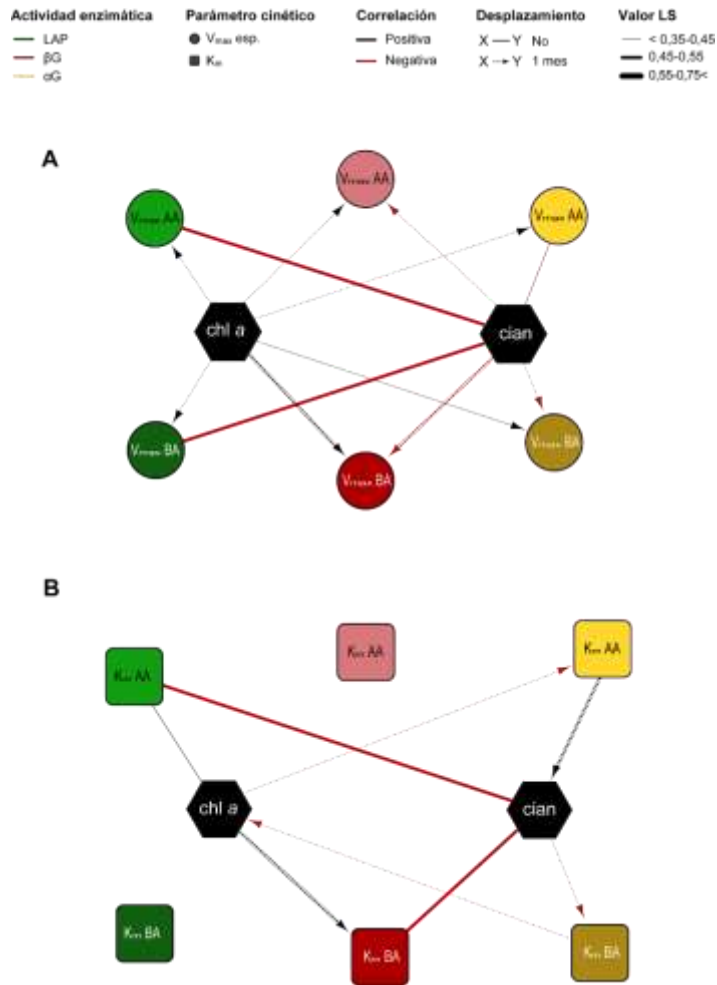


Figura 8: Mapa de relaciones entre los parámetros cinéticos V_{max} específica (A) y K_m (B) de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas y las siguientes variables del ecosistema: concentración de clorofila a ($chl a$, $\mu g \cdot l^{-1}$) y densidad celular de cianobacterias ($cian$, $cel \cdot l^{-1}$). Los nodos indican las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa (LAP, verde), β -glucosidasa (β G, granate), α -glucosidasa (α G, amarillo) y las variables del ecosistema (negro). Los parámetros cinéticos se han distinguido en color claro para el sistema de alta afinidad (AA) y color oscuro para el sistema de baja afinidad (BA). Las líneas que unen los nodos indican si el tipo de correlación ha sido contemporánea (línea sólida) o desplazada en el tiempo 1 mes (flecha con línea discontinua). El color de las líneas diferencia si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo) y el grosor de la línea diferencia el rango de valores del coeficiente de correlación (ver leyenda).

Por el contrario, todas las correlaciones entre la densidad de cianobacterias y las V_{\max} específicas de alta y baja afinidad de las tres actividades enzimáticas fueron negativas (Figura 8 y Tabla S6), contemporáneas para los dos sistemas de LAP y el sistema de alta afinidad de αG y con un mes de retraso en el resto de los casos ($D=-1$), lo que indica que los cambios en la abundancia de cianobacterias ocurren simultáneamente o con anterioridad a la variación en las V_{\max} esp. En lo que respecta a las K_m , solamente se detectó correlación positiva entre las enzimas de alta afinidad de αG con la densidad celular de las cianobacterias, mientras que fue negativa en el resto de los casos.

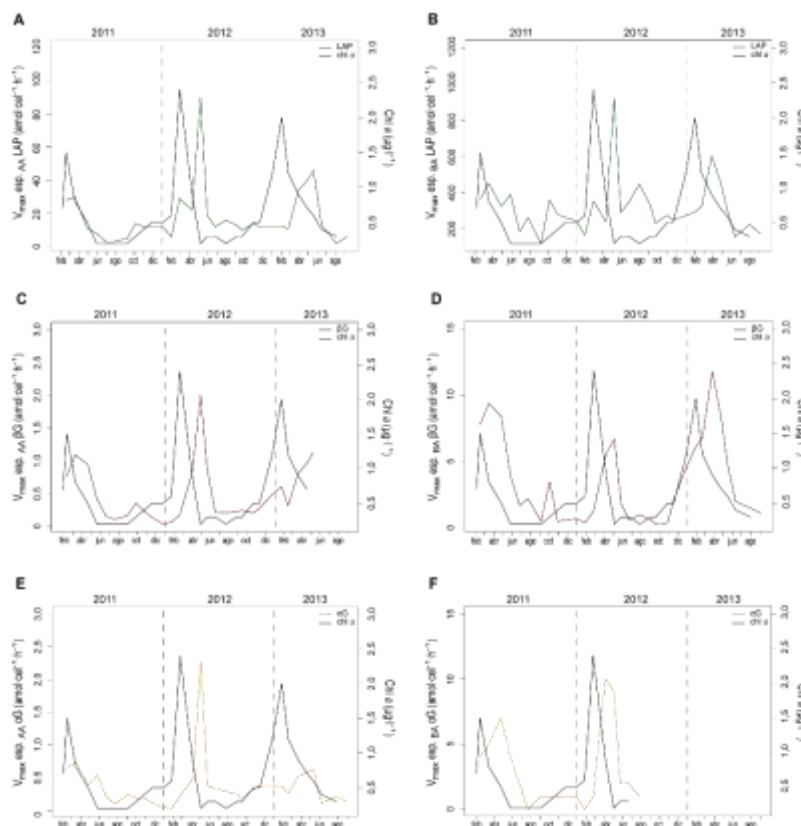


Figura 9: Representación de las V_{\max} específicas de leucina aminopeptidasa (LAP, A y B), β -glucosidasa (βG , C y D) y α -glucosidasa (αG , E y F) y la concentración de clorofila *a* durante el período de estudio. Se han representado únicamente aquellas muestras que mostraron correlación para las dos variables analizadas. A la izquierda se pueden ver los resultados del sistema de alta afinidad y a la derecha los del sistema de baja afinidad.

3.4 Dinámicas temporales de la composición de la comunidad bacteriana del ecosistema

El análisis de los principales grupos filogenéticos detectados mediante CARD-FISH en la estación de Armintza reveló la alternancia en la dominancia de los grupos *Bacteroidetes*, más abundante entre abril y finales del verano, y SAR11, más abundantes entre octubre y principios de la primavera (Figura 10A y Tabla S5). El grupo de las *Gammaproteobacteria* mostró una tendencia menos marcada, pero por lo general con mayores abundancias en los meses estivales (Figura 10B y Tabla S5); por último, el grupo *Roseobacter*, menos abundante a lo largo del estudio, mostró picos de abundancia entre los meses de febrero y abril.

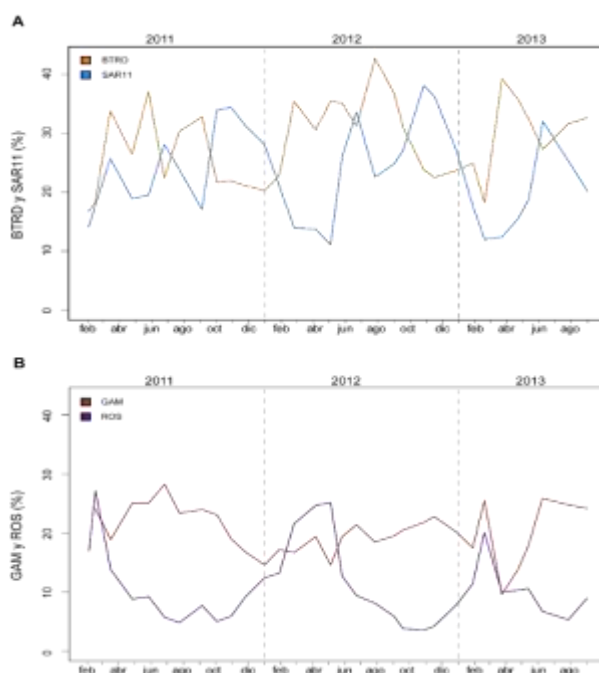


Figura 10: Variabilidad a lo largo del período de estudio de los principales grupos filogenéticos detectados en la estación de Armintza: (A) *Bacteroidetes* (BTRD, naranja) y SAR11 (SAR11, azul) y (B) *Gammaproteobacteria* (GAM, granate) y *Roseobacter* y miembros de SAR83 (ROS, morado).

Las correlaciones detectadas entre los parámetros cinéticos y los grupos filogenéticos más abundantes de la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo estacional se presentan en la Figura 11 (ver también Tabla S6). Cabe resaltar que en la gran mayoría de los casos las correlaciones obtenidas fueron sin desplazamiento. En lo que se refiere a los dos grupos dominantes, de manera general, se encontró una correlación positiva entre

el grupo *Bacteroidetes* y los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa y α -glucosidasa, así como con la V_{\max} esp de alta afinidad de β -glucosidasa; sin embargo, no se detectó ninguna correlación con los parámetros cinéticos de β G de baja afinidad. En contraposición, se observó el comportamiento opuesto con el grupo SAR11, ya que se encontraron correlaciones negativas entre la abundancia de este grupo filogenético y los parámetros cinéticos de las enzimas glucosidasa y las V_{\max} esp de LAP, tanto del sistema de alta afinidad como el de baja afinidad.

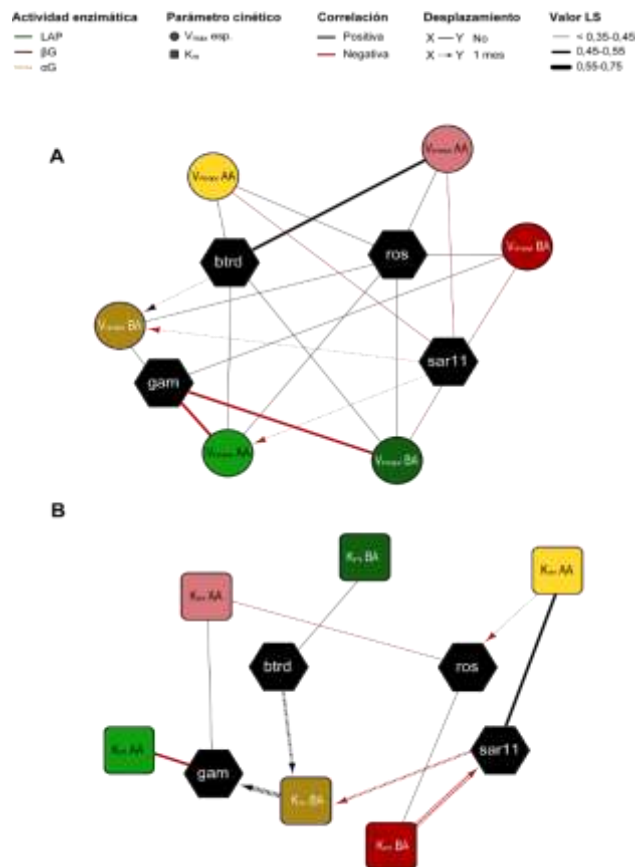


Figura 11: Mapa de relaciones entre los parámetros cinéticos V_{\max} específica (A) y K_m (B) de las tres actividades enzimáticas extracelulares estudiadas y la abundancia relativa de los grupos filogenéticos *Bacteroidetes* (btrd, %), SAR11 (sar11, %), *Roseobacter* y miembros de SAR83 (ros, %) y *Gammaproteobacteria* (gam, %). Los nodos indican las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa (LAP, verde), β -glucosidasa (β G, granate), α -glucosidasa (α G, amarillo) y los grupos filogenéticos (negro). Los parámetros cinéticos se han distinguido en color claro para el sistema de alta afinidad (AA) y color oscuro para el sistema de baja afinidad (BA). Las líneas que unen los nodos indican si el tipo de correlación ha sido contemporánea (línea sólida) o desplazada en el tiempo 1 mes (flecha con línea discontinua). El color de las líneas diferencia si la correlación es positiva (negro) o negativa (rojo) y el grosor de la línea diferencia el rango de valores del coeficiente de correlación (ver leyenda).

En lo que se refiere al grupo de las *Gammaproteobacteria*, por un lado, se detectaron correlaciones positivas con los parámetros cinéticos de las enzimas glucosidasa y, por el otro lado, se observaron correlaciones negativas con los parámetros cinéticos del sistema de alta afinidad de LAP y la V_{\max} esp de baja afinidad. En este caso, no se detectó **ninguna correlación con el sistema de alta afinidad de α -glucosidasa**. Por último, se encontraron correlaciones positivas entre el grupo *Roseobacter* y todas las V_{\max} esp de las tres actividades enzimáticas estudiadas, así como correlación negativa con las K_m de alta afinidad de las enzimas glucosidasa.

Material suplementario

Tabla S1. Revisión bibliográfica de estudios cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa, β -D-glucosidasa y α -D-glucosidasa realizados en la zona eufótica de sistemas marinos. Los valores de V_{max} y K_m se han resumido respetando el formato original (valor único, rango de valores o media \pm desviación estándar).

Sistema	Referencia ^a	Muestreo	Modelo	Análisis ^b	Sustrato ^c	Conc. (μ M) (n ^o)	V_{max} (nM·h ⁻¹)	K_m (μ M)
Mar del Norte	1	Jun 1981	Simple	r.n.l.	LL β N	0-1000 (6)	150	~100
Mar Báltico	2	Nov 1989 y May 1990	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	12,5-200 (5)	~1000	206 \pm 12
Mar del Caribe	3	Nov 1991	Simple	LB	MCA-LAP	0,1-25 (7)	608 493	0,59 47,6
Mar del Norte	4	Jul 1992	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	19,9-454 (5)	463 \pm 13	31 \pm 3
Océano Ártico	5	Sep 1989 y Sep 1991	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	5-250 (?)	1,1 11,3-51,2	3,3 28,6-83,3
Océano Atlántico	6	08/08/1994 y 05/07/1995	Simple	LB	LYA-ala ₂	0,03-2,5 (?)	0,3	0,095 \pm 0,03
					LYA-ala ₄	0,05-1,5 (?)	333	0,487 \pm 0,088
Mar Mediterráneo	7	Nov-Dic 1995	Varios	r.n.l.	MCA-LAP	0,001-500 (15-22)	1,71 \pm 0,24 4,38 \pm 0,171	2,34 \pm 0,14 26,7 \pm 8,80
Océano Atlántico	8	14-24 Jul 1993	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	0,1-10 (?)	40-200	0,7-4,7
Océano Pacífico	9	Ago 1996-Nov 1997	Simple	HW	MCA-LAP	2,5-40 (5)	23 -1017	11-43
Océano Atlántico	10	Jun 1996	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	1-1000 (6)	88	70
Océano Antártico	11	Nov-Dic 94	Simple	LB	MCA-LAP	1-100	34 \pm 12	1

Mar Mediterráneo	12	Apr y Sep 2000	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	0,05-5 (8)	1,79 ± 0,22	0,16-0,52
							1,44 ± 0,17	0,34-1,13
Mar Cantábrico	13	Ene-May 1997-1998	Simple	r.n.l.	MCA-LAP	5-500 (7)	1645	170 ± 10
Océano Atlántico	14	Abr 2004-May 2005	Simple	LB	MCA-LAP	1-200 (4)	443	66
							168	35
							202-288	22-28
Océano Atlántico subtropical	15	Nov-Dic 2006	Simple	LB y HW	MCA-LAP	0,6-1200 (12)	9	400
							11	500
Mar Adriático	16	Dic 2002-May 2004 y Feb 2008	Simple	LB	MCA-LAP	0,1-20 (?)	0,005-0,05	0,41-9,51
Océano Atlántico subtropical	17	Dic 2007-Ene 2008	Simple	LB y HW	MCA-LAP	0,98-2000 (12)	7	150
Mar Mediterráneo	18	Feb-Nov 2007	Simple	LB	MCA-LAP	12,5-200 (5)	122±47	13±4
							270±77	11±2
							115±31	16±6
Mar Cantábrico	Este estudio	Feb 2011-Sep 2013	Varios	r.n.l.	MCA-LAP	0-400 (12)	3-34	1-11
							175-452	143-983
Mar del Norte	19	n.d.	Simple	HW	MUF-βG	0,04-0,3 (5)	n.d.	0,01
Mar Báltico	2	Nov 1989 y May 1990	Simple	r.n.l.	MUF-βG	12,5-200 (5)	5,1±4,8	20±2
Mar del Norte	4	Jul 1992	Simple	r.n.l.	MUF-βG	19,9-454 (5)	41±3	21±1,3

Océano Ártico	5	Sep 1989 y Sep 1991	Simple	r.n.l.	MUF-βG	5-250 (?)	n.d.	n.d.
							4-9	14-40
Mar Adriático	20	Microcosmos	Simple	r.n.l.	MUF-βG	0,25-500 (8)	n.d.	0,04±1,98
Mar Mediterráneo	7	Nov-Dic 1995	Varios	r.n.l.	MUF-βG	0,001-500 (15-22)	0,09±0,03	1,27±0,79
							0,62±0,02	79±11
Océano Atlántico	10	Jun 1996	Simple	r.n.l.	MUF-βG	1-1000 (6)	n.d.	n.d.
Océano Antártico	11	Nov-Dic 94	Simple	LB	MUF-βG	1-100	0,28 ± 0,08	0,13
Mar del Norte	21	Abr-Jun 1999	Simple	r.n.l.	R-βG	0,1-200 (11)	0,06-19	12-98
Mar Cantábrico	13	Ene-May 1997-1998	Simple	r.n.l.	MUF-βG	0,1-350 (8)	12	1,4 ± 1,2
Océano Atlántico	14	Abr 2004-May 2005	Simple	LB	MUF-βG	1-200 (4)	9	12
							5	21
							8,6-9,2	17-21
Mar Adriático	16	Dic 2002-May 2004 y Feb 2008	Simple	LB	MUF-βG	0,1-10 (?)	0,0006-0,009	0,29-1,16
Mar Cantábrico	Este estudio	Feb 2011-Sep 2013	Varios	r.n.l.	MUF-βG	0-300 (12)	0,04-1,06	0,03-3,01
							0,4-8,4	1,8-481
Mar del Norte	19	n.d.	Simple	HW	MUF-αG	0,04-0,3 (5)	n.d.	0,01
Mar Adriático	20	Microcosmos	Simple	r.n.l.	MUF-αG	0,25-500 (8)	n.d.	0,06±1,01
Mar Mediterráneo	7	Nov-Dic 1995	Varios	r.n.l.	MUF-αG	0,001-500 (15-22)	0,06±0,01	1,18±0,52
							0,51±0,02	129±8

Océano Atlántico	10	Jun 1996	Simple	r.n.l.	MUF- α G	1-1000 (6)	n.d.	n.d.
Mar Cantábrico	13	Ene-May 1997-1998	Simple	r.n.l.	MUF- α G	0,1-350 (8)	12	0,9 \pm 0,5
Océano Atlántico	14	Abr 2004-May 2005	Simple	LB	MUF- α G	1-200 (4)	8	26
							6	61
							6,6-7,2	32-41
Mar Cantábrico	Este estudio	Feb 2011-Sep 2013	Varios	r.n.l.	MUF- α G	0-300 (12)	0,04-0,66	0,04-6
							0,2 - 8,0	12-486

Notas. Conc (n°): rango de concentración de sustrato utilizada en el estudio (número total de concentraciones de sustrato); n.d.: no hay datos.

^a 1. Somville y Billen (1983); 2. Chróst y Velimirov (1991); 3. Rath *et al.* (1993); 4. Chróst y Riemann (1994); 5. Saliot *et al.* (1996); 6. Pantoja *et al.* (1997); 7. Unanue *et al.* (1999); 8. Ammerman y Glover (2000); 9. Patel *et al.* (2000); 10. Davey *et al.* (2001); 11. Misic *et al.* (2002); 12. Tamburini *et al.* (2002); 13. Azúa *et al.* (2003); 14. Williams y Jochem (2006); 15. Baltar *et al.* (2009); 16. Caruso (2010); 17. Baltar *et al.* (2010); 18. Misic *et al.* (2011); 19. Somville (1984); 20. Agis *et al.* (1998); 21. Arrieta y Herndl (2002).

^b Abreviaturas análisis: r.n.l.: regresión no lineal; LB: Lineweaver-Burk; HW: Hanes-Woolf.

^c Abreviaturas sustratos: LL β N: L-Leucil- β -naftilamida; MCA-LAP: L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina; LYA-ala₂ y LYA-ala₄: Amarillo de lucifer-ala₂ y amarillo de lucifer-ala₄; MUF- β G: 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido; R- β G: Resorufina- β -D-glucopiranosido; MUF- α G: 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido.

Tabla S2. Resumen de los valores de la bondad del ajuste de cada uno de los modelos calculado mediante el criterio de información de Akaike corregido (AICc). Se ha resaltado con fondo gris el modelo considerado válido para un posterior análisis.

Muestra	Leucina aminopeptidasa				β -glucosidasa				α -glucosidasa			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
Feb11	310	n.c.	301	259	64	11	-4	-30	73	54	56	35
Mar11	343	268	n.c.	262	8	-25	-13	-49	68	7	48	-70
Abr11	410	333	402	251	114	28	101	-17	95	21	76	-26
May11	327	264	n.c.	165	115	53	97	16	-8	n.c.	-26	-39
Jun11	n.c.	287	363	240	78	14	57	-55	47	13	5	-76
Ago11	264	n.c.	267	239	-59	-112	-68	-171	-67	-120	-86	-140
Sep11	265	n.c.	256	205	-8	-78	-29	-114	0	-45	-11	-50
Oct11	313	n.c.	314	268	-8	-28	-8	-20	-50	-106	-70	-121
Nov11	319	n.c.	323	281	-28	-104	-28	-99	-105	n.c.	-160	-152
Ene12	261	n.c.	254	217	-33	-147	-38	-167	-57	-111	-70	-121
Feb12	310	n.c.	311	266	-52	-128	-61	-183	-113	-167	-151	-195
Mar12	366	282	354	270	40	-36	36	-53	-31	-44	-58	-61
Abr12	402	272	405	282	88	34	66	-37	51	13	21	-83
May12	371	n.c.	370	302	49	-36	31	-146	44	-3	15	-53
Jun12	440	380	n.c.	356	115	13	81	-70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Jul12	311	n.c.	307	245	22	-96	13	-134	20	-29	-7	-65
Ago12	293	n.c.	286	268	23	-104	18	-143	-32	-67	-42	-70
Oct12	329	n.c.	330	283	-14	-151	-57	-164	-23	-41	-31	-55
Nov12	351	n.c.	353	296	-29	-113	-75	-166	-8	-39	n.c.	-95
Dic12	339	n.c.	343	305	-63	-80	-90	-97	-33	-76	-38	-96
Feb13	302	n.c.	300	251	32	16	-21	-48	10	-73	-34	-109
Mar13	286	n.c.	276	256	11	-46	-13	-107	13	-62	9	-94

Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas.

Abr13	354	n.c.	335	258	33	-20	-14	-126	-6	-91	-53	-146
Jun13	425	335	413	260	94	8	76	-80	-18	n.c.	-53	-50
Jul13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	56	-41	45	-169	-80	n.c.	-91	-84
Ago13	268	n.c.	263	157	70	2	48	-55	-34	-41	-47	-48
Sep13	303	n.c.	301	270	-62	-118	-87	-140	-101	n.c.	-128	-131

Notas. M: modelo; n.c.: no convergencia; n.d.: no hay datos.

Tabla S3. Valores de la constante de saturación de Michaelis (K_m , μM), velocidad máxima de la reacción enzimática (V_{\max} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$) y velocidad máxima específica ($V_{\max \text{ esp}}$, $\text{amol}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) de las actividades leucina aminopeptidasa, β -glucosidasa y α -glucosidasa obtenidos a lo largo del estudio interanual.

Muestra	Leucina aminopeptidasa						β -glucosidasa						α -glucosidasa					
	Alta afinidad			Baja afinidad			Alta afinidad			Baja afinidad			Alta afinidad			Baja afinidad		
	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$	K_m	V_{\max}	$V_{\max \text{ esp}}$
Feb11	1,5	6,3	24	692	283	1083	0,10	0,64	2,44	57	1,86	7,12	0,54	0,54	2,05	126	3,01	11,50
Mar11	2,7	14,3	28	260	183	363	0,57	0,39	0,77	135	3,94	7,81	0,25	0,33	0,65	103	2,15	4,27
Abr11	6,9	27,2	30	597	403	450	3,01	0,98	1,09	261	8,40	9,37	5,87	0,66	0,73	198	4,86	5,42
May11	1,3	10,1	11	757	299	321	1,29	0,88	0,95	267	7,78	8,36	1,53	0,36	0,39	486	6,48	6,95
Jun11	0,9	7,7	8	592	379	387	0,04	0,41	0,42	163	3,80	3,87	0,39	0,53	0,54	187	4,37	4,45
Ago11	1,4	3,0	3	432	239	260	0,33	0,10	0,11	437	2,04	2,22	0,16	0,09	0,10	45	0,46	0,50
Sep11	4,7	10,7	5	446	243	116	1,09	0,35	0,17	28	1,03	0,49	3,77	0,50	0,24	68	1,61	0,77
Oct11	4,3	11,0	14	411	274	356	n.d.	n.d.	n.d.	187	2,70	3,51	0,59	0,15	0,19	46	0,69	0,90
Nov11	4,0	10,1	12	295	243	278	n.d.	n.d.	n.d.	20	0,48	0,54	2,29	0,17	0,19	n.d.	n.d.	n.d.
Ene12	7,0	11,4	12	460	236	242	0,04	0,04	0,04	45	0,72	0,74	0,04	0,04	0,04	45	0,72	0,74
Feb12	4,4	9,2	6	403	255	161	0,32	0,11	0,07	99	0,56	0,35	0,40	0,05	0,03	31	0,20	0,13
Mar12	9,6	33,7	29	525	405	353	0,23	0,21	0,18	57	1,53	1,33	0,33	0,26	0,22	119	1,32	1,15
Abr12	7,4	17,7	22	224	195	237	0,26	0,68	0,82	398	4,61	5,59	0,12	0,40	0,48	447	8,08	9,81
May12	7,2	19,7	90	221	202	922	0,54	0,44	2,01	116	1,46	6,68	0,52	0,50	2,28	75	1,99	9,07
Jun12	1,6	22,9	19	379	348	288	0,07	1,06	0,88	9	2,20	1,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Jul12	3,8	14,5	12	715	432	345	0,50	0,28	0,22	24	0,72	0,57	0,73	0,41	0,33	100	2,01	1,60
Ago12	7,7	16,2	16	898	452	446	0,85	0,21	0,21	43	0,99	0,98	5,46	0,30	0,30	136	1,36	1,34
Oct12	4,9	12,1	10	373	276	229	0,45	0,30	0,25	2	0,40	0,33	1,28	0,23	0,19	327	3,20	2,66
Nov12	6,0	12,3	14	251	248	273	0,03	0,19	0,21	10	0,39	0,43	0,38	0,30	0,33	153	1,73	1,90
Dic12	4,0	8,5	12	215	175	247	2,16	0,20	0,28	279	1,47	2,06	3,19	0,26	0,37	57	1,34	1,88

Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas.

Feb13	5,1	10,1	12	482	247	291	0,30	0,51	0,61	407	5,17	6,11	0,09	0,32	0,38	12	0,65	0,77
Mar13	5,9	10,3	11	617	293	323	0,86	0,29	0,32	481	6,21	6,83	1,25	0,24	0,26	298	4,60	5,06
Abr13	6,0	19,2	34	660	340	603	0,64	0,46	0,81	301	6,68	11,84	0,16	0,30	0,53	18	0,64	1,13
Jun13	4,9	27,1	46	143	187	315	0,64	0,67	1,13	148	2,84	4,77	2,19	0,37	0,63	265	2,37	3,98
Jul13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	0,33	0,23	128	2,79	2,01	0,96	0,15	0,11	367	2,48	1,79
Ago13	1,1	2,7	2	983	263	221	0,40	0,66	0,56	23	1,80	1,52	2,59	0,25	0,21	118	0,96	0,81
Sep13	10,5	6,5	6	315	190	172	2,90	0,25	0,23	87	1,17	1,06	1,34	0,15	0,14	244	1,38	1,25

Notas. n.d.: no hay datos.

Tabla S4. Datos de las correlaciones estadísticamente significativas entre los parámetros cinéticos V_{\max} esp y K_m de alta afinidad (AA) y baja afinidad (BA) de las actividades enzimáticas extracelulares analizadas mediante el *Análisis de Similitud Local* (Ruan *et al.*, 2006). Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), PoN (signo de la correlación), LS (local similarity score), sX (comienzo del mejor alineamiento en la secuencia del factor X), sY (comienzo del mejor alineamiento en la secuencia del factor Y), Lon (longitud del alineamiento), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para P).

	X	Y	PoN	LS	sX	sY	Lon	D	P-val	Q-val
(1)	LAP K_{mAA}	LAP V_{\max} esp $_{AA}$	+	0,488	3	3	29	0	0,001	0,019
(1)	β G K_{mAA}	β G V_{\max} esp $_{AA}$	+	0,355	2	3	26	-1	0,005	0,029
(1)	β G V_{\max} esp $_{BA}$	β G K_{mBA}	+	0,565	2	2	31	0	0,001	0,012
(1)	α G V_{\max} esp $_{BA}$	α G K_{mBA}	+	0,571	1	1	31	0	0,001	0,011
(2)	LAP V_{\max} esp $_{AA}$	LAP V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,550	1	1	32	0	0,001	0,007
(2)	β G V_{\max} esp $_{AA}$	β G V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,567	1	1	32	0	0,001	0,007
(2)	α G V_{\max} esp $_{AA}$	α G V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,632	1	1	32	0	0,001	0,007
(3)	LAP V_{\max} esp $_{AA}$	β G V_{\max} esp $_{AA}$	+	0,504	1	1	29	0	0,001	0,007
(3)	LAP V_{\max} esp $_{AA}$	α G V_{\max} esp $_{AA}$	+	0,546	1	1	32	0	0,001	0,007
(3)	β G V_{\max} esp $_{AA}$	α G V_{\max} esp $_{AA}$	+	0,715	1	1	32	0	0,001	0,007
(3)	LAP V_{\max} esp $_{BA}$	β G V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,495	1	1	32	0	0,003	0,014
(3)	LAP V_{\max} esp $_{BA}$	α G V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,411	1	1	32	0	0,004	0,016
(3)	β G V_{\max} esp $_{BA}$	α G V_{\max} esp $_{BA}$	+	0,502	1	1	32	0	0,002	0,005
(3)	α G K_{mAA}	β G K_{mAA}	+	0,570	1	1	26	0	0,001	0,008

Notas. LAP: leucina aminopeptidasa; β G: β -glucosidasa; α G: α -glucosidasa.

(1) correlación entre los dos parámetros cinéticos (V_{\max} esp y K_m) de cada sistema enzimático

(2) correlación de un mismo parámetro cinético entre los dos sistemas enzimáticos

(3) correlación de un mismo parámetro cinético entre las tres actividades enzimáticas extracelulares

Tabla S5. Valores de las variables del ecosistema utilizadas en el *Análisis de Similitud Local* (Ruan *et al.*, 2006).

Muestra	chl <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	cian ($10^8 \text{ cel}\cdot\text{l}^{-1}$)	btrd (%)	sar11 (%)	ros (%)	gam (%)
Feb11	0,73	0,01	17	14	17	32
Mar11	1,51	0,02	18	18	27	24
Abr11	0,83	0,01	34	26	14	19
May11	0,50	0,20	26	19	9	25
Jun11	0,21	0,04	37	19	9	25
Jul11	0,20	1,39	22	28	6	28
Ago11	0,19	0,59	30	24	5	23
Sep11	0,19	0,33	33	17	8	24
Oct11	0,29	0,70	22	34	5	23
Nov11	0,43	0,41	22	34	6	19
Ene12	0,50	0,02	20	28	12	15
Feb12	0,65	0,06	23	21	13	17
Mar12	2,39	0,01	35	14	22	17
Abr12	0,90	0,04	31	14	25	19
May12	0,25	0,03	35	11	25	15
Jun12	0,25	0,15	35	26	13	19
Jul12	0,26	0,24	31	34	9	21
Ago12	0,23	0,30	43	23	8	18
Oct12	0,29	1,21	31	27	4	21
Nov12	0,45	0,24	24	38	4	22
Dic12	0,46	0,08	22	36	4	23
Feb13	2,00	0,19	25	18	11	18
Mar13	1,17	0,01	18	12	20	26
Abr13	0,89	0,01	39	12	10	10
Jun13	0,60	0,07	32	19	11	18
Jul13	0,42	0,59	27	32	7	26
Ago13	0,33	2,09	32	25	5	25
Sep13	0,42	1,35	33	20	9	24

Notas. chl*a*: concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$); cian: densidad celular de cianobacterias ($10^8 \text{ cel}\cdot\text{l}^{-1}$); btrd: *Bacteroidetes* (%); sar11: SAR11 (%); ros: *Roseobacter*y miembros de SAR83 (%); gam: *Gammaproteobacteria* (%).

Tabla S6. Datos de las correlaciones estadísticamente significativas obtenidas mediante el *Análisis de Similitud Local* (Ruan *et al.*, 2006) entre las variables del ecosistema y los parámetros cinéticos V_{\max} esp y K_m de alta afinidad (AA) y baja afinidad (BA) de las actividades enzimáticas extracelulares analizadas. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), PoN (signo de la correlación), LS (local similarity score), sX (comienzo del mejor alineamiento en la secuencia del factor X), sY (comienzo del mejor alineamiento en la secuencia del factor Y), Lon (longitud del alineamiento), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para P).

X	Y	PoN	LS	sX	sY	Lon	D	P-val	Q-val
chl a	$\alpha G V_{\max}$ esp _{BA}	+	0,345	1	2	18	-1	0,001	0,008
chl a	$\alpha G V_{\max}$ esp _{AA}	+	0,371	1	2	31	-1	0,005	0,021
chl a	$\beta G V_{\max}$ esp _{BA}	+	0,516	1	2	31	-1	0,002	0,012
chl a	$\beta G V_{\max}$ esp _{AA}	+	0,377	1	2	28	-1	0,006	0,024
chl a	LAP V_{\max} esp _{BA}	+	0,397	1	2	31	-1	0,005	0,021
chl a	LAP V_{\max} esp _{AA}	+	0,372	1	2	31	-1	0,008	0,029
cian	$\alpha G V_{\max}$ esp _{BA}	-	0,359	1	2	31	-1	0,014	0,041
cian	$\alpha G V_{\max}$ esp _{AA}	-	0,435	1	1	32	0	0,003	0,016
cian	$\beta G V_{\max}$ esp _{BA}	-	0,509	1	2	31	-1	0,002	0,014
cian	$\beta G V_{\max}$ esp _{AA}	-	0,372	1	2	31	-1	0,012	0,039
cian	LAP V_{\max} esp _{BA}	-	0,476	1	1	32	0	0,001	0,009
cian	LAP V_{\max} esp _{AA}	-	0,499	1	1	32	0	0,001	0,009
btrd	LAP V_{\max} esp _{AA}	+	0,408	3	3	27	0	0,005	0,047
btrd	LAP V_{\max} esp _{BA}	+	0,418	2	2	28	0	0,003	0,030
btrd	$\beta G V_{\max}$ esp _{AA}	+	0,396	1	1	29	0	0,003	0,026
btrd	$\alpha G V_{\max}$ esp _{AA}	+	0,421	1	1	28	0	0,002	0,023
btrd	$\alpha G V_{\max}$ esp _{BA}	+	0,416	3	2	28	-1	0,006	0,040
sar11	LAP V_{\max} esp _{AA}	-	0,438	2	1	31	-1	0,004	0,042
sar11	LAP V_{\max} esp _{BA}	-	0,434	1	1	32	0	0,002	0,050
sar11	$\beta G V_{\max}$ esp _{AA}	-	0,358	1	1	30	0	0,006	0,050
sar11	$\beta G V_{\max}$ esp _{BA}	-	0,432	1	1	32	0	0,001	0,020
sar11	$\alpha G V_{\max}$ esp _{AA}	-	0,388	1	1	31	0	0,007	0,050
sar11	$\alpha G V_{\max}$ esp _{BA}	-	0,362	2	1	31	-1	0,007	0,050
ros	LAP V_{\max} esp _{AA}	+	0,416	1	1	32	0	0,002	0,029
ros	LAP V_{\max} esp _{BA}	+	0,418	1	1	32	0	0,004	0,038
ros	$\beta G V_{\max}$ esp _{AA}	+	0,348	1	1	30	0	0,009	0,050
ros	$\beta G V_{\max}$ esp _{BA}	+	0,395	1	1	32	0	0,006	0,050

ros	$\alpha G V_{\max} \text{ esp}_{AA}$	+	0,369	1	1	32	0	0,007	0,050
ros	$\alpha G V_{\max} \text{ esp}_{BA}$	+	0,372	1	1	32	0	0,016	0,049
gam	LAP v_{\max_aa}	-	0,466	3	3	30	0	0,002	0,029
gam	LAP $V_{\max} \text{ esp}_{BA}$	-	0,489	4	4	27	0	0,001	0,030
gam	$\beta G V_{\max} \text{ esp}_{BA}$	+	0,323	1	1	26	0	0,010	0,042
gam	$\alpha G V_{\max} \text{ esp}_{BA}$	+	0,422	1	1	27	0	0,002	0,021
chla	$\beta G K_{mBA}$	+	0,478	7	8	25	-1	0,001	0,037
chla	$\alpha G K_{mBA}$	-	0,366	3	2	30	1	0,008	0,013
chla	$\alpha G K_{mAA}$	-	0,381	6	7	26	-1	0,006	0,012
chla	LAP K_{mAA}	+	0,390	3	3	29	0	0,008	0,038
cian	$\alpha G K_{mAA}$	+	0,476	2	1	31	1	0,001	0,038
cian	LAP K_{mAA}	-	0,493	2	2	29	0	0,001	0,014
cian	$\beta G K_{mBA}$	-	0,486	8	8	24	0	0,002	0,042
cian	$\alpha G K_{mBA}$	-	0,352	2	3	17	-1	0,013	0,037
btrd	LAP K_{mBA}	+	0,416	3	3	23	0	0,004	0,050
btrd	$\alpha G K_{mBA}$	+	0,465	4	3	29	-1	0,001	0,049
sar11	$\beta G K_{mBA}$	-	0,553	3	4	29	1	0,001	0,049
sar11	$\alpha G K_{mAA}$	+	0,450	1	1	27	0	0,001	0,019
sar11	$\alpha G K_{mBA}$	-	0,458	5	4	28	-1	0,001	0,033
ros	$\beta G K_{mAA}$	-	0,309	8	8	25	0	0,048	0,021
ros	$\beta G K_{mBA}$	+	0,411	8	8	25	0	0,003	0,046
ros	$\alpha G K_{mAA}$	-	0,413	8	9	24	1	0,005	0,048
gam	LAP K_{mAA}	-	0,467	1	1	32	0	0,001	0,049
gam	$\beta G K_{mAA}$	+	0,401	7	7	20	0	0,004	0,023
gam	$\alpha G K_{mBA}$	+	0,607	2	3	28	1	0,001	0,017

Notas. LAP: leucina aminopeptidasa; βG : β -glucosidasa; αG : α -glucosidasa; chla: concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$); cian: densidad celular de cianobacterias ($10^8 \text{ cel}\cdot\text{l}^{-1}$); btrd: *Bacteroidetes* (%); sar11: SAR11 (%); ros: *Roseobacter* y miembros de SAR83 (%); gam: *Gammaproteobacteria* (%).

4

Desarrollo del objetivo 3:

Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano.

1. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

El aumento antropogénico de las emisiones de los gases de efecto invernadero (predominantemente CO₂) ha generado una serie de cambios a escala global, entre los que se incluye un aumento generalizado de la temperatura (Sarmiento *et al.*, 2010). En concreto, la temperatura del océano superficial ha aumentado alrededor de 1 °C desde 1900 y se prevé un incremento progresivo de entre 1 y 3 °C a lo largo del siglo XXI (Collins *et al.*, 2013), que presumiblemente provocará una cascada de cambios en el funcionamiento del océano global. En particular, se han encontrado evidencias de la expansión de los giros subtropicales oceánicos y, a consecuencia de ello, de las áreas oligotróficas del océano (Polovina *et al.*, 2008 y 2011). Asimismo, la acentuación progresiva de la termoclina ha reducido el flujo de nutrientes en las capas superficiales de la columna de agua y ha contribuido a la oligotrofización del océano (Sarmiento *et al.*, 2004).

Se han realizado multitud de estudios en diversos ecosistemas acuáticos a fin de caracterizar esta primera etapa del proceso de transformación de la materia orgánica (Sinsabaugh y Folstah Shah, 2012; Sinsabaugh *et al.*, 2014), y se han estudiado con relativo detalle las actividades enzimáticas extracelulares más comunes (Chróst, 1991). **En concreto, las actividades enzimáticas extracelulares β -glucosidasa (β G), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA) son de gran interés porque llevan a cabo la hidrólisis de una elevada proporción de los compuestos de alto peso molecular ricos en carbono, nitrógeno y fósforo respectivamente. No obstante, hay que tener en cuenta que las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente representan la actividad integrada de un conjunto heterogéneo de isoenzimas diverso en estructura molecular, regulación, vida media, sensibilidad a la temperatura, etc. (Christian y Karl, 1998; Arrieta y Herndl, 2002; Steen *et al.*, 2015).**

La temperatura es un importante factor regulador de la actividad microbiana debido a que afecta a la velocidad a la que ocurren la mayor parte de los procesos químicos y biológicos (Iriberry *et al.*, 1985), tal y como recoge la *Teoría Metabólica de la Ecología* (Brown *et al.*, 2004). El efecto de la temperatura se puede caracterizar mediante la energía de activación (E_a), parámetro que describe la sensibilidad intrínseca a la temperatura de una reacción bioquímica concreta y cuyo valor se deduce a partir de la pendiente de la ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889). También es posible expresar la sensibilidad a la temperatura mediante el coeficiente Q_{10} (Dixon y Webb, 1964), parámetro que refleja la tasa de variación de la velocidad a la que ocurre un proceso biológico como consecuencia de un incremento de 10 °C de la temperatura.

Son numerosos los trabajos que han analizado el efecto de la temperatura sobre distintos procesos microbianos en el medio marino (Apple *et al.*, 2006; López-Urrutia 2006; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007; Morán *et al.*, 2010; Chavez *et al.*, 2011; Regaudie-De-Gioux y Duarte, 2012; Lara *et al.*, 2013; Vaquer-Sunyer *et al.*, 2013; Huete-Stauffer *et al.*, 2015). Sin embargo, son muy escasos los trabajos que han determinado la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas extracelulares en el medio marino y la mayoría de ellos se han centrado en sistemas árticos (**Tabla S1**). Vetter y Deming (1994) estimaron valores de E_a que oscilaban entre -0,15 y 1,15 eV (equivalente a Q_{10} : 0,8-5,5) para la actividad peptidasa en aguas de la polinia del nordeste del Océano Ártico. Más recientemente, Piontek *et al.* (2014) determinaron altos valores de E_a para β -glucosidasa (rango E_a : 2,2-23,3 eV) y valores algo inferiores para la actividad leucina aminopeptidasa (rango E_a : 1,5-15,2 eV) en muestras del Océano Ártico. No obstante, estos resultados corresponden a enzimas secretadas por comunidades microbianas adaptadas a las frías aguas marinas árticas, por lo que cabe esperar una mayor respuesta frente a incrementos de la temperatura que en enzimas secretadas en aguas templadas o cálidas (German *et al.*, 2012).

Esta escasez de conocimientos contrasta con los sistemas terrestres, donde la respuesta de las actividades enzimáticas extracelulares a la temperatura ha sido caracterizada más detalladamente. En las numerosas publicaciones existentes, podemos encontrar valores de sensibilidad a la temperatura entre 0,27-0,72 eV de β -glucosidasa (Trasar-Cepeda *et al.*, 2007; Wallenstein *et al.*, 2009; German *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2012; Steinweg *et al.*, 2013; Koyama *et al.*, 2013; Bárta *et al.*, 2014), un rango de E_a entre -0,33 y 0,62 eV para leucina aminopeptidasa (Wallenstein *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2013; Bárta *et al.*, 2014) y, en la única referencia existente, valores de 0,39-0,48 eV para fosfatasa alcalina (Bárta *et al.*, 2014). La caracterización de la respuesta de las actividades enzimáticas extracelulares frente a la temperatura permite una mayor precisión a la hora de comparar y predecir cambios en otras actividades microbianas, como pueden ser las velocidades de respiración y de liberación de CO_2 (Davidson y Janssens, 2006). Por lo tanto, en el contexto de cambio climático actual, resulta evidente la necesidad de analizar cómo pueden verse alterados los ciclos biogeoquímicos en el océano como consecuencia de un incremento progresivo de la temperatura en aguas superficiales oceánicas.

Son múltiples las aproximaciones que se pueden utilizar para el cálculo de la energía de activación. Las principales son la manipulación experimental de la temperatura y el método de "sustitución de espacio por tiempo", y ambas presentan ventajas y

desventajas (Elmendorf *et al.*, 2015). El método de "sustitución de espacio por tiempo" (Picket 1989) asume que la variabilidad existente para un proceso (p.ej. actividad enzimática extracelular) frente a cambios en la temperatura a lo largo de un gradiente espacial, es comparable a las oscilaciones que ocurren a lo largo del tiempo. Este método ha sido ampliamente utilizado en modelización de la biodiversidad (Blois *et al.*, 2013), así como en el campo de la ecología microbiana marina para determinar la respuesta a la temperatura del metabolismo del plancton (Regaudie-De-Gioux y Duarte, 2012; García-Corral *et al.*, 2014) o de la producción heterotrófica procariota (Lønborg *et al.*, 2016). No obstante, los resultados de esta aproximación pueden estar condicionados por factores como la covariación con otras variables abióticas o adaptaciones a las condiciones ambientales locales (Dunne *et al.*, 2004). La manipulación experimental permite monitorizar los cambios que se producen en el proceso objeto de estudio en respuesta a la temperatura cuando el resto de los factores permanecen inalterados. Sin embargo, el uso de tiempos cortos de incubación podría no reflejar adecuadamente los cambios que desencadena un incremento de la temperatura prolongado en el tiempo. En este sentido, utilizar las dos aproximaciones dota de una mayor robustez a las predicciones derivadas del estudio.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el objetivo de este capítulo ha sido estudiar la sensibilidad a la temperatura de un conjunto de actividades enzimáticas extracelulares en aguas superficiales del océano global. Para ello, se determinaron los valores de energía de activación (E_a) de las actividades β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina de muestras recogidas a lo largo del transecto longitudinal de la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010* (Duarte, 2015), que abarcó las zonas subtropical y tropical de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. Para poder profundizar de manera consistente en el efecto de la temperatura sobre éste proceso biológico, se calcularon los valores de E_a de las actividades enzimáticas extracelulares mediante dos aproximaciones (Elmendorf *et al.*, 2015). Por un lado, se realizaron manipulaciones experimentales de la temperatura en muestras de superficie y máximo profundo de clorofila de 29 estaciones de muestreo distribuidas en zonas subtropical y tropical del océano. Por otro lado, se calculó mediante el método de "sustitución de espacio por tiempo" el valor medio de E_a para cada actividad enzimática, asumiendo que las velocidades de hidrólisis a temperatura *in situ* a lo largo de un transecto longitudinal reflejan la variabilidad existente en aguas superficiales del océano.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio y toma de muestras

Las muestras de agua de mar se recogieron entre las latitudes 32,1° N y 37,2° S en los océanos Pacífico (7 estaciones), Atlántico (16 estaciones) e Índico (6 estaciones) y se analizaron a bordo del BIO *Hespérides* durante la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*, que comenzó en diciembre de ese mismo año y finalizó en julio del 2011 (Duarte, 2015) (Figura 12 y Tabla S2). El muestreo se realizó entre las 07:00 y 10:00 h de la mañana y para todas las estaciones se recogió muestra a 3 m de profundidad (“superficie”) con botellas Niskin de 30 l. Adicionalmente, en 16 de las estaciones de muestreo, también se recogió agua en el máximo profundo de clorofila (*Deep chlorophyll maximum*, “DCM”), que se localizó entre los 23 m y 160 m, usando un sistema de roseta de 24 botellas Niskin de 12 l con un instrumento CTD SeabirdSBE9 integrado.

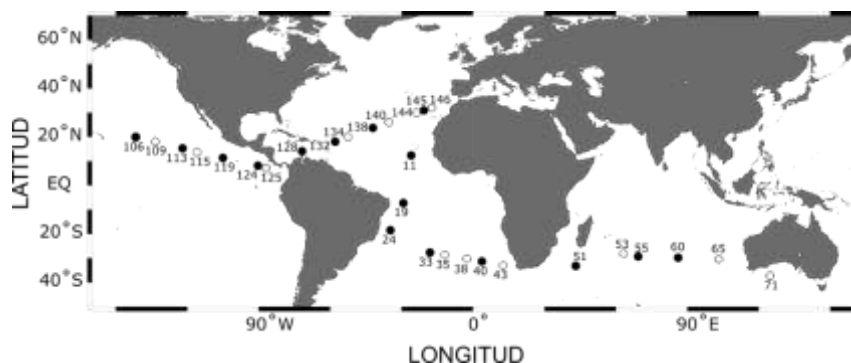


Figura 12: Localización de las 29 estaciones de muestreo. El agua de superficie (3 m) se recogió en todas las estaciones; el agua del máximo profundo de clorofila (DCM, 23-160 m) se recogió adicionalmente en 16 estaciones (círculos negros). La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

2.2 Medida de las actividades enzimáticas extracelulares

Se midieron tres actividades enzimáticas, β -glucosidasa (β G), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA), mediante el uso de sustratos fluorogénicos (Hoppe, 1983). Este conjunto de actividades es representativo de la hidrólisis de los sustratos orgánicos ricos en carbono, nitrógeno y fósforo presentes en el medio natural. Las

enzimas β -glucosidasa hidrolizan los enlaces β -glicosídicos de compuestos de tipo carbohidrato y su actividad se determinó con el análogo 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido. La actividad leucina aminopeptidasa libera aminoácidos del terminal amino de sustratos proteicos y su actividad se determinó con el análogo hidrocloreuro de L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina, que es un sustrato modelo de una gran variedad de péptidos y proteínas. La actividad fosfatasa alcalina hidroliza enlaces de éster de monofosfato y su actividad se determinó utilizando el análogo 4-metilumbeliferilfosfato, para el cual se han descrito velocidades de hidrólisis comparables a las obtenidas con sustratos naturales (Berman, 1988). Todos los sustratos fluorogénicos se obtuvieron en Biosynth (Suiza). Hay que tener presente que esta metodología está basada en la adición de sustratos modelo artificiales susceptibles **de ser hidrolizados por un conjunto de β -glucosidasas, peptidasas y fosfatasa**s (Chróst, 1991; Christian y Karl, 1998; Arrieta y Herndl, 2002; Steen *et al.*, 2015), por lo que los resultados que se presentarán más adelante no deben interpretarse como velocidades de hidrólisis y energías de activación de enzimas específicas, sino de todas las isoenzimas presentes en la muestra natural.

Soluciones previamente preparadas en metanol 40 % de los sustratos modelo (concentración x1000) y congeladas a -20°C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon las diluciones pertinentes con agua Mili-Q. Se añadieron 10 μl de estas diluciones a 240 μl de muestra de agua de mar distribuida en microplacas de 96 pocillos con el objetivo de conseguir concentraciones saturantes de 1 mM para hidrocloreuro de L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina y 350 μM para los otros dos sustratos fluorogénicos. Las medidas se realizaron por cuadruplicado en microplacas opacas de 96 pocillos.

En total, se rellenaron tres microplacas para cada muestra y posteriormente, una de las microplacas se incubó a temperatura *in situ* y las dos restantes a temperaturas que abarcaron un rango de entre 8 y 29°C . Las medidas de fluorescencia se realizaron inmediatamente después de la adición de los sustratos y en repetidas ocasiones a lo largo de las siguientes 48 h, aunque en la mayoría de los casos fueron suficientes tiempos de incubación menores a 18 h para obtener incrementos lineales de fluorescencia significativos. La fluorescencia se midió mediante un espectrofluorímetro equipado con un lector de microplacas (Synergy 2, Biotek) en las longitudes de onda 380 nm (excitación) y 440 nm (emisión). Las unidades de fluorescencia se transformaron en concentración de producto liberado mediante rectas patrón de 4-metilumbeliferona para βG y FA y 7-amino-4-metilcumarina para LAP en

un rango de 0-96 nM (concentración final). Como blancos para determinar la fluorescencia intrínseca de la muestra se utilizaron submuestras a las que no se añadió sustrato. Experimentos previos realizados con agua marina costera hervida demostraron que la hidrólisis abiótica de sustrato no era significativa. Los datos brutos fueron tratados mediante el software de análisis de datos *Gen5™* y las velocidades de hidrólisis se expresaron como nanomoles de producto (MUF o MCA) liberado por litro y por hora (V_{sat} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$).

2.3 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática extracelular

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática se determinó mediante dos aproximaciones, el método de "sustitución de espacio por tiempo" y la manipulación experimental de la temperatura (**Figura 13**).

En el método de "sustitución de espacio por tiempo", los valores de velocidad de hidrólisis de βG , LAP y FA medidos a temperatura *in situ* se agruparon en intervalos de 1 °C y se calculó el valor medio de cada intervalo; de esta forma, se estandarizó el peso de cada intervalo con independencia del número de muestras que lo formaban (**Figura 13**, rama A). La energía de activación (E_a , eV) de la hidrólisis enzimática se determinó como el valor absoluto de la pendiente negativa deducida a partir de la representación de Arrhenius del logaritmo natural de la velocidad de hidrólisis frente al recíproco de $K_B T$, donde K_B es la constante de Boltzmann ($8,62\cdot 10^{-5} \text{ eV}\cdot\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (K). Las regresiones lineales fueron consideradas válidas para un posterior análisis sólo cuando su nivel de significación fue $p \leq 0,05$.

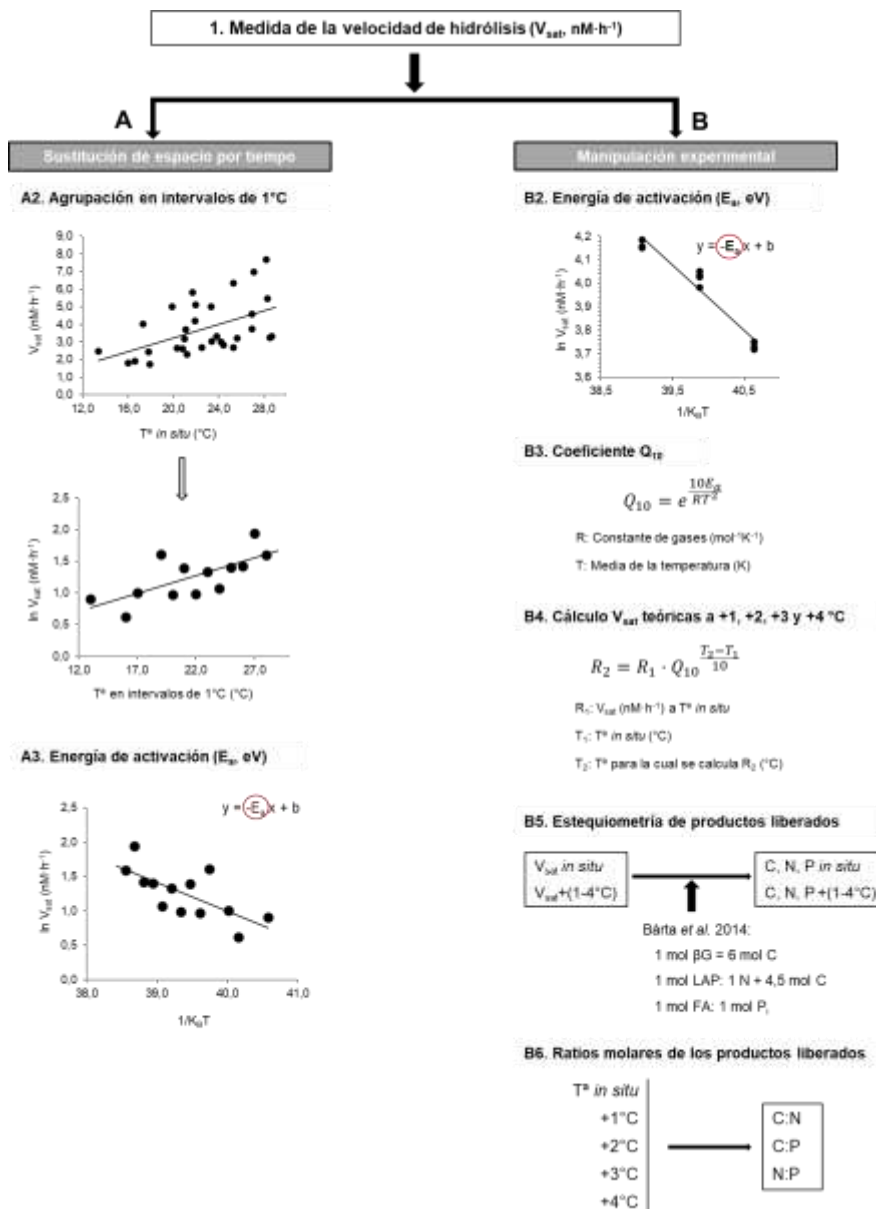


Figura 13: Esquema general de la determinación del efecto de la temperatura en las tres actividades enzimáticas extracelulares mediante las dos aproximaciones metodológicas utilizadas: el método de "sustitución de espacio por tiempo" (rama A) y la manipulación experimental de la temperatura (rama B).

En lo que se refiere a la manipulación experimental, los valores de velocidad de hidrólisis de las actividades enzimáticas obtenidos a partir de tres temperaturas de incubación se utilizaron para calcular distintos parámetros descriptivos (Figura 13, rama B). En primer lugar, para cada muestra y actividad se determinó el valor de la

energía de activación (E_a) tal y como se ha descrito anteriormente. A continuación, los valores obtenidos se utilizaron para calcular el coeficiente de temperatura Q_{10} , que refleja la tasa de variación de la velocidad a la que ocurre un proceso biológico como consecuencia de un incremento de 10 °C de la temperatura:

$$Q_{10} = e^{\frac{10E_a}{RT^2}}$$

donde E_a es la energía de activación (eV), R es la constante universal de los gases ideales ($8,314 \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T la temperatura media absoluta (K) del rango en el que se ha calculado el coeficiente (Raven y Geider, 1988; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2013).

Posteriormente, la velocidad de hidrólisis teórica (R_2) para cada actividad en posibles futuros escenarios de calentamiento global a +1 °C, +2 °C, +3 °C y +4 °C (T_2) se calculó a partir de los valores de Q_{10} y la velocidad de hidrólisis experimental (R_1) medida en la temperatura *in situ* de la muestra (T_1), siguiendo la ecuación:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

$$R_2 = R_1 \cdot Q_{10}^{\frac{T_2 - T_1}{10}}$$

2.4 Estequiometría de los productos liberados

La estequiometría de los productos liberados se estimó asumiendo que, por cada $\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$ de actividad, β -glucosidasa libera 6 moles de carbono (1 mol de glucosa) por hora y fosfatasa alcalina libera 1 mol de fósforo (fosfato inorgánico) por hora (Bárta *et al.*, 2014). La estimación de la estequiometría de los productos liberados por la actividad de leucina aminopeptidasa es más compleja, dado que las peptidasas son una familia de proteínas muy diversa y se ha descrito su capacidad de liberar no solo leucina sino también alanina (Bárta *et al.*, 2014), arginina, metionina, tirosina y otros aminoácidos (Steen *et al.*, 2015). Debido al desconocimiento de la composición química exacta de los productos de la hidrólisis, para la actividad LAP se asumió una composición estequiométrica media de 4,5 moles de carbono y 1 mol de nitrógeno por hora para la actividad LAP.

Por último, a partir de la composición estequiométrica de los productos liberados se dedujeron los ratios molares C:N, C:P y N:P para la temperatura *in situ* y para los posibles escenarios de calentamiento global planteados.

2.5 Tratamiento estadístico

Las diferencias entre los parámetros de la regresión lineal de βG y LAP deducidas a partir del método de "sustitución de espacio por tiempo" fueron analizadas con el test estadístico ANOVA. En la aproximación mediante manipulación experimental, las diferencias entre las tres actividades enzimáticas extracelulares fueron analizadas con el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas con una corrección *post hoc* de Bonferroni para tres comparaciones ($p \leq 0,017$). Las diferencias de los valores de E_a entre las muestras de superficie y las del DCM se analizaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas ($p \leq 0,05$). Las relaciones entre los valores de E_a de las tres actividades enzimáticas extracelulares fueron analizadas mediante la correlación de Spearman y la regresión lineal de tipo II ($p \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *IBM SPSS Statistics* (version 23) para Windows y el software *R* (version 3.1.1.) (R Core Team, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Método de "sustitución de espacio por tiempo"

Los datos de las velocidades de hidrólisis potencial (V_{sat}) obtenidos a temperatura *in situ* de las tres actividades enzimáticas (**Tabla S3**) fueron agrupados en intervalos de 1 °C y utilizados para calcular los valores de energía de activación (E_a) mediante el método de "sustitución de espacio por tiempo". El rango de temperatura *in situ* a lo largo de las estaciones de muestreo osciló entre los 14-29 °C.

En la **Figura 14** se puede observar la representación del logaritmo natural de V_{sat} de las tres actividades enzimáticas extracelulares frente al recíproco de $K_B T$, donde el valor absoluto de la pendiente corresponde a la energía de activación (E_a , eV). Se obtuvo una relación estadísticamente significativa para las actividades βG y LAP, pero no fue así en el caso de la actividad FA. La energía de activación (media \pm ES) de βG ($0,39 \pm 0,12$ eV) fue significativamente superior a la de LAP ($0,24 \pm 0,08$ eV) (ANOVA, $p \leq 0,05$).

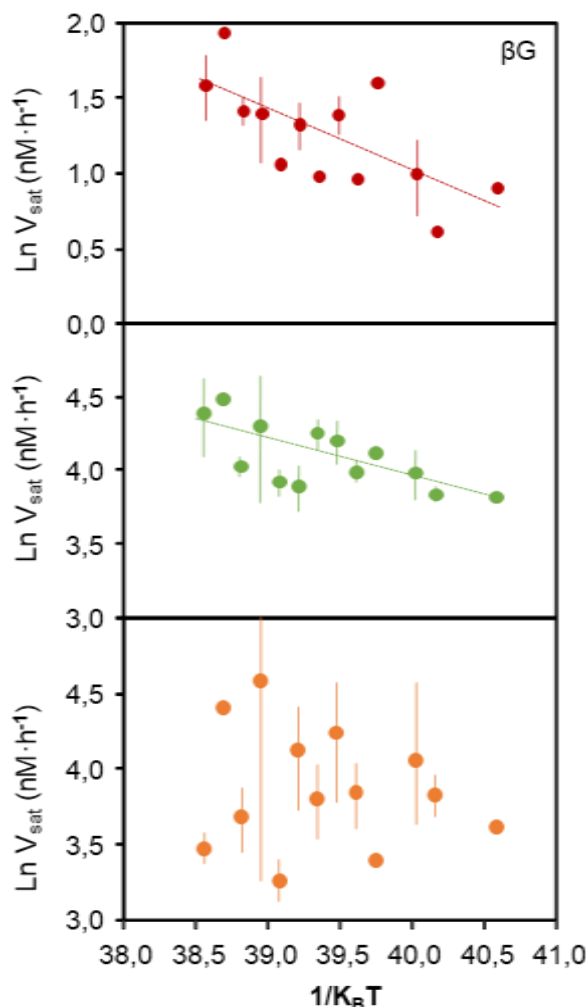


Figura 14: Estimaciones globales de las energías de activación de las tres actividades enzimáticas extracelulares. Representación de la ecuación de Arrhenius que muestra la relación entre las velocidades de hidrólisis potencial (V_{sat} , media \pm ES) agrupadas en 1 °C de las actividades enzimáticas β -glucosidasa (βG , granate), leucina aminopeptidasa (LAP, verde) y fosfatasa alcalina (FA, naranja) y el recíproco de $K_B T$, donde K_B es la constante de Boltzmann ($8,62 \cdot 10^{-5} \text{ eV} \cdot \text{K}^{-1}$) y T es la temperatura *in situ* del agua (método de "sustitución de espacio por tiempo").

3.2 Manipulación experimental de la temperatura

En la **Tabla S4** se resumen los valores de E_a de las tres actividades enzimáticas, mientras que en la **Figura 15** se han representado los valores medios globales para cada una de las actividades. En la figura se observa que el patrón de sensibilidad a la temperatura

de las actividades enzimáticas extracelulares conseguido con el método de "sustitución de espacio por tiempo" se corresponde con el que se consigue con los valores medios de E_a obtenidos de manera experimental. Los valores medios (\pm ES) globales de E_a establecieron un gradiente en el que β G fue la actividad que mostró un mayor grado de sensibilidad a la temperatura ($0,34 \pm 0,03$ eV), seguida de LAP ($0,21 \pm 0,01$ eV) y por último FA ($0,17 \pm 0,01$ eV) (test de Wilcoxon para muestras pareadas con corrección *post hoc* de Bonferroni, $p \leq 0,017$).

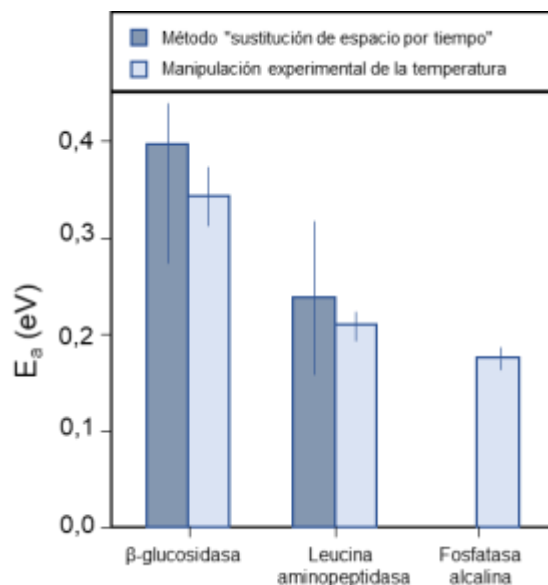


Figura 15: Comparación de los valores de energía de activación obtenidas mediante el método de "sustitución de espacio por tiempo" (pendiente \pm ES) y el valor medio de energía de activación (media \pm ES) obtenido mediante manipulación experimental de la temperatura para las tres actividades enzimáticas (Tabla S4).

Así mismo, β -glucosidasa fue la actividad que mostró una mayor variabilidad de valores de E_a , que oscilaron entre 0,168 eV (estación 60, Océano Índico) y 0,718 eV (estación 51, Océano Índico) en aguas superficiales, y entre 0,126 eV (estación 113, Océano Pacífico) y 0,603 eV (estación 55, Océano Índico) en el máximo profundo de clorofila (DCM, profundidad media de 104 ± 9 m). Cabe resaltar que los valores medios obtenidos en superficie fueron superiores a los de la capa DCM y que la diferencia fue estadísticamente significativa (test de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (Figura 16).

La sensibilidad a la temperatura de la actividad aminopeptidasa fue menor que la de la glucosidasa (test de Wilcoxon para muestras pareadas con corrección *post hoc* de Bonferroni, $p \leq 0,017$). En la capa de superficie, los valores oscilaron entre 0,081 eV

(estación 134, Océano Atlántico) y 0,499 eV (estación 55, Océano Índico), mientras que en DCM, fueron de entre 0,065 eV (estación 128, Océano Atlántico) y 0,359 eV (estación 55, Océano Índico). En este caso las diferencias entre ambas capas también fueron estadísticamente significativas (test de Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

Finalmente, la actividad fosfatasa alcalina fue la actividad que mostró una menor sensibilidad a la temperatura, así como una respuesta más homogénea a lo largo de todas las estaciones de estudio. Los valores de E_a oscilaron en un rango entre 0,051 eV (estación 109, Océano Pacífico) y 0,359 eV (estación 71, Océano Índico) en aguas superficiales y entre 0,119 eV (estaciones 119, Océano Índico y 11, Océano Atlántico) y 0,256 eV (estación 40, Océano Atlántico) en aguas del DCM (**Tabla S4**). El valor medio (\pm ES) de E_a en aguas superficiales fue mayor para β G ($0,39 \pm 0,04$ eV), seguido de LAP ($0,22 \pm 0,02$ eV), y el más bajo para FA ($0,17 \pm 0,02$ eV) (test de Wilcoxon para muestras pareadas con corrección de Bonferroni, $p \leq 0,017$), y se observó una tendencia similar para valores de E_a en DCM, aunque con valores ligeramente inferiores ($0,29 \pm 0,04$ eV para β G, $0,19 \pm 0,02$ eV para LAP y $0,16 \pm 0,02$ eV para FA) (**Figura 16**).

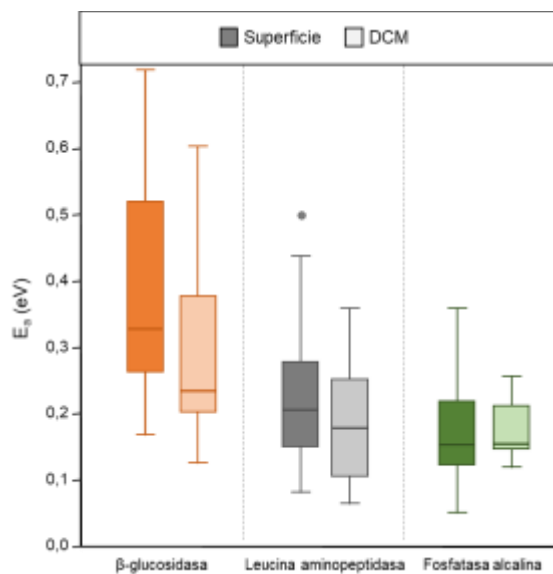


Figura 16: Energías de activación (E_a) de β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en superficie (color oscuro) y DCM (color claro). Sólo aquellas estaciones con datos emparejados fueron utilizadas para llevar a cabo esta comparación. Las actividades β -glucosidasa y leucina aminopeptidasa fueron las únicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos capas de agua (test de Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

El análisis previo de la relación entre la sensibilidad a la temperatura y la localización latitudinal en valores absolutos de las estaciones de muestreo puso de manifiesto que la tendencia de los datos no fue diferente en las muestras de superficie y DCM (datos no mostrados); por ello, se han representado juntos los datos de ambas capas en la **Figura 17**. Se observó una relación significativa y similar entre la localización latitudinal en valores absolutos de las estaciones y la sensibilidad a la temperatura para las tres actividades enzimáticas. Las relaciones matemáticas ponen de manifiesto una mayor respuesta al calentamiento en aguas de altas latitudes con respecto a la zona ecuatorial.

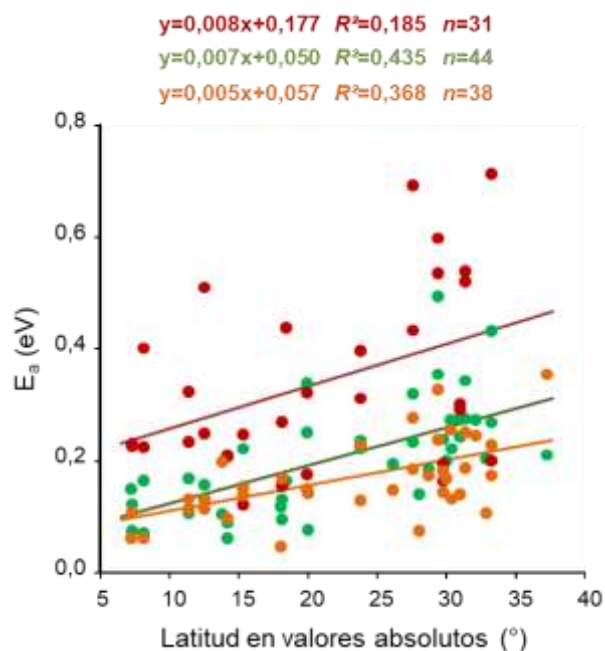


Figura 17: Relación entre la energía de activación (E_a) y la localización latitudinal en valores absolutos de las estaciones de muestreo. Se muestran las regresiones lineales significativas ($p \leq 0,05$) y sus ecuaciones para β -glucosidasa (rojo), leucina aminopeptidasa (verde), y fosfatasa alcalina (naranja).

Por otro lado, se observó una estrecha relación entre los valores de E_a de las tres actividades enzimáticas y, además, esta relación fue similar entre las capas de superficie y DCM (**Figura 18**). En todos los casos el coeficiente de correlación ρ de Spearman fue positivo, lo que indica que, de manera global, existe una respuesta conjunta de las tres actividades enzimáticas estudiadas frente a un aumento de la temperatura. Sin embargo, esta tendencia fue de distinta magnitud. La asociación entre las actividades

LAP y FA fue la más alta (68,5 %), seguida de la asociación de β G y LAP (58,5 %) y finalmente, entre β G y FA (47,7 %).

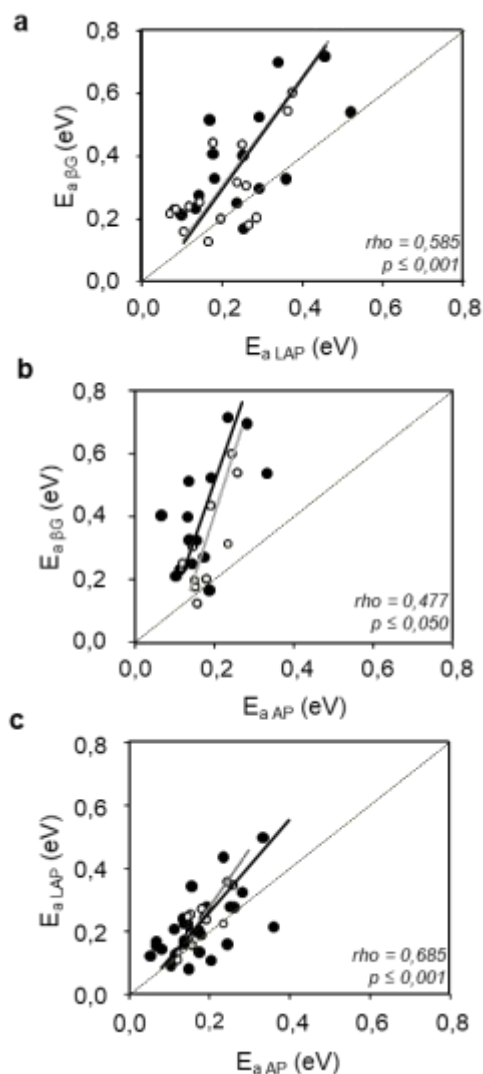


Figura 18: Correlaciones de Spearman (ρ) entre las energías de activación (E_a) de las tres actividades enzimáticas extracelulares. Solo se consideraron datos emparejados para este análisis. Los círculos y líneas negras representan los datos de aguas superficiales, mientras que los círculos blancos y líneas grises representan los datos de DCM. Los resultados del análisis de regresión lineal de tipo II de las E_a por parejas de enzimas fueron significativos en todos los casos ($p \leq 0,05$): (a) Superficie: $E_{a\beta G} = 1,84 \cdot E_{aLAP} - 0,06$; DCM: $E_{a\beta G} = 1,81 \cdot E_{aLAP} - 0,05$; (b) Superficie: $E_{a\beta G} = 3,66 \cdot E_{aFA} - 0,22$; DCM: $E_{a\beta G} = 4,01 \cdot E_{aFA} - 0,40$; (c) Superficie: $E_{aLAP} = 1,47 \cdot E_{aFA} - 0,03$; DCM: $E_{aLAP} = 1,81 \cdot E_{aFA} - 0,09$.

3.3 Proyecciones en un escenario de calentamiento global de aguas oceánicas

Se hizo una estima teórica del tipo y cantidad relativa de productos que serían liberados bajo incrementos concretos de temperatura. Para el cálculo de las velocidades de hidrólisis escenarios teóricos de calentamiento global dentro del rango de +1 °C a +4 °C, se aplicaron los valores de E_a obtenidos anteriormente (Tabla S4) a los valores de velocidad potencial de hidrólisis obtenidos experimentalmente a temperatura *in situ* (Tabla S3). Los resultados de estas proyecciones (Figura 19) predijeron una variación significativa en la composición molar de los productos de hidrólisis, tanto en aguas de superficie como en DCM. En concreto, por cada grado incrementado, el valor medio de las relaciones molares C:N, C:P y N:P aumentó 0,2 %, 1,2 % y 0,6 % en aguas superficiales y 0,1 %, 0,8 % y 1,0 % en aguas del DCM respectivamente.

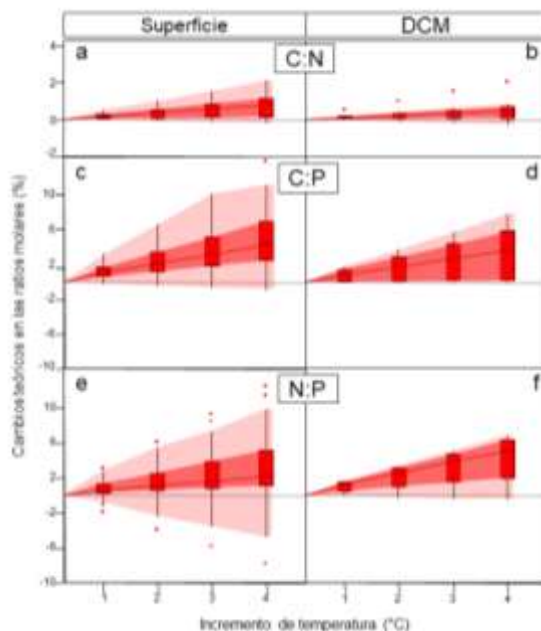


Figura 19: Diagramas de cajas de los resultados de las proyecciones en distintos escenarios de calentamiento global con respecto a la situación actual (nivel 0 en el eje Y). Se consideraron cuatro escenarios de calentamiento global (entre +1 y +4 °C, eje X) para calcular los cambios en las ratios molares C:N (a-b), C:P (c-d) y N:P (e-f) de los productos de hidrólisis liberados por las tres actividades enzimáticas extracelulares, en aguas superficiales (panel izquierdo) y en el DCM (panel derecho). Cabe resaltar la diferencia de escala para la ratio C:N.

Material suplementario

Tabla S1. Resumen de valores de energía de activación (E_a , eV) obtenidos en la revisión bibliográfica de trabajos que han realizado la determinación de la sensibilidad a la temperatura de las tres actividades enzimáticas estudiadas.

Actividad enzimática	Ecosistema	Localización	Referencia	E_a (eV)
β G	Suelo	Alaska	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,367
β G	Suelo	Alaska	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,361
β G	Suelo	Islandia	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,378
β G	Suelo	Islandia	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,541
β G	Suelo	Illinois	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,424
β G	Suelo	Illinois	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,512
β G	Suelo	Tennessee	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,321
β G	Suelo	Tennessee	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,424
β G	Suelo	Tennessee	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,534
β G	Suelo	Tennessee	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,609
β G	Suelo	Brasil	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,489
β G	Suelo	Brasil	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,587
β G	Suelo	Brasil	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,407
β G	Suelo	Brasil	Steinweg <i>et al.</i> , 2013	0,444
β G	Suelo	Galicia	Trasar-Cepeda <i>et al.</i> , 2007	0,272
β G	Suelo	Galicia	Trasar-Cepeda <i>et al.</i> , 2007	0,302
β G	Suelo	Galicia	Trasar-Cepeda <i>et al.</i> , 2007	0,314
β G	Tundra	Alaska	Wallenstein <i>et al.</i> , 2009	0,509
β G	Suelo	Alaska	German <i>et al.</i> , 2012	0,411

β G	Suelo	Maine	German <i>et al.</i> , 2012	0,473
β G	Suelo	Virginia	German <i>et al.</i> , 2012	0,441
β G	Suelo	California	German <i>et al.</i> , 2012	0,343
β G	Suelo	Costa Rica	German <i>et al.</i> , 2012	0,457
β G	Tundra	Alaska	Koyama <i>et al.</i> , 2013	0,363
β G	Tundra	Alaska	Koyama <i>et al.</i> , 2013	0,725
β G		Maine	Stone <i>et al.</i> , 2012	0,430
β G		Virginia	Stone <i>et al.</i> , 2012	0,430
β G	Suelo	Utah	Kaehkoenen <i>et al.</i> , 2001	0,583
β G	Suelo	Massachusetts	Davidson <i>et al.</i> , 2012	0,641
β G	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	0,474
β G	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	0,454
β G	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	1,313
β G	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	1,710
β G	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	2,052
β G	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	0,514
β G	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	1,453
Proteasa	Tundra	Alaska	Wallenstein <i>et al.</i> , 2009	0,348
LAP	Tundra	Alaska	Koyama <i>et al.</i> , 2013	0,466
LAP	Tundra	Alaska	Koyama <i>et al.</i> , 2013	0,622
LAP	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	-0,336
LAP	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	-0,473
Peptidasa	Agua	Groenlandia	Vetter y Deming 1994	0,226
Peptidasa	Agua	Groenlandia	Vetter y Deming 1994	0,782

Peptidasa	Sedimento	Groenlandia	Vetter y Deming 1994	0,226
Peptidasa	Sedimento	Groenlandia	Vetter y Deming 1994	0,643
Peptidasa	Agua	Groenlandia	Vetter y Deming 1994 y referencias incluidas	-0,150
Peptidasa	Agua	Groenlandia	Vetter y Deming 1994 y referencias incluidas	1,147
Peptidasa	Sedimento	Groenlandia	Vetter y Deming 1994 y referencias incluidas	-0,150
Peptidasa	Sedimento	Groenlandia	Vetter y Deming 1994 y referencias incluidas	0,739
LAP	Psicrófilo marino		Huston <i>et al.</i> , 2004	0,736
LAP	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	0,264
LAP	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	0,903
LAP	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	1,304
LAP	Marino	Estrecho de Fram	Piontek <i>et al.</i> , 2014	1,773
FA	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	0,393
FA	Bosque	Bohemia	Bárta <i>et al.</i> , 2014	0,484

Notas. β G: β -D-glucosidasa; LAP: leucina aminopeptidasa; FA: fosfatasa alcalina.

Tabla S2. Localización geográfica de las 29 estaciones de muestreo de las que se obtuvieron los datos utilizados este estudio.

Océano	Estación	Coordenadas	
Pacífico	106	19° 53,49 N	141° 35,40 O
	109	18° 01,67 N	133° 15,59 O
	113	15° 18,62 N	121° 59,72 O
	115	13° 48,23 N	115° 45,37 O
	119	11° 21,26 N	105° 00,64 O
	124	08° 08,51 N	90° 21,90 O
	125	07° 13,42 N	87° 57,59 O
	Atlántico	128	14° 09,48 N
132		18° 03,84 N	57° 48,20 O
134		19° 59,38 N	52° 38,19 O
138		23° 44,11 N	41° 54,11 O
140		26° 06,61 N	35° 15,45 O
144		29° 58,01 N	23° 41,14 O
145		30° 57,96 N	20° 38,99 O
146		32° 04,73 N	17° 15,96 O
11		12° 29,90 N	25° 59,17 O
19		07° 16,99 S	29° 19,34 O
24		18° 25,45 S	34° 38,66 O
Índico	33	27° 33,20 S	18° 05,36 O
	35	28° 38,94 S	11° 48,70 O
	38	30° 15,70 S	02° 26,12 O
	40	31° 18,45 S	03° 44,92 E
	43	32° 48,76 S	12° 46,15 E
	51	33° 11,66 S	43° 14,89 E
	53	27° 58,69 S	63° 14,86 E
	55	29° 21,21 S	69° 24,00 E
	60	29° 44,93 S	86° 15,39 E
	65	30° 19,65 S	103° 19,04 E
71	37° 14,36 S	124° 53,87 E	

Tabla S3. Velocidades de hidrólisis potencial (V_{sat} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$) de las actividades β -glucosidasa (βG), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA) medidas a temperatura *in situ*.

Estación	V_{sat} muestras de superficie ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)				V_{sat} muestras del DCM ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)				
	T^a ($^{\circ}\text{C}$)	βG	LAP	FA	T^a ($^{\circ}\text{C}$)	βG	LAP	FA	Prof. (m)
Océano Pacífico									
106	23,4	3,0	51,8	30,5	20,8	2,6	48,3	28,7	125
109	23,5		40,1	19,0					
113	24,2	3,0	51,0	41,1	13,4	2,5	46,2	37,4	137
115	24,0		64,0	23,9					
119	28,3	5,5	71,3	40,1	21,9	4,2	73,7	34,8	34
124	28,2	7,7	106,7	33,4	19,9	5,0	62,3		23
125	28,0		150,0	21,23					
Océano Atlántico									
128	28,7	3,3	40,7	29,7	25,3	2,7	45,4		105
132	28,5	3,3	38,5	37,4	24,4	2,8	34,4		160
134	26,0		47,8	25,9					
138	26,9	3,7	54,0	29,0	21,1	3,7	52,3	32,8	130
140	24,0		52,3	21,2					
144	21,0		38,8	12,7					
145	21,0	3,2	62,8	30,9	17,8	2,4	55,0	24,9	95
146	24,0		53,9	20,4					
11	26,9	4,6	62,9	63,5	21,9	5,1	103,8	182,7	65
19	27,1	7,0	90,0	82,9	21,7	5,8	101,2		121
24	27,2				23,8	3,3	26,9		121
33	25,6	3,2	44,0	26,1	17,9	1,7	31,6	19,6	120
35	23,7		54,1	53,1					
38	22,8		65,0	46,0					
40	21,2	2,3	41,3	37,1	16,6	1,9	44,6	39,5	70
43	20,8		60,9	48,9					
Océano Índico									
51	23,3	5,0	75,5	73,9	20,3	2,7	54,5	63,3	110
53	26,3		62,9	42,3					
55	25,3	6,3	134,7	243,9	17,3	4,0	77,4	173,9	130
60	22,5	2,7	62,0	64,0	16,0	1,8	49,4	52,8	150
65	22,7		86,5	25,7					
71	17,9		53,2	15,1					

Notas. DCM: máximo profundo de clorofila; T^a : temperatura *in situ*; Prof.: profundidad de recogida de muestra.

Tabla S4. Valores de la energía de activación (E_a , eV) de las actividades β -glucosidasa (β G), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA).

Estación	E_a muestras de superficie (eV)				E_a muestras del DCM (eV)				Prof. (m)
	T^a (°C)	β G	LAP	FA	T^a (°C)	β G	LAP	FA	
Océano Pacífico									
106	23,4	0,327	0,344	0,154	20,8	0,180	0,255	0,151	125
109	23,5		0,123	0,051					
113	24,2	0,251	0,226	0,143	13,4	0,126	0,157	0,155	137
115	24,0		0,109	0,203					
119	28,3	0,328	0,172	0,136	21,9	0,239	0,111	0,119	34
124	28,2	0,406	0,169	0,066	19,9	0,229	0,075		23
125	28,0		0,154	0,066					
Océano Atlántico									
128	28,7	0,213	0,093	0,102	25,3	0,215	0,065		105
132	28,5	0,274	0,135	0,173	24,4	0,160	0,099		160
134	26,0		0,081	0,146					
138	26,9	0,402	0,241	0,133	21,1	0,316	0,226	0,233	130
140	24,0		0,199	0,152					
144	21,0		0,204	0,172					
145	21,0	0,296	0,280	0,349	17,8	0,305	0,248	0,144	95
146	24,0		0,278	0,250					
11	26,9	0,515	0,161	0,135	21,9	0,254	0,137	0,119	65
19	27,1	0,234	0,127	0,113	21,7	0,231	0,080		121
24	27,2				23,8	0,442	0,169		121
33	25,6	0,698	0,325	0,281	17,9	0,438	0,239	0,190	120
35	23,7		0,189	0,178					
38	22,8		0,277	0,260					
40	21,2	0,525	0,280	0,191	16,6	0,543	0,348	0,256	70
43	20,8		0,208	0,111					
Océano Índico									
51	23,3	0,718	0,437	0,233	20,3	0,204	0,273	0,179	110
53	26,3		0,145	0,079					

Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas extracelulares.

55	25,3	0,540	0,499	0,332	17,3	0,603	0,359	0,242	130
60	22,5	0,168	0,243	0,186	16,0	0,200	0,188	0,149	150
65	22,7		0,226	0,136					
71	17,9		0,215	0,359					

Notas. DCM: máximo profundo de clorofila; T^a: temperatura *in situ*; Prof: profundidad de recogida de muestra.



5

Desarrollo de los objetivos 4 y 5:

La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo.

1. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

La materia orgánica del agua de mar es una mezcla compleja de compuestos orgánicos de diversa composición química, estructura física y reactividad (Nagata, 2008). Asimismo, conforma un gradiente continuo de tamaños, fruto de los procesos diagenéticos a los que ha sido sometida: las partículas de mayor tamaño son de más reciente producción y, por tanto, más lábiles, mientras que las partículas más pequeñas tienden a ser recalitrantes y antiguas (Amon y Benner, 1996).

En aguas oceánicas, la zona eufótica se caracteriza por tener una amplia disponibilidad de materia orgánica utilizable (Benner y Amon, 2015), siendo el principal mecanismo de producción la producción realizada por organismos autótrofos y subsiguiente liberación de productos extracelulares (Mykkestad, 2000; Thornton, 2014). La materia orgánica de producción reciente se caracteriza por ratios C:N y C:P menores que el agua circundante, por lo que la mayor parte es rápidamente consumida por las comunidades bacterianas locales (Hama *et al.*, 2004); sin embargo, una fracción de esa materia orgánica es exportada más allá de la zona eufótica y tiene un papel fundamental en el secuestro de carbono de la atmósfera (Benner y Ammon, 2015).

La zona batipelágica del océano (1000-4000 m de profundidad) es uno de los biomas más extensos del planeta (Aristegui *et al.*, 2009). Aunque las arqueas y las bacterias quimioautótrofas son importantes productores primarios (Herndl y Reinthaler, 2013), la principal fuente de carbono y energía del océano profundo es la exportación de la producción primaria desde la zona eufótica, por lo que ambas zonas de la columna de agua están fuertemente conectadas mediante la sedimentación de la materia orgánica particulada (Smith *et al.*, 2018; Preston *et al.*, 2020).

Durante el descenso por la columna de agua, la materia orgánica de los agregados es transformada debido, principalmente, a la actividad enzimática bacteriana (Karl *et al.*, 1988; Baltar *et al.* 2013; Zhao *et al.*, 2020). En consecuencia, la materia orgánica disuelta de aguas profundas se caracteriza por ser refractaria (Jiao *et al.*, 2010) y por estar formada por un conglomerado de moléculas presentes en concentraciones inferiores a la inversión energética necesaria para su captación y degradación (Arrieta *et al.*, 2015; Zark *et al.*, 2017; Zark y Dittmar, 2018). Además, los microorganismos que habitan estas aguas también tienen que lidiar con una presión hidrostática alta (Tamburini *et al.*, 2013) y temperaturas permanentemente bajas, lo que conlleva que las aguas sean más densas y la difusión de energía y nutrientes se ralentice, afectando finalmente a la

velocidad a la que tienen lugar los procesos metabólicos (Nagata *et al.*, 2010; Poli *et al.*, 2017).

En lo que se refiere a las actividades enzimáticas extracelulares, son numerosos los estudios realizados en aguas superficiales del océano (p. ej. Davey *et al.*, 2001; Misić *et al.*, 2006; Ayo *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos indican que, de manera general, las medidas de actividad enzimática son superiores a las de aguas profundas (Nagata *et al.*, 2010; Arnosti, 2011) y también se han observado gradientes espaciales de actividad hidrolítica congruentes con la variabilidad espacial de la composición de las comunidades microbianas (Martiny *et al.*, 2006; Pommier *et al.*, 2007; Fuhrman *et al.*, 2008). Por el contrario, son muy escasos los estudios realizados en la zona batipelágica y estos se restringen a áreas concretas del océano Pacífico (Koike y Nagata, 1997; Hoppe y Ullrich, 1999), del océano Atlántico (Baltar *et al.*, 2009, 2010 y 2013) y del mar Mediterráneo (Tamburini *et al.*, 2002 y 2009), lo que evidencia una limitación en el conocimiento de la hidrólisis de la materia orgánica en un ecosistema clave en los ciclos bioquímicos del océano (Arístegui *et al.*, 2009).

En aguas batipelágicas, la actividad enzimática es esencialmente bacteriana y está estrechamente relacionada con los agregados de materia orgánica particulada (Tamburini *et al.*, 2003; Baltar *et al.*, 2010 y 2013; Zhao *et al.*, 2020). Las velocidades de hidrólisis registradas son asombrosamente altas para las bajas densidades celulares existentes y, asimismo, se ha detectado una alta contribución de la fracción disuelta a la actividad enzimática total, siendo incluso superior que en aguas superficiales (Baltar *et al.*, 2009, 2010 y 2013).

Si se asume que la secreción de las enzimas disueltas corresponde exclusivamente a las comunidades batipelágicas, las actividades enzimáticas normalizadas con la densidad celular dan lugar a valores extraordinariamente altos. Esto es especialmente llamativo dado que la producción heterótrofa específica y la eficiencia de crecimiento son extremadamente bajas, indicativas de que el océano profundo es un medio hostil en cuanto al mantenimiento del metabolismo (Reinthalter *et al.*, 2006; Arístegui *et al.*, 2009). Otra posible explicación es que una fracción de la actividad enzimática que se mide en el océano profundo tenga su origen en enzimas secretadas en aguas superficiales y que hayan sido transportadas adsorbidas a los agregados que de manera continua sedimentan en las profundidades del océano (Koike y Nagata, 1997; Hoppe y Ullrich, 1999). En ese caso, la relevancia de la actividad de las enzimas exportadas en los ciclos biogeoquímicos del océano profundo estaría directamente relacionada con su capacidad de dispersión y su vida media.

A este respecto, los estudios realizados en sistemas marinos con enzimas de muestras naturales apuntan a que la vida media puede ser de unas decenas de horas a varios días (Bochdansky *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Steen y Arnosti, 2011; Baltar *et al.*, 2013; Thomson *et al.*, 2019), lo que permite suponer que la actividad de las enzimas disueltas puede llegar a tener efecto en zonas de la columna de agua bien alejadas de su lugar de producción (Wetzel, 1991; Ziervogel y Arnosti, 2008; Ziervogel *et al.*, 2010). En consecuencia, si existiera un transporte vertical de enzimas al océano profundo, normalizar las medidas de actividad enzimática supondría una sobreestimación de la capacidad hidrolítica de las bacterias de las comunidades batipelágicas.

Basándonos en todo lo mencionado anteriormente, se planteó la hipótesis de que una parte de la actividad enzimática de las aguas profundas oceánicas pudiera tener su origen en las enzimas originadas en la zona epipelágica y que son exportadas al océano profundo. En concreto, se decidió llevar a cabo el estudio con leucina aminopeptidasa debido, por un lado, a que los compuestos nitrogenados tienen un papel fundamental en el crecimiento bacteriano (Münster y Chróst, 1990). Por otro lado, la materia orgánica de las zonas epi- y batipelágicas del océano difiere notablemente en su composición debido al consumo preferencial del nitrógeno frente al carbono durante su descenso en la columna de agua (Karl *et al.*, 1988; Benner, 2002), por lo que estos cambios en su composición deberían de reflejarse de manera contrastada en la actividad aminopeptidasa.

Para abordar la hipótesis principal, primero se analizaron comparativamente la actividad potencial total y disuelta de leucina aminopeptidasa en aguas superficiales y profundas de la columna de agua utilizando la base de datos obtenida a lo largo de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico durante la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*. Asimismo, se realizaron ensayos cinéticos para profundizar en la comparación entre las zonas epi- y batipelágicas, utilizando los parámetros cinéticos V_{\max} y K_m y la ratio derivada de ambos (eficiencia catalítica, V_{\max}/K_m) como indicadores del nivel de adaptación de las comunidades bacterianas a la materia orgánica disponible. Por último, se estudió el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de las enzimas de las muestras de las zonas epi- y batipelágica del océano mediante experimentos de incubación. Estudios realizados con bacterias en laboratorio han demostrado diferencias en la respuesta frente a la temperatura de las enzimas de organismos mesófilos y psicrófilos (Feller y Gerday, 2003 y referencias en este documento), lo que puede ser una herramienta útil a la hora de caracterizar y comparar las enzimas de profundidades tan diferenciadas.

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de la vida media de las enzimas disueltas en aguas superficiales mediante experimentos realizados en diferentes estaciones oceánicas para dilucidar si la actividad de las enzimas extracelulares puede perdurar lo suficiente como para llegar a influir en la actividad enzimática del océano profundo. Por último, se estudió el efecto del descenso de la temperatura en la actividad de las enzimas disueltas, proceso similar al que se verían sometidas a lo largo de la exportación a lo largo de la columna de agua.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio y toma de muestras

Las muestras de agua de mar se recogieron y analizaron a bordo del BIO *Hespérides* durante la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*, que comenzó en diciembre de ese mismo año y finalizó en julio del 2011 (Duarte, 2015). A lo largo de la expedición, el muestreo se realizó entre las latitudes 35,1° N y 40,6° S en un total de 89 estaciones distribuidas en los océanos Pacífico (28 estaciones), Atlántico (42 estaciones) e Índico (19 estaciones) (**Figura 20**).

Las muestras de agua de mar se recogieron en cada estación entre las 07:00 y 10:00 h de la mañana y en varias profundidades de la columna de agua: a 3 m de profundidad (“superficie”), con botellas Niskin de 30 l, en el máximo profundo de clorofila, 23 m-160 m (“DCM”), utilizando un sistema de roseta de 24 botellas Niskin de 12 l con un instrumento CTD SeabirdSBE9 integrado, y en la zona batipelágica, 2000-4000 m de profundidad, (“fondo”), utilizando el mismo sistema de roseta.

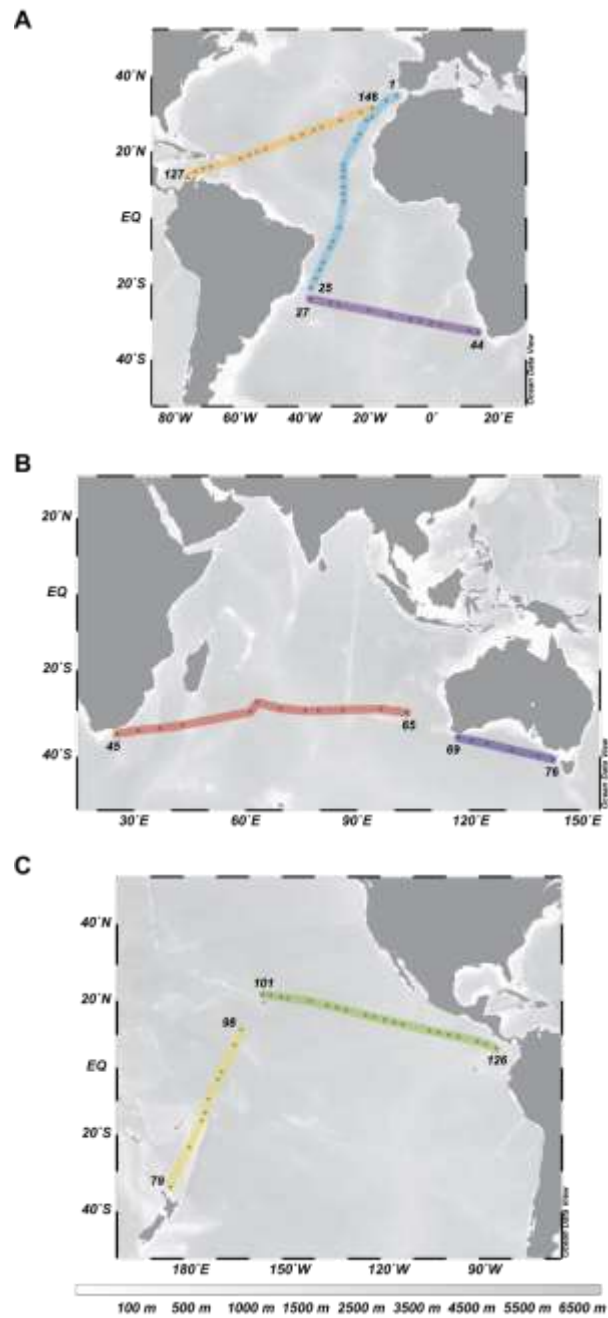


Figura 20: Localización de las 89 estaciones de muestreo a lo largo del Océanos Atlántico (A, estaciones 1-44 y 127-146), Océano Índico (B, 45-76) y Océano Pacífico (C, estaciones 79-126). La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

En cada estación se realizó uno o varios de los siguientes ensayos experimentales: actividad enzimática potencial, ensayos cinéticos y estabilidad de las enzimas disueltas, que se describen a continuación.

La localización geográfica de las estaciones, tipo de muestras analizadas y tipo de ensayo experimental realizado se detallan en la **Tabla S1**.

2.2 Actividad enzimática potencial

La actividad enzimática leucina aminopeptidasa se midió como representativa de la hidrólisis de sustratos orgánicos complejos de tipo proteico comúnmente hallados en el medio natural. La medida de la actividad se realizó mediante el uso del sustrato fluorogénico L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina (Hoppe, 1983), que es un sustrato modelo de una gran variedad de péptidos y proteínas. Hay que tener presente que esta metodología está basada en la adición de sustratos modelo artificiales susceptibles de ser hidrolizados por un amplio conjunto de isoenzimas peptidasa (Chróst, 1991; Christian y Karl, 1998; Steen *et al.*, 2015), por lo que los resultados que se presentaran más adelante deben de interpretarse como velocidades de hidrólisis resultado de la actividad de todas las isoenzimas presentes en la muestra natural.

Los ensayos de actividad enzimática potencial (V_{sat}) de leucina aminopeptidasa se llevaron a cabo en un total de 85 estaciones: 40 estaciones en el Océano Atlántico, 18 estaciones en el Océano Índico y 27 estaciones en el Océano Pacífico (**Figura 21** y **Tabla S1**). Para todas las estaciones se recogió muestra a 3 m de profundidad (“superficie”) y en la zona batipelágica a 2000-4000 m de profundidad (“fondo”); adicionalmente, en 64 de las estaciones también se recogió agua en el máximo profundo de clorofila (“DCM”).

La actividad potencial total se midió en las tres profundidades mencionadas y para ello, la muestra de agua de mar sin alterar se distribuyó en un volumen de 240 μl a microplacas de 96 pocillos con una pipeta multicanal. Asimismo, se midió la actividad potencial de la fracción disuelta en las muestras de “superficie” y “fondo”. En este caso, el agua de mar de la profundidad correspondiente se filtró previamente con jeringa a través de filtros Acrodisc de 0,1 μm de tamaño de poro (Kim *et al.*, 2007) y de baja unión a proteínas, con el objetivo de minimizar la adsorción de las enzimas extracelulares al propio filtro (Obayashi y Suzuki, 2008). A continuación, las muestras se distribuyeron en un volumen de 240 μl a las microplacas.

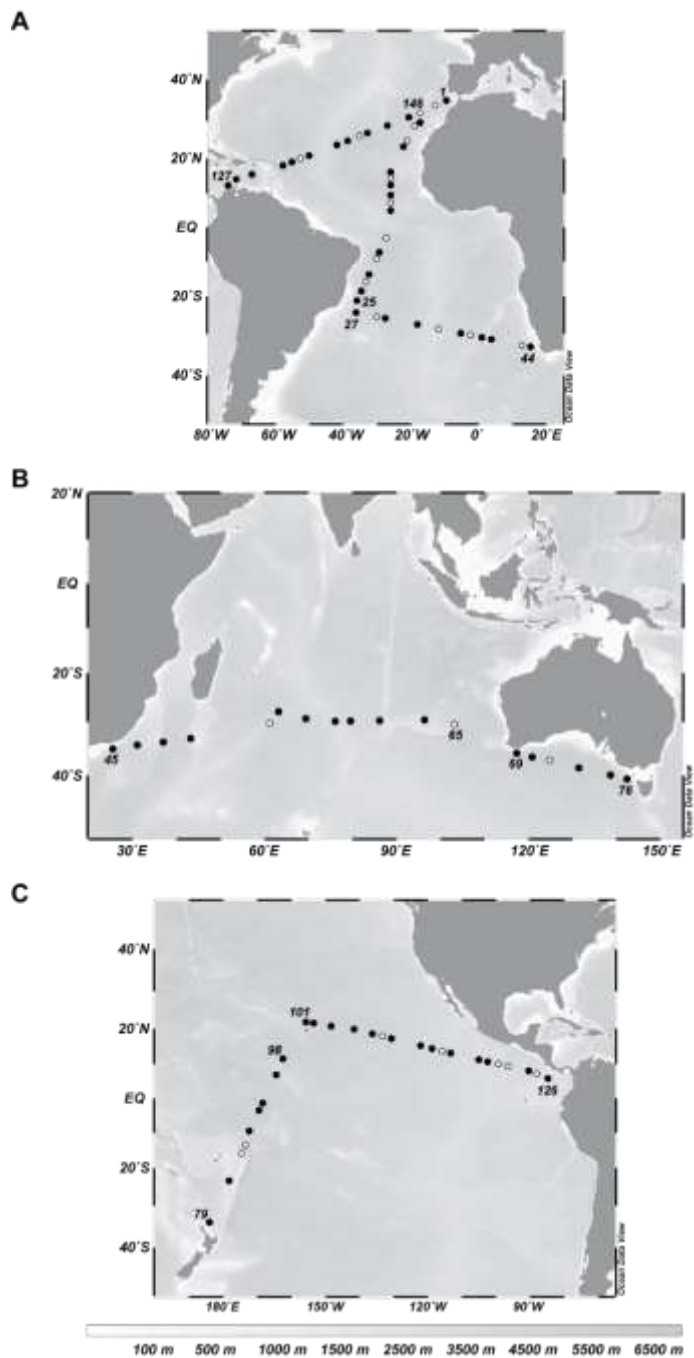


Figura 21: Localización de las estaciones de muestreo en los océanos Atlántico (A), Índico (B) y Pacífico (C) en las que se realizaron los ensayos de actividad enzimática potencial (V_{sat}) de leucina aminopeptidasa en superficie y fondo. Se han representado con círculos negros aquellas estaciones en las que también se recogió muestra de agua en el máximo profundo de clorofila (DCM). La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

Se prepararon viales con una solución concentrada ($\times 1000$) del sustrato con metanol al 40 %, que se mantuvieron congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. El día del ensayo experimental, se descongeló uno de los viales a temperatura ambiente y se prepararon las diluciones pertinentes con agua Mili-Q para que al añadir $10\text{ }\mu\text{l}$ a $240\text{ }\mu\text{l}$ de muestra de agua de mar se obtuviera una concentración final de $1000\text{ }\mu\text{M}$. Las medidas de actividad se realizaron por cuadruplicado.

Posteriormente, las muestras de fracción total y disuelta se incubaron a temperatura *in situ*, que en el caso de las muestras de superficie abarcó un rango de $16\text{-}29\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el caso de las de la zona batipelágica, de $1\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las medidas de fluorescencia se realizaron inmediatamente después de la adición de sustrato y en repetidas ocasiones a lo largo de las siguientes 48 h, aunque en la mayoría de los casos, los tiempos de incubación menores a 18 h fueron suficientes para obtener incrementos lineales de fluorescencia significativos. La fluorescencia se midió mediante un espectrofluorímetro equipado con un lector de microplaca (Synergy 2, Biotek) en las longitudes de onda 380 nm (excitación) y 440 nm (emisión). Las unidades de fluorescencia se transformaron en concentración de producto liberado mediante rectas patrón de 7-amino-4-metilcumarina en un rango de $0\text{-}96\text{ nM}$ (concentración final). Como blancos para determinar la fluorescencia intrínseca de la muestra se utilizaron submuestras a las que no se añadió sustrato análogo. En experimentos previos realizados con agua marina costera hervida se demostró que la hidrólisis abiótica de sustrato no era significativa.

Los datos brutos fueron tratados mediante el software de análisis de datos **Gen5™** y las velocidades de hidrólisis se expresaron como nanomoles de producto MCA liberado por litro y por hora (V_{sat} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$).

2.3 Ensayos cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa se llevó a cabo en un total de 33 estaciones: 18 estaciones en el Océano Atlántico, 7 estaciones en el Océano Índico y 8 estaciones en el Océano Pacífico (**Figura 22** y **Tabla S1**). En todas las estaciones se recogió muestra a 3 m de profundidad (“superficie”) y en la zona batipelágica a $2000\text{-}4000\text{ m}$ (“fondo”); adicionalmente, en 16 de las estaciones de muestreo, también se recogió agua en el máximo profundo de clorofila (“DCM”).

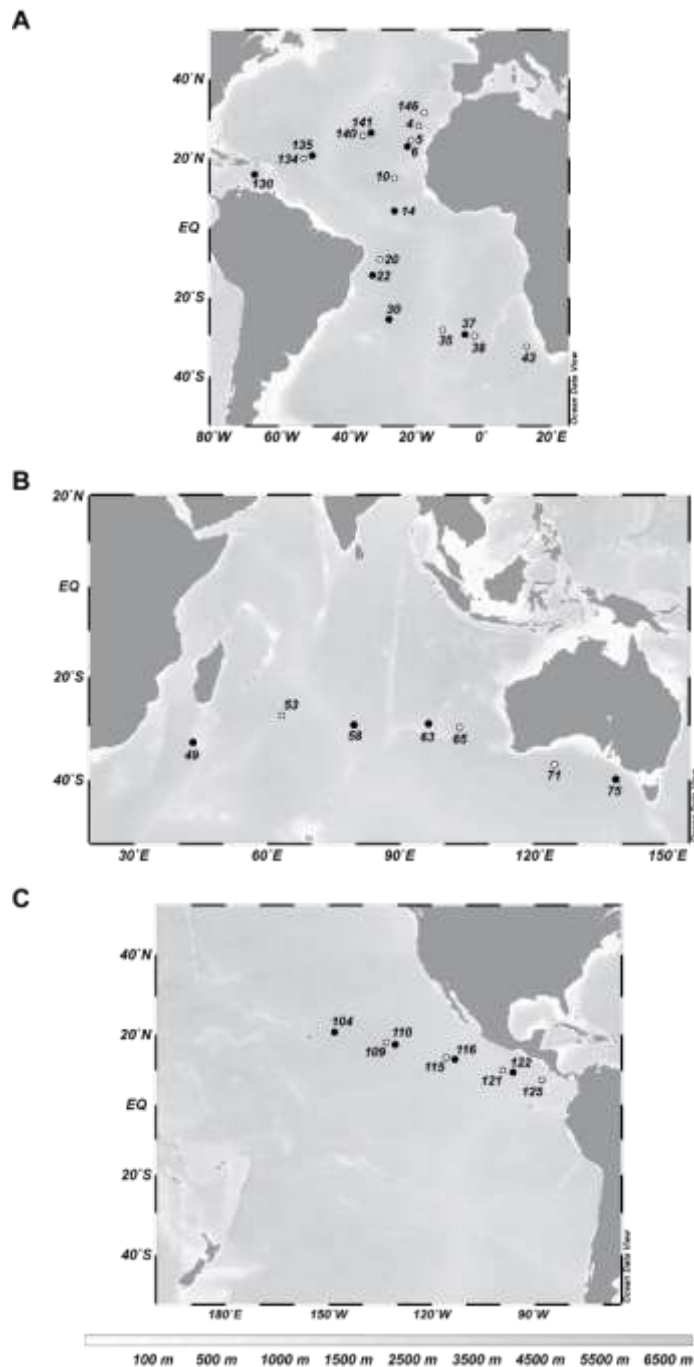


Figura 22: Localización de las estaciones de muestreo en los océanos Atlántico (A), Índico (B) y Pacífico (C) en las que se realizaron los ensayos cinéticos de leucina aminopeptidasa en superficie y fondo. Se han representado con círculos negros aquellas estaciones en las que también se recogió muestra de agua en el máximo profundo de clorofila (DCM). La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

El procedimiento experimental para la obtención de las velocidades de hidrólisis a temperatura *in situ* fue idéntico al descrito en el apartado 2.2 *Ensayos de actividad enzimática potencial*, con la salvedad de la preparación de las soluciones de sustrato.

En los ensayos cinéticos, se descongeló uno de los viales a temperatura ambiente y se prepararon las diluciones pertinentes con agua Mili-Q para que al añadir 10 µl a 240 µl de muestra de agua de mar se obtuvieran 11 concentraciones finales en el rango de 0-1500 µM. Para cada concentración, las medidas de actividad se realizaron por cuadruplicado y tras incubar la muestra a temperatura *in situ*.

Los datos brutos fueron tratados a través del software de análisis de datos **Gen5™** y las velocidades de hidrólisis se modelizaron ajustando a la ecuación propuesta por Michaelis-Menten (Michaelis y Menten 1913) y utilizando la regresión de mínimos cuadrados no lineales mediante la función *nls* del paquete *stats* del software R (R Development Core Team, Austria). De esta manera, se calcularon para cada muestra la velocidad máxima de la reacción enzimática (V_{\max} , nM·h⁻¹) y la constante de saturación de Michaelis (K_m , µM), que indica la afinidad enzima-sustrato. Adicionalmente, se calculó la ratio V_{\max}/K_m como indicativa de la eficiencia catalítica, que se corresponde con la pendiente de la ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato (Healey, 1980).

Adicionalmente, se determinó el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa en un total de total de 11 estaciones: 7 estaciones en el Océano Atlántico, 2 estaciones en el Océano Índico y 2 estaciones en el Océano Pacífico (**Figura 23** y **Tabla S1**). En todas las estaciones se recogió muestra a 3 m de profundidad (“superficie”) y en la zona batipelágica a 2000-4000 m (“fondo”).

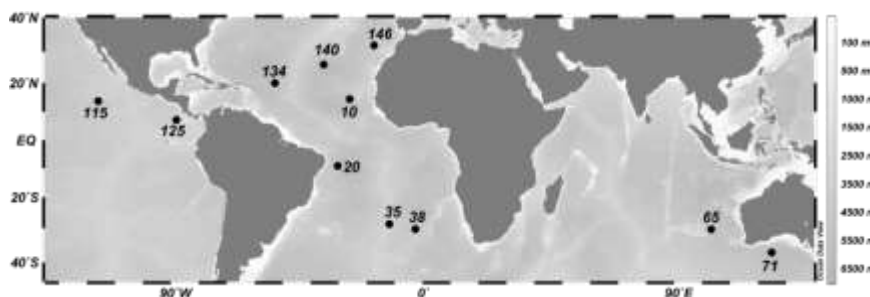


Figura 23: Localización de las estaciones de muestreo en las que se realizó el estudio del efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa en superficie y fondo. La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

El procedimiento experimental para la obtención de los parámetros cinéticos fue idéntico al descrito anteriormente en este apartado, con la salvedad de la temperatura de incubación de las muestras. Tanto para las muestras de “superficie” como para las de “fondo” se prepararon tres microplacas, y cada una de ellas se incubó a una de las siguientes temperaturas: temperatura *in situ* de superficie, temperatura *in situ* de fondo y una temperatura intermedia entre ambas.

2.4 Estabilidad de las enzimas disueltas

Los ensayos para estudiar la estabilidad de las enzimas disueltas se llevaron a cabo con muestras de superficie de 3 estaciones: la estación 13 en el Océano Atlántico, la estación 47 en el Océano Índico y la estación 112 en el Océano Pacífico (Figura 24 y Tabla S1).

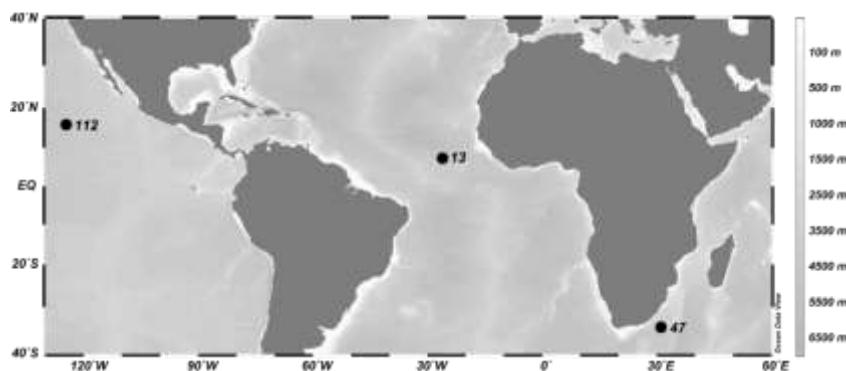


Figura 24: Localización de las estaciones de muestreo en las que se realizaron los ensayos de estabilidad de las enzimas disueltas de leucina aminopeptidasa en superficie. La numeración de las estaciones se corresponde con la utilizada en la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*.

El agua de mar se filtró con jeringa como se ha descrito anteriormente y se distribuyó en 12 microplacas de 96 pocillos. Experimentos previos realizados con muestras de agua de mar de un sistema costero, permitieron deducir que la filtración a través de 0,1 μm de tamaño de poro era el procedimiento adecuado para minimizar el crecimiento de bacterias durante experimentos de larga duración (datos no mostrados). Asimismo, se utilizaron únicamente los pocillos interiores de las microplacas para evitar alteraciones en el volumen de la muestra debido a desecamiento.

Con el objetivo de determinar el efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas disueltas, 6 de las microplacas se incubaron a la temperatura *in situ* de superficie y el resto, a la temperatura *in situ* del fondo de la columna de agua.

Las microplacas se incubaron durante 10-20 días, y en momentos concretos a lo largo de dicha incubación (días 0, 2, 5, 10, 15 y 20), se utilizó una microplaca de cada conjunto para determinar la actividad enzimática con una concentración final de sustrato de 1000 μM , mediante el procedimiento experimental descrito en el apartado 2.2 *Ensayos de actividad enzimática potencial*.

La estabilidad de las enzimas disueltas se cuantificó mediante el parámetro vida media ($t_{1/2}$, días), que se define como el tiempo necesario para que la actividad enzimática descienda a la mitad y que viene dada por la siguiente ecuación (Steen y Arnosti, 2011):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{k}$$

donde “k” es la constante de inactivación (días^{-1}).

Para la estimación de la constante de inactivación, primero, se calculó para cada tiempo de incubación la proporción de actividad enzimática remanente con respecto a la actividad enzimática inicial (A_t/A_0). A continuación, se representaron los valores A_t/A_0 obtenidos frente al tiempo de incubación expresado en días y se ajustaron a un modelo exponencial negativo utilizando la función *nls* del paquete *stats* del software R (R Development Core Team, Austria). La constante de inactivación de la actividad enzimática (k , días^{-1}) se determinó como el valor absoluto del exponente negativo del modelo y se consideró válida para un posterior análisis cuando su nivel de significación fue $p \leq 0,05$.

2.5 Tratamiento estadístico

Adicionalmente a los análisis específicos de cada cuerpo de trabajo descritos anteriormente, se realizaron las siguientes pruebas estadísticas.

Las diferencias entre los valores medios de los parámetros enzimáticos de las muestras de superficie, DCM y fondo se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas con una corrección *post hoc* de Bonferroni para tres comparaciones ($p \leq 0,017$).

Las relaciones entre los valores observados en las zonas epipelágica y batipelágica de cada estación se detectaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r) después de transformar los datos de manera logarítmica ($p \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *IBM SPSS Statistics* (version 24) para Windows.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis comparativo de las zonas epi- y batipelágica del océano

La actividad enzimática total de leucina aminopeptidasa en las zonas epipelágica y batipelágica del océano se presentan en la **Figura 25** (ver también **Tabla 1**). De manera general, se observó que los valores de V_{sat} total fueron dos veces superiores tanto en superficie como en DCM en comparación con los de la zona batipelágica, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,017$, **Tabla S2**).

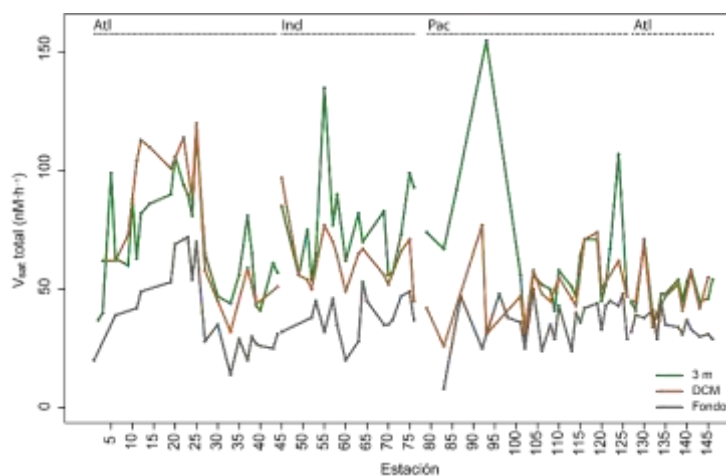


Figura 25: Distribución de los valores de actividad enzimática total (V_{sat}) de leucina aminopeptidasa obtenidos durante este estudio en superficie (3 m, verde), máximo profundo de clorofila (DCM, naranja) y zona batipelágica (fondo, gris).

Tabla 1. Valores de la media \pm error estándar (n) de las variables enzimáticas obtenidas en los ensayos de actividad potencial a lo largo de la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*: velocidad de hidrólisis de la fracción total (V_{sat} total, $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$) y porcentaje de actividad disuelta (AE dis, %).

	V_{sat} total ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	AE dis (%)
<i>Océano Atlántico</i>		
3 m	62 \pm 3 (39)	85 \pm 2 (39)
DCM	65 \pm 5 (28)	n.d.
Fondo	39 \pm 3 (35)	97 \pm 1 (35)
<i>Océano Índico</i>		
3 m	77 \pm 5 (17)	76 \pm 6 (17)
DCM	63 \pm 3 (15)	n.d.
Fondo	38 \pm 2 (16)	98 \pm 1 (16)
<i>Océano Pacífico</i>		
3 m	116 \pm 32 (25)	75 \pm 7 (25)
DCM	76 \pm 15 (20)	n.d.
Fondo	41 \pm 6 (24)	99 \pm 0 (24)
<i>Océano global</i>		
3 m	82 \pm 10 (81)	80 \pm 2 (81)
DCM	68 \pm 5 (63)	n.d.
Fondo	40 \pm 2 (75)	98 \pm 0 (75)

Notas. DCM: máximo profundo de clorofila; n.d.: no hay datos.

Asimismo, las medidas de actividad enzimática de la muestra filtrada indicaron que entre el 75-100 % de la actividad leucina aminopeptidasa de superficie corresponde a la fracción disuelta en el Océano Atlántico, mientras que fue del 70-90 % en el Océano Índico y del 70-95 % en el Océano Pacífico (**Figura 27A**). En lo que respecta al océano profundo, la contribución de la fracción disuelta fue notablemente superior, de entre el 90-100 % en los tres océanos (**Figura 27B**).

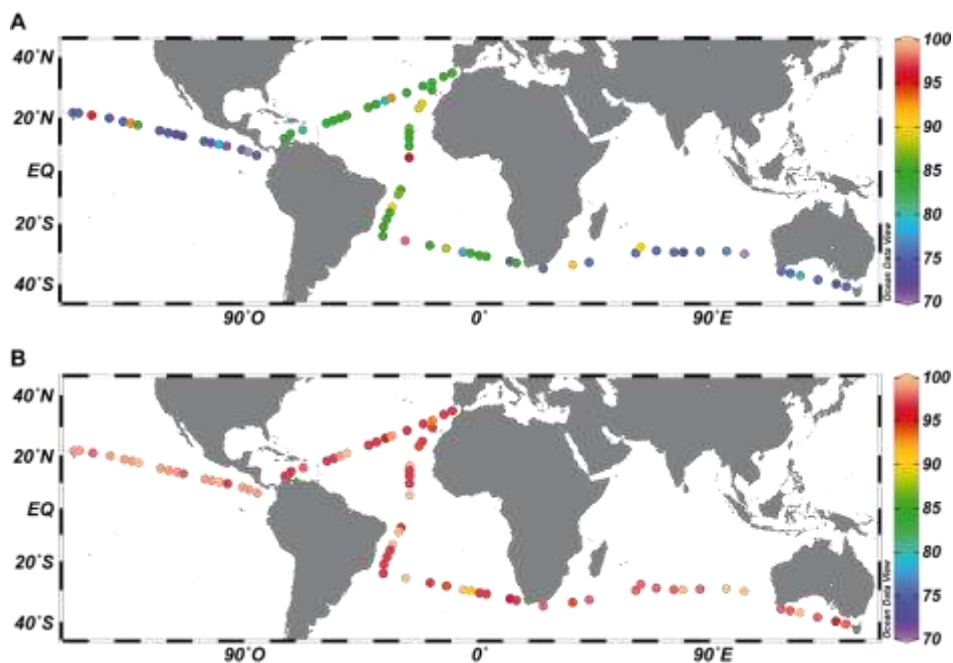


Figura 27: Distribución de la actividad leucina aminopeptidasa en la fracción disuelta de las muestras de superficie (A) y las muestras de la zona batipelágica (B) a lo largo de todo el recorrido de la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*. El gradiente de color representa el porcentaje con respecto a la actividad total.

El análisis de los parámetros cinéticos de la muestra total se utilizó como indicativo del grado de adaptación de las comunidades bacterianas a la materia orgánica disponible en las distintas profundidades estudiadas. Los resultados obtenidos para el océano global se han representado en la **Figura 28** (ver también **Tabla 2**). La velocidad máxima de hidrólisis mostró un comportamiento análogo a la V_{sat} y los valores de aguas superficiales se distinguieron de manera significativa de los de aguas profundas (**Figura 28A** y **Tabla S2**). En el caso de la K_m (media \pm ES), se observó un descenso del valor medio entre superficie ($K_{m\ 3\text{ m}}$: $457 \pm 41\ \mu\text{M}$ y $K_{m\ \text{DCM}}$: $431 \pm 39\ \mu\text{M}$) y fondo ($K_{m\ 4000\ \text{ m}}$: $357 \pm 19\ \mu\text{M}$); sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 28B** y **Tabla S2**). Por último, el valor de la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) también fue superior en la zona epipelágica con respecto a la batipelágica, aunque las diferencias solo fueron significativas entre 3 m y fondo (**Figura 28C** y **Tabla S2**).

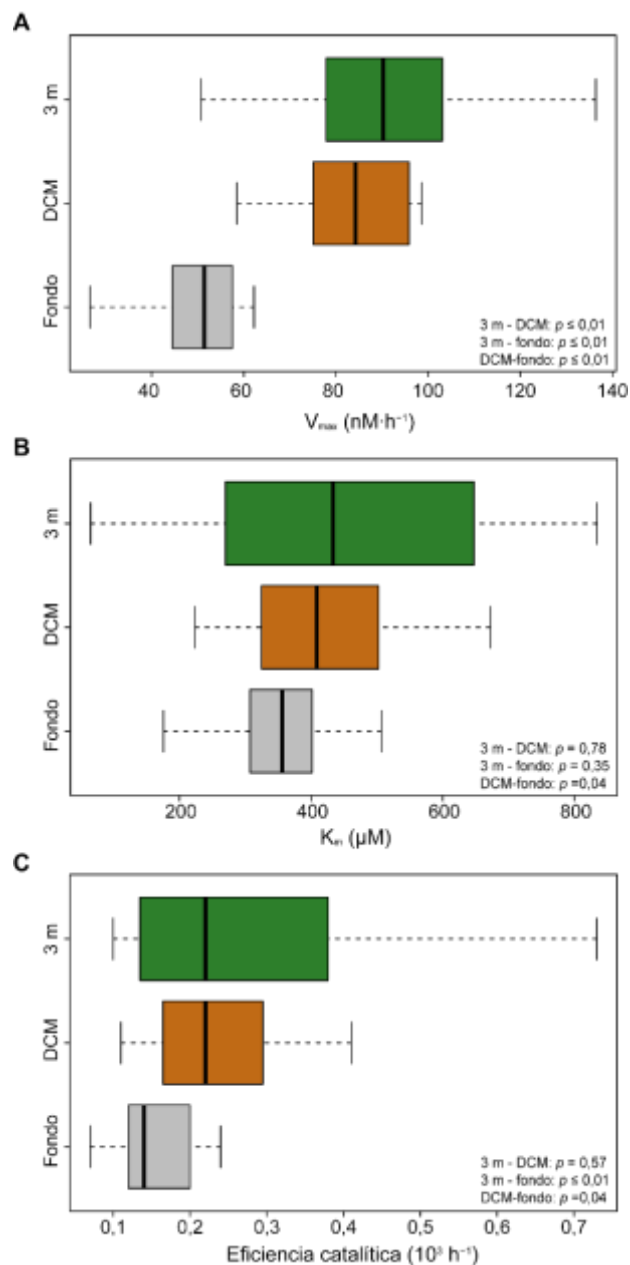


Figura 28: Diagrama de cajas de los resultados obtenidos para el océano global. Se han representado la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max} , A), la constante de saturación de Michaelis (K_m , B) y de la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m , C) de la actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa en las tres profundidades analizadas: superficie (3 m, verde claro), DCM (DCM, verde oscuro) y zona batipelágica (fondo, gris). Se ha indicado el valor de la significación estadística (p) obtenido en la prueba de Wilcoxon obtenido en cada comparación.

Tabla 2. Valores de la media \pm error estándar (n) de las variables enzimáticas obtenidas en los ensayos cinéticos a lo largo de la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*: velocidad máxima de hidrólisis (V_{\max} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$), constante de saturación de Michaelis (K_m , μM) y eficiencia catalítica (V_{\max}/K_m , $10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$).

	V_{\max} ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max}/K_m ($10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)
Océano Atlántico			
3 m	116 \pm 15 (18)	465 \pm 54 (18)	0,35 \pm 0,07 (18)
DCM	97 \pm 12 (8)	469 \pm 35 (8)	0,21 \pm 0,03 (8)
Fondo	54 \pm 6 (12)	412 \pm 23 (12)	0,13 \pm 0,01 (12)
Océano Índico			
3 m	83 \pm 8 (6)	332 \pm 114 (6)	0,41 \pm 0,11 (6)
DCM	78 \pm 4 (4)	313 \pm 31 (4)	0,26 \pm 0,03 (4)
Fondo	48 \pm 5 (6)	261 \pm 48 (6)	0,22 \pm 0,04 (6)
Océano Pacífico			
3 m	99 \pm 11 (8)	536 \pm 60 (8)	0,25 \pm 0,09 (8)
DCM	91 \pm 4 (4)	473 \pm 130 (4)	0,24 \pm 0,07 (4)
Fondo	54 \pm 2 (8)	347 \pm 14 (8)	0,16 \pm 0,01 (8)
Océano global			
3 m	105 \pm 9 (32)	457 \pm 41 (32)	0,33 \pm 0,05 (32)
DCM	91 \pm 6 (16)	431 \pm 39 (16)	0,23 \pm 0,02 (16)
Fondo	52 \pm 3 (26)	357 \pm 19 (26)	0,16 \pm 0,01 (26)

Notas. DCM: máximo profundo de clorofila.

Con el objetivo de profundizar en la hipótesis de una posible conectividad hidrolítica entre las aguas superficiales y batipelágicas del océano, se analizaron, por un lado, las correlaciones entre la actividad enzimática total y los parámetros cinéticos de leucina aminopeptidasa de ambas zonas de la columna de agua. En todos los casos se observaron correlaciones positivas de las variables enzimáticas estudiadas, tal y como puede comprobarse en la **Figura 29**.

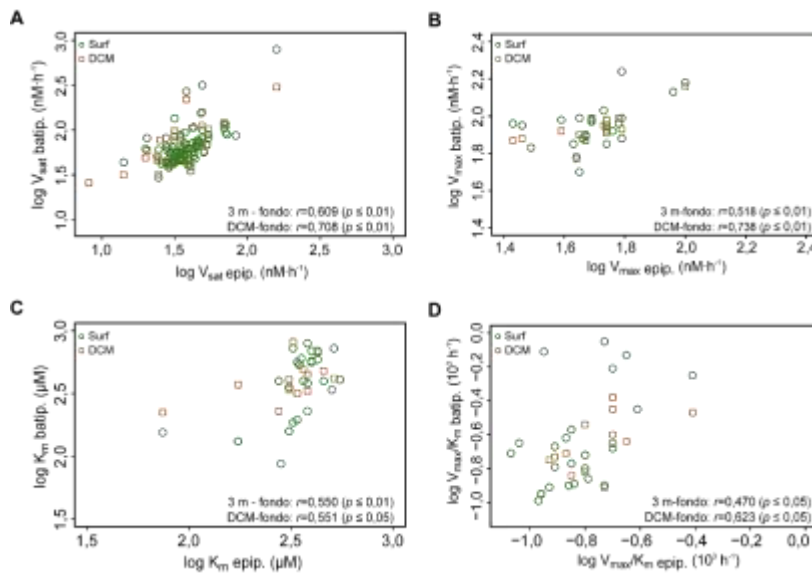


Figura 29: Covariación entre los valores de la zona epipelágica y batipelágica de la actividad enzimática potencial (V_{sat} , A), la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max} , B), la constante de saturación de Michaelis (K_m , C) y de la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m , D) de leucina aminopeptidasa. Se ha indicado para cada caso el valor del coeficiente de Pearson (r) y la significación estadística del análisis (p).

Por otro lado, se caracterizó el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de las enzimas de las muestras de aguas superficiales, sometiéndolas a un descenso de la temperatura, y de las muestras de aguas profundas del océano, sometiéndolas a un aumento de la temperatura. El comportamiento de la K_m , la V_{max} y la eficiencia catalítica frente a cambios en la temperatura de la muestra se ha representado en la **Figura 30** para tres de las estaciones de muestreo analizadas (ver también **Tabla S3**). De manera general, en las muestras de la zona epipelágica se observó un descenso tanto del valor de la K_m (por tanto, un aumento de la afinidad por el sustrato) como de la V_{max} a medida que la temperatura experimental era menor, por lo que la eficiencia catalítica mostró la misma tendencia. Asimismo, en las muestras de la zona batipelágica también se observó una relación directa entre la temperatura experimental y la tendencia de los parámetros cinéticos.

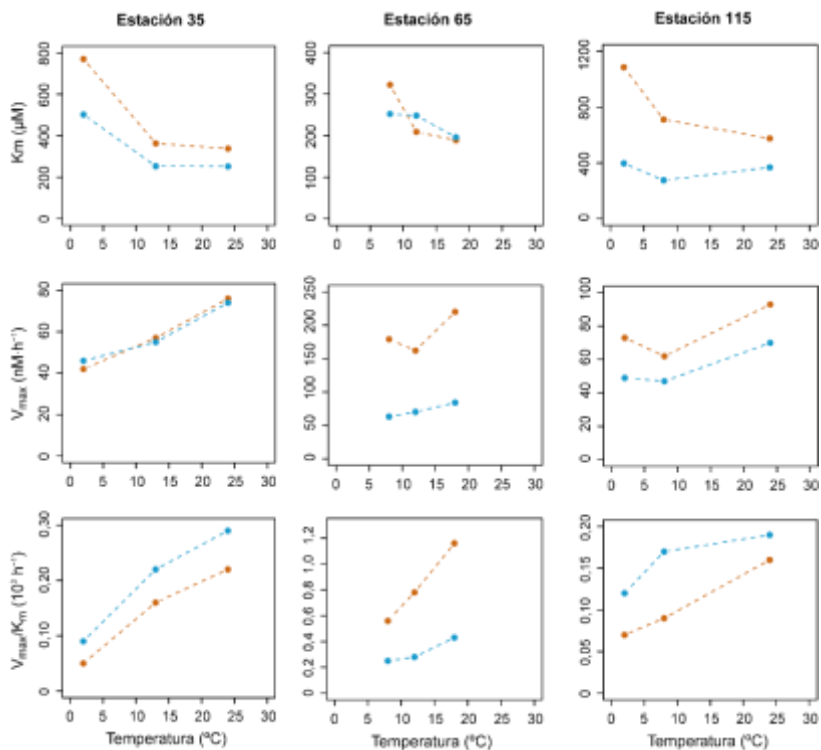


Figura 30: Evolución de la constante de Michaelis (K_m , arriba), la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max} , centro) y de la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m , abajo) en función de la temperatura. Se han representado los datos de superficie (naranja) y fondo (azul) de una estación representativa de cada océano: estación 35 (Océano Atlántico), estación 65 (Océano Índico) y estación 115 (Océano Pacífico).

3.2 Estabilidad de las enzimas extracelulares

Los experimentos de estabilidad realizados con muestras de agua filtrada de superficie incubada a temperatura *in situ* (rango: 24-28 $^{\circ}\text{C}$) permitieron definir la vida media de las enzimas extracelulares de leucina aminopeptidasa. La pérdida de actividad enzimática se ajustó a un modelo exponencial negativo (**Figura 31**, color naranja). Utilizando la constante de inactivación deducida a partir del exponente de la ecuación, se calculó que la vida media de las enzimas disueltas fue de 8,6-9,5 días en la estación 13 (Océano Atlántico), 12,0-13,3 días en la estación 47 (Océano Índico) y de 31,5-34,7 en la estación 112 (Océano Pacífico).

De manera paralela, se llevó a cabo un experimento en el que el agua filtrada de superficie se incubó a la temperatura del fondo de la columna de agua (rango: 1-3 $^{\circ}\text{C}$) para conocer en qué medida el descenso de la temperatura del agua, semejante al que

podría ocurrir durante el transporte vertical de enzimas, afecta a su actividad. En este caso, la pérdida de actividad también se ajustó a un modelo exponencial negativo (**Figura 31**, color azul) y la vida media de las enzimas disueltas fue de 5,7-6,2 días en la estación 13, 11,2-16,5 días en la estación 47 y de 21,7-23,1 días en la estación 112 (Océano Pacífico). No se observaron diferencias en la estabilidad de los enzimas de superficie y fondo.

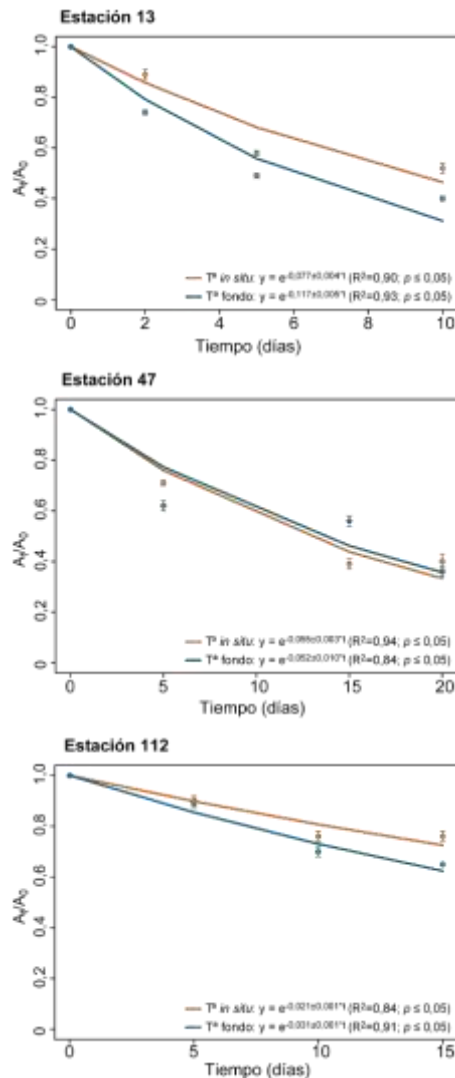


Figura 31: Representación de la pérdida de actividad ($A_t/A_0 \pm$ error estándar) de las enzimas disueltas de leucina aminopeptidasa frente al tiempo de incubación de las muestras de superficie de la estación 13 (Océano Atlántico, arriba), estación 47 (Océano Índico, centro) y estación 112 (Océano Pacífico, abajo). Se han representado conjuntamente el valor medio \pm error estándar de la muestra incubada a la temperatura *in situ* de superficie (naranja) y a la temperatura del fondo de la columna de agua (azul).

Material suplementario

La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo.

Tabla S1. Localización geográfica de las estaciones de muestreo de las que se obtuvieron los datos utilizados este estudio.

Crucero	Estación	Latitud	Longitud	Experimento				Profundidad
				V _{Sat}	Kin	T ^a	ESE	
Océano Atlántico								
1	1	35,14° N	9,52° O	X				3 m/Fondo
1	2	34,00° N	12,78° O	X				3 m/Fondo
1	3	29,68° N	17,29° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	4	28,70° N	18,87° O		X			3 m/ Fondo
1	5	24,97° N	21,05° O	X	X			3 m/Fondo
1	6	23,27° N	22,22° O	X	X			3 m/DCM/Fondo
1	9	16,16° N	26,03° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	10	14,52° N	26,00° O	X	X	X		3 m/Fondo
1	11	12,50° N	25,99° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	12	9,56° N	25,99° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	13	7,32° N	26,00° O				X	3 m
1	14	4,99° N	26,00° O	X	X			3 m/DCM/Fondo
1	19	7,28° S	29,32° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	20	9,13° S	30,19° O	X	X	X		3 m/Fondo
1	22	13,74° S	32,38° O	X	X			3 m/DCM/Fondo
1	23	15,83° S	33,40° O	X				3 m/Fondo
1	24	18,42° S	34,64° O	X				3 m/DCM/Fondo
1	25	21,09° S	35,97° O	X				3 m/DCM/Fondo
2	27	24,32° S	36,22° O	X				3 m/DCM/Fondo
2	30	25,87° S	27,57° O	X	X			3 m/DCM/Fondo
2	33	27,55° S	18,09° O	X				3 m/DCM/Fondo
2	35	28,65° S	11,81° O	X	X	X		3 m/Fondo
2	37	29,77° S	5,31° O	X	X			3 m/DCM/Fondo
2	38	30,26° S	2,44° O	X	X	X		3 m/Fondo
2	39	30,88° S	0,97° E	X				3 m/DCM/Fondo
2	40	31,31° S	3,75° E	X				3 m/DCM/Fondo
2	43	32,81° S	12,77° E	X	X			3 m/Fondo
2	44	33,23° S	15,34° E	X				3 m/DCM/Fondo
7	127	12,36° N	74,04° O	X				3 m/DCM/Fondo
7	128	14,16° N	71,67° O	X				3 m/DCM/Fondo
7	130	15,53° N	67,01° O	X	X			3 m/DCM/Fondo

7	132	18,06° N	57,80° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	133	19,00° N	55,15° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	134	19,99° N	52,64° O	X	X	X	3 m/Fondo
7	135	20,80° N	50,14° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
7	138	23,74° N	41,90° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	139	24,84° N	38,71° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	140	26,11° N	35,26° O	X	X	X	3 m/Fondo
7	141	26,91° N	32,84° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
7	143	28,87° N	26,95° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	145	30,97° N	20,65° O	X			3 m/DCM/Fondo
7	146	32,08° N	17,27° O	X	X	X	3 m/Fondo
Océano Índico							
3	45	35,14° S	25,56° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	47	34,44° S	31,11° E			X	3 m
3	49	33,91° S	37,04° E	X	X		3 m/DCM/Fondo
3	51	33,19° S	43,25° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	52	30,06° S	61,43° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	53	27,98° S	63,25° E	X	X		3 m/Fondo
3	55	29,35° S	69,40° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	57	29,90° S	76,09° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	58	29,83° S	79,61° E	X	X		3 m/DCM/Fondo
3	60	29,75° S	86,26° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	63	29,57° S	96,41° E	X	X		3 m/DCM/Fondo
3	64	30,33° S	103,31° E	X			3 m/DCM/Fondo
3	65	30,33° S	103,32° E	X	X	X	3 m/Fondo
4	69	35,98° S	117,41° E	X			3 m/DCM/Fondo
4	70	36,64° S	120,86° E	X			3 m/DCM/Fondo
4	71	37,24° S	124,90° E	X	X	X	3 m/Fondo
4	73	38,58° S	131,51° E	X			3 m/DCM/Fondo
4	75	39,87° S	138,74° E	X	X		3 m/DCM/Fondo
4	76	40,55° S	142,50° E	X			3 m/DCM/Fondo
Océano Pacífico							
5	79	34,06° S	176,02° E	X			3 m/DCM/Fondo
5	83	23,38° S	178,21° O	X			3 m/DCM/Fondo
5	86	15,90° S	174,49° O	X			3 m/Fondo
5	87	13,53° S	173,37° O	X			3 m/Fondo

5	89	9,47° S	172,30° O	X			3 m/DCM/Fondo
5	92	3,41° S	169,46° O	X			3 m/DCM/Fondo
5	93	1,30° S	168,35° O	X			3 m/DCM/Fondo
5	96	6,99° N	164,37° O	X			3 m/DCM/Fondo
5	98	11,59° N	162,41° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	101	21,89° N	155,66° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	102	21,57° N	153,42° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	104	20,78° N	148,27° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
6	106	19,89° N	141,59° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	108	18,65° N	136,18° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	109	18,03° N	133,26° O	X	X		3 m/Fondo
6	110	17,37° N	130,61° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
6	112	15,91° N	124,47° O			X	3 m
6	113	15,31° N	122,00° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	114	14,53° N	118,77° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	115	13,80° N	115,76° O	X	X	X	3 m/Fondo
6	116	13,21° N	113,26° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
6	119	11,35° N	105,01° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	120	10,76° N	102,44° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	121	10,09° N	99,25° O	X	X		3 m/Fondo
6	122	9,45° N	96,34° O	X	X		3 m/DCM/Fondo
6	124	8,14° N	90,37° O	X			3 m/DCM/Fondo
6	125	7,22° N	87,96° O	X	X	X	3 m/Fondo
6	126	5,91° N	84,79° O	X			3 m/DCM/Fondo

Notas. V_{sat} : actividad enzimática potencial; Kin: parámetros cinéticos; T^a : estudio del efecto de la temperatura; ESE: estabilidad de las enzimas disueltas.

Tabla S2. Resultados del análisis de la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas con una corrección *post hoc* de Bonferroni para tres comparaciones ($p \leq 0,017$). Se presenta para cada caso el valor de p (n) y se han resaltado en negrita las comparaciones que fueron estadísticamente significativas.

	Experimento				
	Actividad potencial		Ensayos cinéticos		
	V_{sat} total ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	AE dis (%)	V_{max} ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{max}/K_m ($10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)
Océano Atlántico					
3 m - DCM	$p = 0,304$ (28)	n.d.	$p = 0,078$ (8)	$p = 0,575$ (8)	$p = 0,612$ (8)
3 m - Fondo	$p \leq 0,001$ (34)	$p \leq 0,001$ (32)	$p = 0,002$ (12)	$p = 0,965$ (12)	$p = 0,006$ (12)
DCM- Fondo	$p \leq 0,001$ (25)	n.d.	$p = 0,016$ (7)	$p = 0,176$ (7)	$p = 0,015$ (7)
Océano Índico					
3 m - DCM	$p = 0,003$ (15)	n.d.	$p = 0,066$ (4)	$p = 0,465$ (4)	$p = 0,273$ (4)
3 m - Fondo	$p = 0,001$ (15)	$p = 0,016$ (15)	$p = 0,043$ (5)	$p = 0,893$ (5)	$p = 0,080$ (5)
DCM- Fondo	$p = 0,001$ (13)	n.d.	$p = 0,109$ (3)	$p = 0,109$ (3)	$p = 0,593$ (3)
Océano Pacífico					
3 m - DCM	$p = 0,005$ (19)	n.d.	$p = 1,000$ (4)	$p = 0,285$ (4)	$p = 0,465$ (4)
3 m - Fondo	$p \leq 0,001$ (22)	$p = 0,014$ (22)	$p = 0,012$ (8)	$p = 0,106$ (8)	$p = 0,499$ (4)
DCM- Fondo	$p \leq 0,001$ (18)	n.d.	$p = 0,068$ (4)	$p = 0,465$ (4)	$p = 0,465$ (4)
Océano global					
3 m - DCM	$p = 0,007$ (62)	n.d.	$p = 0,015$ (16)	$p = 0,776$ (16)	$p = 0,570$ (16)
3 m - Fondo	$p \leq 0,001$ (71)	$p \leq 0,001$ (69)	$p \leq 0,001$ (25)	$p = 0,346$ (25)	$p = 0,001$ (25)
DCM- Fondo	$p \leq 0,001$ (56)	n.d.	$p = 0,001$ (14)	$p = 0,035$ (14)	$p = 0,030$ (14)

Notas. V_{sat} : actividad enzimática potencial; AE dis (%): porcentaje de actividad disuelta; V_{max} : velocidad máxima de hidrólisis; K_m : constante de saturación de Michaelis; V_{max}/K_m : eficiencia catalítica; DCM: máximo profundo de clorofila; n.d.: no hay datos.

Tabla S3. Valores de la constante de saturación de Michaelis (K_m , μM), la velocidad máxima de la reacción enzimática (V_{\max} , $\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$) y la eficiencia catalítica (V_{\max}/K_m , $10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) de leucina aminopeptidasa.

Estación	Tª incubación (°C)	3 m			Fondo		
		K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max} ($\text{nM}\cdot\text{h}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($10^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)
Océano Atlántico							
10	26	55	59	1,08	45	61	1,37
10	12	68	49	0,72	46	52	1,14
10	3	89	47	0,53	53	53	1,01
20	27	80	55	0,69	200	45	0,23
20	19	204	54	0,27	215	49	0,23
20	12	475	50	0,10	245	46	0,19
35	24	338	76	0,22	252	74	0,29
35	13	363	57	0,16	253	55	0,22
35	2	770	42	0,05	502	46	0,09
38	24	65	80	1,23	29	22	0,76
38	13	220	60	0,27	17	10	0,58
38	2	409	42	0,10	15	4	0,24
134	26	595	76	0,13	373	70	0,20
134	12	645	69	0,11	380	62	0,16
134	3	719	65	0,09	428	61	0,14
140	22	769	84	0,11	682	87	0,13
140	12	895	68	0,08	555	67	0,12
140	3	1023	55	0,05	537	46	0,09
146	24	405	79	0,19	372	76	0,20
146	12	531	61	0,12	411	54	0,13
146	3	1179	63	0,05	549	47	0,09
Océano Índico							
65	18	189	220	1,16	196	84	0,43
65	12	209	162	0,78	248	70	0,28
65	8	322	179	0,56	252	63	0,25
71	23	186	51	0,27	243	50	0,20
71	12	332	54	0,16	240	46	0,19
71	3	383	54	0,14	320	45	0,14
Océano Pacífico							
115	24	576	93	0,16	368	70	0,19
115	8	711	62	0,09	276	47	0,17
115	2	1086	73	0,07	397	49	0,12
125	28	196	173	0,88	390	66	0,17
125	12	196	121	0,62	329	61	0,19

La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo.

125

3

226

111

0,49

337

62

0,18

6

DISCUSIÓN.

1. Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, β - y α -glucosidasa en aguas superficiales costeras

1.1 Consideraciones metodológicas

En este trabajo se presenta por primera vez, hasta donde sabemos, una extensa base de datos estacional e interanual de cinéticas hidrolíticas bifásicas en aguas superficiales de un sistema costero templado. Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo con un conjunto de actividades enzimáticas extracelulares predominantes en aguas marinas, peptidasas y glucosidasas, y los datos obtenidos fueron posteriormente ajustados a modelos matemáticos de distinta complejidad. Salvo en contadas excepciones (<5 % de casos), se ha demostrado a lo largo de todo el período de estudio y para las tres actividades enzimáticas analizadas, la existencia de dos sistemas enzimáticos diferenciados, de alta afinidad y de baja afinidad respectivamente, lo que confirma la presumible heterogeneidad de isoenzimas en un ecosistema dinámico (Vrba *et al.*, 1996; Arrieta y Herndl, 2002).

Mientras que esta aproximación ha sido utilizada en estudios de muestras de suelo (Nannipieri *et al.*, 1982; Panikov *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 2001; Tischer *et al.*, 2015), son escasos los estudios de cinéticas multifásicas de procesos de hidrólisis de la materia orgánica de alto peso molecular en la zona eufótica de sistemas acuáticos marinos (ver **Tabla S1**). Además, en la mayoría de los trabajos se ha asumido que las reacciones enzimáticas obedecían al modelo convencional de una cinética monofásica Michaelis-Menten, tanto cuando los parámetros cinéticos se calcularon mediante linealización (Hanes-Woolf o Lineweaver-Burk), como con modelos no lineales. Los escasos trabajos que hemos encontrado en bibliografía en los que se realiza un ajuste a modelos multifásicos se restringen al estudio de las actividades enzimáticas LAP y β G (Unanue *et al.*, 1999) y fosfatasa alcalina (Bogé *et al.*, 2012 y 2013) en aguas superficiales y aminopeptidasa en estudios de sedimento y aguas profundas (Talbot y Bianchi, 1997; Tholosan *et al.*, 1999). En este sentido, los resultados del presente trabajo contribuyen a resaltar la importancia de la elección de un modelo adecuado para la determinación de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares en muestras naturales.

Asimismo, a la hora de caracterizar más de un sistema enzimático, hemos detectado la necesidad de usar al menos 12 concentraciones de sustrato, lo que se podría considerar el umbral mínimo de cara al diseño experimental de futuros ensayos cinéticos. Por un lado, un número adecuado de concentraciones contribuye a minimizar el efecto de la dispersión de los datos y por otro lado, es necesario para proveer a los modelos matemáticos más complejos de un número mínimo de datos con los que ejecutar las ecuaciones (Panikov *et al.*, 1992). En el caso particular de este ecosistema costero, y con los resultados obtenidos, consideramos recomendable para futuros estudios cinéticos aumentar el límite superior del rango de concentraciones de la leucina aminopeptidasa hasta 600-1000 μM para refinar el cálculo de la V_{max} y K_m del sistema de baja afinidad. Por el contrario, siendo la actividad glucosidasa muy baja, sería aconsejable aumentar el número de concentraciones de sustrato $<40 \mu\text{M}$ para conseguir una estimación más precisa de la K_m de alta afinidad.

Los estudios publicados sobre parámetros cinéticos de actividades hidrolíticas se han realizado utilizando rangos muy diferentes de concentraciones de sustrato. En la **Figura 12** se muestra la relación de los valores de K_m de las tres actividades enzimáticas extracelulares recopilados en bibliografía (**Tabla S1**) frente a la concentración máxima de sustrato utilizada en el estudio cinético. A pesar de la presumible variabilidad en la concentración de materia orgánica disuelta de los sistemas marinos incluidos, resulta evidente la dependencia de los valores de K_m de leucina aminopeptidasa y de las enzimas glucosidasa en función del rango de concentración de sustrato utilizado. Sin embargo, en la mayoría de los estudios que incluyen medidas de actividad enzimática con una única concentración saturante (V_{sat}), esta suele estar mayormente entre 50-500 μM (p. ej. Misic *et al.*, 2006; Van Wambeke *et al.*, 2009; Allison *et al.*, 2012; Baltar *et al.*, 2016; Baña *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en el presente trabajo en el ecosistema de Armintza indican que en ese rango de concentración la medida de actividad obtenida sería resultante de los dos sistemas enzimáticos y, principalmente, del sistema de baja afinidad. Por tanto, se estaría perdiendo información acerca de la versatilidad de la respuesta enzimática y, más concretamente, del sistema de alta afinidad, lo cual resulta valioso dado que su actividad prevalece en las concentraciones de polímeros que las comunidades bacterianas encuentran en el medio marino, que habitualmente son $<5 \mu\text{M}$ en el caso de las proteínas y polisacáridos (Keil y Kirchman, 1994; Nagata, 2008).

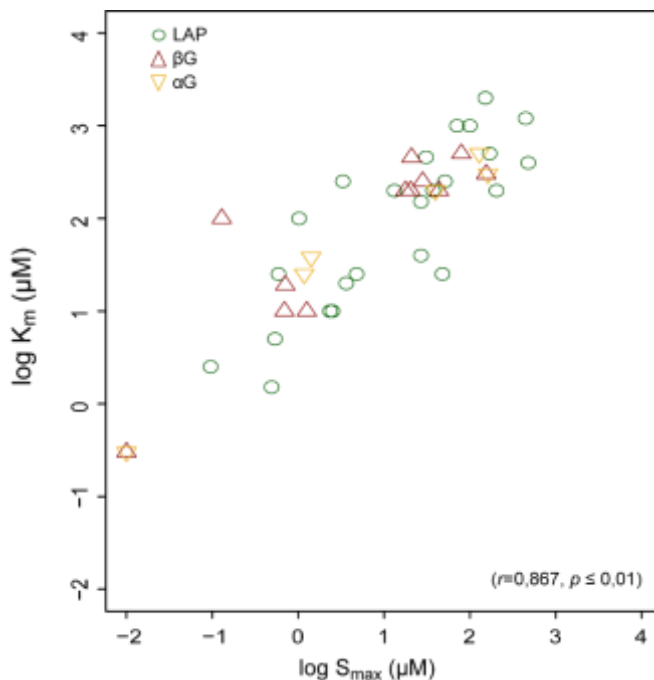


Figura 26: Relación entre los valores de K_m de actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa (círculos verdes), β -D-glucosidasa (triángulos granates) y α -D-glucosidasa (triángulos invertidos amarillos) recopilados en bibliografía (ver **Tabla S1**) y la concentración máxima de sustrato (μM) utilizada en el estudio. En los casos en los que había más de un dato (media o rango), se ha representado el valor medio obtenido. Entre paréntesis se ha indicado el valor del coeficiente de Pearson (r) y la significación estadística (valor de p).

Por todo lo mencionado anteriormente, de cara a estudios que incluyan medidas de actividad enzimática a concentraciones saturantes, consideramos necesaria la realización de un ensayo cinético previo en un rango amplio de concentraciones para detectar la posible existencia de más de un sistema enzimático. Este estudio cinético ayudaría a establecer las concentraciones saturantes del sistema enzimático de alta afinidad y el de baja afinidad, respectivamente. Por último, dada la variabilidad estacional observada en los parámetros cinéticos obtenidos en la estación de Armintza durante el estudio interanual, sería muy conveniente repetir periódicamente el estudio cinético teniendo en cuenta los posibles factores medioambientales que tienen efecto sobre las actividades enzimáticas: formaciones de *bloom*, gradientes tróficos dentro del ecosistema o cambio de masas de agua (p. ej. perfiles de profundidad).

1.2 La relevancia ecológica de los sistemas enzimáticos de alta y baja afinidad

En la estación costera de Arminza, se han detectado de manera continuada dos sistemas enzimáticos con parámetros cinéticos claramente diferenciados: el sistema de alta afinidad, que representa un conjunto de isoenzimas que han maximizado su capacidad de respuesta a bajas concentraciones de sustrato, y el sistema enzimático de baja afinidad, que representa un conjunto de isoenzimas que responden de manera efectiva a altas concentraciones de sustrato. Por tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto los marcados gradientes de concentración de materia orgánica que encuentran las bacterias en el medio marino.

El agua de mar es un medio altamente diluido en sustratos de bajo peso molecular (concentraciones entre μM y nM), donde existen zonas en las que se acumula la materia orgánica, los llamados *hot-spots*, que ofrecen heterogeneidad espacial susceptible de ser colonizada por bacterias y pueden llegar a variar la concentración de sustrato disponible en 2-4 órdenes de magnitud con respecto al agua de mar colindante (Amin *et al.*, 2012; Stocker, 2012). Estos *hot-spots* surgen como consecuencia de diferentes procesos abióticos, como la formación espontánea de geles poliméricos (Verdugo *et al.*, 2004; Verdugo, 2012), y bióticos, entre los que se incluyen las excreciones por parte del zooplancton o la lisis celular (Middelboe *et al.*, 1996; Blackburn *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2002). El fitoplancton también es una importante fuente de materia orgánica, ya que durante su crecimiento secreta una gran variedad de productos extracelulares (Mykkestad, 2000; Thornton, 2014), creando un gradiente de concentración alrededor de la célula llamado ficosfera (Bell y Mitchell, 1972). Asimismo, durante la senescencia del *bloom*, cuando ocurre la lisis de células fitoplanctónicas, se liberan altas concentraciones de materia orgánica intracelular ($\sim\text{mM}$), que superan en 3-6 órdenes de magnitud las del agua colindante ($\sim\text{nM}$). Estas altas concentraciones, además, pueden persistir en el entorno de la célula el tiempo suficiente como para generar una respuesta bacteriana quimiotáctica (Stocker y Seymour, 2012).

En este contexto, y en relación con nuestros resultados, los valores de K_m de baja afinidad de LAP ($\sim 100\text{-}1000 \mu\text{M}$) y de las glucosidasas ($\sim 2\text{-}500 \mu\text{M}$) corresponderían a isoenzimas producidas por aquellas bacterias que habitan y colonizan los *hot-spots* con altas concentraciones de materia orgánica. En cambio, los sistemas de alta afinidad, con valores de K_m de $< 10 \mu\text{M}$ en el caso de LAP y $< 5 \mu\text{M}$ en el de las glucosidasas, reflejarían una adaptación de las bacterias para utilizar eficientemente las

bajas concentraciones de los sustratos poliméricos en la fase líquida. Otros autores también han atribuido las cinéticas multifásicas a la presencia en la muestra natural de poblaciones de microorganismos copiotrofos y oligotrofos (Panikov *et al.*, 1992), o a su modo de vida preferencial, es decir, bacterias asociadas a partículas o de vida libre (Unanue *et al.*, 1999).

En este sentido, el estudio realizado de manera paralela por Uranga *et al.* con técnicas moleculares (Uranga *et al.*, en preparación) puso de manifiesto la presencia en estas muestras de distintos grupos funcionales de bacterias. Por un lado, se identificaron OTUs que se consideraron bacterias especialistas de nicho, ya que estaban asociados exclusivamente al modo de vida libre o adherido a partículas. De acuerdo con nuestros resultados, estas bacterias especialistas podrían estar liberando al medio de manera preferente enzimas de alta afinidad o baja afinidad, respectivamente, en función del nicho ecológico que habitan.

Por otro lado, aunque en menor número, se identificó otro conjunto de OTUs que se consideraron especies generalistas de nicho, y cuyas bacterias, a lo largo del ciclo estacional, se asignaron tanto al modo de vida libre como asociado a partículas. Esta versatilidad funcional podría verse favorecida si estas bacterias generalistas secretaran, tanto enzimas de alta afinidad como de baja afinidad, para poder adaptarse a los marcados gradientes de concentración de materia orgánica que ocurren en el ecosistema (Talbot y Bianchi, 1997; Tholosan *et al.*, 1999). En relación con esta hipótesis, existe evidencia de procesos de intercambio de bacterias entre partículas y el agua colindante en función de las interacciones con factores físicos, biológicos o de disponibilidad de sustrato (Riemann *et al.*, 2000; Gram *et al.*, 2002; Kjørboe *et al.*, 2002).

Los resultados de las cinéticas de las tres actividades enzimáticas estudiadas en este apartado, complementados con la información obtenida de la composición bacteriana mediante técnicas moleculares, parecen indicar que la detección de dos sistemas enzimáticos de distinta afinidad podría deberse a la presencia simultánea de grupos funcionales de bacterias generalistas y especialistas. Basándonos en este conocimiento adquirido, consideramos de alto interés para futuras líneas de trabajo, realizar un estudio cinético comparativo entre cepas especialistas de nicho y cepas generalistas. Además, en el caso de las cepas generalistas de nicho, sería interesante profundizar en la caracterización de la respuesta enzimática en presencia y ausencia de un sustrato sólido.

1.3 Relación entre los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas extracelulares y las variables del ecosistema

Al igual que en trabajos anteriores (Ruan *et al.*, 2006; Steele *et al.*, 2011), el uso del método de *Análisis de Similitud Local* (LSA) permitió encontrar asociaciones desplazadas entre variables; en concreto, se encontraron 22 correlaciones desplazadas, lo que supone un ~35 % del total de asociaciones detectadas. Estos resultados resultan de gran valor para profundizar en las dinámicas de la respuesta enzimática de la comunidad bacteriana con relación a otras variables del ecosistema de Armintza.

1.3.1 Productores primarios

Las correlaciones entre los parámetros cinéticos de las distintas actividades enzimáticas pusieron de manifiesto una correlación positiva y contemporánea entre todas las V_{\max} específicas, lo que sería indicativo de una respuesta enzimática inmediata y conjunta de la comunidad bacteriana en la síntesis y liberación al medio de las enzimas responsables de la hidrólisis de proteínas y carbohidratos. Esta coordinación en la expresión de las enzimas producidas por especies que genéticamente son muy diversas es un factor crítico para la adaptación a los diferentes pulsos de materia orgánica de alto peso molecular (Sinsabaugh *et al.*, 2014). Especialmente, si se tiene en cuenta que, a nivel individual, los microorganismos suelen sintetizar y liberar tan sólo una pequeña fracción de todas las enzimas necesarias para degradar moléculas orgánicas complejas, por lo que rentabilizar la inversión metabólica realizada resulta prioritario (Berkhout *et al.*, 2013; Traving *et al.*, 2015).

Asimismo, las correlaciones entre los parámetros cinéticos y la concentración de clorofila *a* y la densidad celular de cianobacterias evidenciaron que la composición de la comunidad fitoplanctónica está estrechamente relacionada con el conjunto de enzimas extracelulares que secreta la comunidad bacteriana heterótrofa. La correlación positiva entre la concentración de clorofila *a* y la V_{\max} específica de las tres actividades enzimáticas para los dos sistemas enzimáticos indica que el desarrollo del *bloom* de fitoplancton eucariota es el desencadenante de una respuesta por parte de la comunidad bacteriana, que se caracteriza por una mayor capacidad hidrolítica aminopeptidasa y glucosidasa. Por el contrario, la correlación negativa entre las V_{\max} específicas y la densidad de cianobacterias sugiere que la materia orgánica liberada por las cianobacterias conduce a una menor capacidad hidrolítica de la comunidad bacteriana.

Esta respuesta diametralmente opuesta podría ser el reflejo del tipo de materia orgánica que exudan los distintos grupos fitoplanctónicos. Becker *et al.* (2014), en sus experimentos con cepas de diatomeas y cianobacterias, demostraron que aquellas cepas que estaban filogenéticamente más relacionadas tendían a producir una gama de compuestos orgánicos semejantes en cuanto a su composición química, e incluso en abundancias relativas similares. También observaron que los exudados de diatomeas estaban mayormente constituidos por moléculas de alto peso molecular, lo que explicaría la correlación positiva entre la concentración de clorofila *a* y los parámetros cinéticos de las tres actividades enzimáticas.

Además, en el caso de la V_{\max} específica de baja afinidad, la correlación fue más estrecha con las glucosidasas que con leucina aminopeptidasa, lo que concuerda con el hecho de que durante los *blooms* dominados por fitoplancton eucariota se libera materia orgánica enriquecida en carbono con respecto al nitrógeno (Alldredge *et al.*, 1995; Biddanda y Benner, 1997; Wetz y Wheeler, 2007; Cisternas-Novoa *et al.*, 2015; Villacorte *et al.*, 2015). En consonancia con todos estos resultados, Teeling *et al.* (2012 y 2016) detectaron un pico pronunciado en la abundancia de enzimas que actúan sobre carbohidratos (CAZymas) durante el seguimiento de un *bloom* de diatomeas en el mar del Norte; entre ellas, laminarinasas y glucósido hidrolasas (hidrólisis de la laminarina, glucano de almacenamiento en algas pardas) y fucoidasas (hidrólisis de la fucoidina, componente principal de los exopolisacáridos liberados por diatomeas). También detectaron altos niveles de expresión de componentes del sistema de transporte TonB, que permite la toma de sustratos >600-800 Da tales como los oligosacáridos; sin embargo, aquellos sistemas de transporte para sustratos de bajo peso molecular (p. ej. transportadores ABC) se expresaron a niveles bajos.

Por el contrario, la correlación negativa entre la densidad de cianobacterias y los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas sugieren la generación de materia orgánica de bajo peso molecular durante el desarrollo del *bloom*. Aunque existe menos bibliografía al respecto, son diversos los autores que han observado en exudados de cianobacterias una mayor proporción de moléculas carbonatadas de bajo peso molecular (Seymour *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2014), como los ácidos orgánicos (p. ej. glicólico, acético y fórmico), que podrían llegar a constituir hasta un 20 % del carbono orgánico disuelto liberado (Bertilsson *et al.*, 2003). Todos estos hallazgos evidencian un contexto ecológico en el que, durante la formación y ocaso del *bloom* formado por cianobacterias, la inversión energética que supone la síntesis y secreción de enzimas responsables de la hidrólisis de materia orgánica de alto peso molecular no es rentable

debido a la escasez de sustrato, pudiendo comprometer incluso la eficiencia de crecimiento bacteriana debido al coste energético (Wang *et al.*, 2012).

1.3.2 Composición de la comunidad bacteriana

Las variaciones espaciales y temporales de la estructura de la comunidad de fitoplancton van acompañadas de variaciones en la composición de la materia orgánica marina (Becker *et al.*, 2014), que desencadenan a su vez *blooms* secundarios de bacterias en los que tienen lugar sucesiones de distintos clados (Teeling *et al.*, 2012 y 2016). La sustitución de filotipos específicos en la comunidad bacteriana conlleva cambios en la diversidad de las isoenzimas secretadas que afectan a la hidrólisis del sustrato a nivel de comunidad (Arrieta y Herndl, 2002). En este sentido, las correlaciones obtenidas entre los parámetros cinéticos y los grupos filogenéticos más abundantes de la comunidad bacteriana pueden ser interpretadas como un indicador de su capacidad hidrolítica para utilizar de manera exitosa la materia orgánica del ecosistema y proliferar bajo determinadas condiciones medioambientales.

De manera general, las correlaciones obtenidas con el método LSA sugieren que los miembros de *Bacteroidetes* son productores de isoenzimas leucina aminopeptidasa y glucosidasa, lo que les permite aprovechar de manera óptima la materia orgánica disuelta de tipo proteico y carbohidrato. Además, las correlaciones positivas entre este grupo filogenético y las V_{\max} esp y K_m de LAP y α -glucosidasa de baja afinidad, sugieren una optimización de la hidrólisis de sustratos en altas concentraciones. Esta capacidad hidrolítica favorecería la proliferación de *Bacteroidetes* después del desarrollo del *bloom* de fitoplancton eucariota hasta convertirse en el grupo dominante de la comunidad bacteriana durante la época estival (Baña *et al.*, 2020; Uranga *et al.*, en preparación). Nuestros hallazgos van en consonancia con trabajos de otros autores, que asocian a miembros del filo *Bacteroidetes* con partículas orgánicas, predominantes después de *blooms* eucariotas (Riemann *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 2012; Teeling *et al.*, 2012 y 2016) y les adjudican un papel importante en la degradación de la materia orgánica de alto peso molecular debido a su capacidad de sintetizar un gran número de enzimas degradadoras de polímeros, incluyendo glucosidasas y peptidasas (Bidle y Azam, 2001; Kirchman, 2002; Amin *et al.*, 2012; Fernández-Gómez *et al.*, 2013).

En la estación costera de Armintza, el grupo *Gammaproteobacteria* también es relevante en la estructura de la comunidad bacteriana entre finales de primavera y

verano, aunque en menor medida que *Bacteroidetes* (Baña *et al.*, 2020; Uranga *et al.*, en preparación). Los resultados obtenidos de las correlaciones distinguen a los miembros de *Gammaproteobacteria* como productores de enzimas glucosidasa, en detrimento de leucina aminopeptidasa, lo que sugiere una especialización en la utilización de la materia orgánica de alto peso molecular de tipo carbohidrato. Son diversos los trabajos que han descrito la formación de partículas transparentes exopoliméricas por parte de diatomeas (Alldredge *et al.*, 1995; Wetz y Wheeler, 2007; Villacorte *et al.*, 2015), cuya producción alcanza su máximo durante la senescencia del *bloom* (Cisternas-Novoa *et al.*, 2015) y supone la secreción al medio de heteropolisacáridos sulfatados enriquecidos en fucosa y ramnosa (Passow, 2002). Además, cabe mencionar que la senescencia del *bloom* dominado por fitoplancton eucariota coincide con meses de bajas precipitaciones, lo que supone una menor entrada de material alóctono. Esta circunstancia contribuiría a la acumulación de materia orgánica enriquecida en carbono en el ecosistema, lo que favorecería la alta proliferación de grupos productores de enzimas glucosidasa en la comunidad bacteriana durante los meses de verano, como es el caso *Gammaproteobacteria* y, también, de *Bacteroidetes*.

Por último, se analizaron las correlaciones de dos grupos pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*, *Roseobacter* y SAR11. Ambos grupos mostraron capacidades hidrolíticas bien diferenciadas. Por un lado, los resultados obtenidos con *Roseobacter* sugieren que los miembros de este grupo son productores tanto de isoenzimas alta afinidad como de baja afinidad de leucina aminopeptidasa y glucosidasa. Además, en el caso concreto del sistema de alta afinidad de α - y β -glucosidasa, las correlaciones fueron positivas con las V_{\max} esp y negativas con la K_m , lo que evidencia una optimización en la utilización de la materia orgánica de tipo carbohidrato en concentraciones de sustrato bajas. Esta versatilidad funcional explicaría los picos de abundancia de *Roseobacter* entre los meses de febrero y abril, coincidiendo con el *bloom* de fitoplancton eucariota, lo que le permitiría aprovechar los gradientes de concentración de materia orgánica generados durante el *bloom*. De hecho, son varios los trabajos que describen una mayor contribución de *Roseobacter* durante *blooms* primaverales, principalmente formados por diatomeas (Alonso-Gutiérrez *et al.*, 2009; Amin *et al.*, 2012; Teeling *et al.*, 2012 y 2016) y también se ha observado una alternancia entre el nicho ecológico que ocupan, de vida libre y/o adheridos a partículas (Riemann *et al.*, 2000; Moran *et al.*, 2007), capacidad que podría estar favorecida por la posesión de mecanismos de percepción del quorum (Gram *et al.*, 2002).

Por otro lado, y en contraposición a lo descrito anteriormente, las correlaciones negativas entre los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas y SAR11 evidenciaron una limitación en la utilización de la materia orgánica de alto peso molecular. Estos resultados irían en consonancia con el hecho de que los miembros de SAR11 están habitualmente asociados a vida libre, ya que carecen de mecanismos de percepción del quorum para la adherencia a partículas (Giovannoni *et al.*, 2005), y se ha observado que están especializados en la toma de monómeros en bajas concentraciones de sustrato (Alonso y Pernthaler, 2006). De hecho, Fernández-Gómez *et al.* (2013) cuantificaron un número bajo de glucosidasas en el genoma de *Pelagibacter* combinado con un número relativamente alto de peptidasas, aunque menor que el de *Bacteroidetes* marino, lo que pone de manifiesto una menor capacidad metabólica intrínseca para explotar condiciones de riqueza de recursos. Este conjunto de características asociadas a SAR11 explicaría que este grupo filogenético empiece a ser dominante de la comunidad bacteriana en la época de finales de otoño, coincidiendo con el ocaso del *bloom* de cianobacterias.

En consonancia con todos estos resultados, Sarmiento *et al.* (2013), observaron la proliferación de bacterias *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Bacteroidetes* en exudados de algas eucariotas, mientras que apenas se detectaron miembros de grupos como SAR11 y SAR86 (*Alphaproteobacteria*) o NOR5 (*Gammaproteobacteria*) al final del experimento. Los mismos autores, obtuvieron resultados similares al ampliar el experimento e incluir exudados de *Synechococcus* (Sarmiento *et al.*, 2016). De manera interesante, observaron que los miembros de *Bacteroidetes* y *Gammaproteobacteria* estaban más especializados en la degradación de exudados derivados de algas eucariotas; sin embargo, SAR11 estuvo más especializado en el uso de la materia orgánica derivada de *Synechococcus*.

En resumen, los resultados descritos en este apartado indican que la materia orgánica liberada al ecosistema por los distintos grupos fitoplanctónicos actúa como reguladora de la secreción de las enzimas extracelulares estudiadas. En la estación costera de Armintza, el *bloom* primaveral eucariota desencadena un incremento en la disponibilidad de materia orgánica de alto peso molecular, que selecciona a aquellos miembros de la comunidad bacteriana con capacidad para sintetizar isoenzimas que respondan a altas concentraciones de sustrato, entre los que se encuentran *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria* y, de manera esporádica, *Roseobacter*. Por el contrario, el *bloom* de cianobacterias que tiene lugar a finales del verano-principios del otoño, liberaría materia orgánica de bajo peso molecular, que favorece la

proliferación de miembros con una menor capacidad hidrolítica, como es el caso de SAR11.

2. Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano

Los valores de energía de activación (E_a) calculados experimentalmente, pusieron de manifiesto una respuesta positiva de las velocidades de hidrólisis de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina frente a un incremento de la temperatura, tal y como predice la *Teoría Metabólica de la Ecología* (Brown *et al.*, 2004).

La aproximación por el método de "sustitución de espacio por tiempo" permitió calcular las E_a para las actividades β G y LAP; sin embargo, resultó infructuosa en el caso de FA. Por lo tanto, a la luz de los resultados obtenidos, podría concluirse que en aguas de los océanos subtropical y subtropical la temperatura es un factor que influye de manera crítica en las actividades β G y LAP. Si bien es cierto que el análisis realizado con ambas aproximaciones da robustez a los resultados de este estudio, el método de "sustitución de espacio por tiempo" ha demostrado tener ciertas limitaciones para la determinación de la E_a cuando la respuesta al incremento de temperatura no es muy acusada, tal y como sucedió con FA. Esta menor respuesta podría estar indicando que la actividad enzimática FA está más afectada por otras variables como la composición de las comunidades microbianas (Labry *et al.*, 2005; Ivančić *et al.*, 2010; Peacock y Kudela, 2013) o la concentración de sustratos en el medio (Vidal *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2006; Duhamel *et al.*, 2010).

En la "sustitución de espacio por tiempo", la E_a de β G ($0,39 \pm 0,12$ eV) fue mayor que la E_a de LAP ($0,24 \pm 0,08$ eV), lo que pone de manifiesto la diferente sensibilidad a la temperatura en la hidrólisis del material de tipo carbohidrato con respecto al nitrogenado a lo largo de un amplio transecto longitudinal. Cabe resaltar, por un lado, que esta diferencia se ha detectado con independencia de la variabilidad en composición de las comunidades en la zona epipelágica del océano (Sunagawa *et al.*, 2015), lo que probablemente afecta a la producción de enzimas tanto en cantidad como en los tipos de isoenzimas secretadas. Por otro lado, el hecho de encontrar el mismo

patrón de sensibilidad a la temperatura mediante las dos aproximaciones sugiere que los experimentos realizados con tiempos cortos de incubación son lo suficientemente rigurosos como para hacer extrapolaciones a medio y largo plazo. Por último, los resultados obtenidos refuerzan la idea de que, en un escenario de calentamiento global de las aguas superficiales del océano, el efecto de la temperatura sería mayor en la hidrólisis de polisacáridos que en la de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno y fósforo. Esta tendencia generalizada ha sido descrita con anterioridad en muestras de suelos (Koch *et al.*, 2007; Wallenstein *et al.*, 2009) y en un estudio del ecosistema marino en el Ártico (Piontek *et al.*, 2014).

Por otro lado, los experimentos de manipulación de la temperatura permitieron un análisis más detallado de la variabilidad de los valores de E_a de las tres actividades enzimáticas extracelulares a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales del océano. Tanto en la capa de superficie como en aguas del DCM, los valores de E_a siguieron el gradiente decreciente $\beta G > LAP > FA$. En general, los valores de βG y LAP fueron superiores en aguas superficiales en comparación con el DCM, lo que podría explicarse por las distintas comunidades microbianas de la zona fótica (Treusch *et al.*, 2009). Los valores de energía de activación obtenidos en este estudio son inferiores a los obtenidos en trabajos previos realizados en el océano Ártico (Vetter y Deming, 1994; Piontek *et al.*, 2014), donde las enzimas liberadas por las comunidades microbianas fueron particularmente sensibles a los incrementos de temperatura (Vaquer-Sunyer *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la relación de la sensibilidad a la temperatura con la latitud de las estaciones de muestreo, las tres actividades enzimáticas mostraron una relación positiva y similar. Este patrón ya ha sido descrito anteriormente en estudios hechos en suelo, donde las actividades enzimáticas medidas en localizaciones geográficas más frías registraron una mayor respuesta a la temperatura (Somero, 2004; Koch *et al.*, 2007; Dong y Somero, 2009; German *et al.*, 2012). El hecho de que en la zona ecuatorial los valores de E_a de las tres actividades fueran inferiores a pesar de haberse medido velocidades de hidrólisis relativamente altas, podría ser reflejo de una adaptación o aclimatación de las comunidades naturales a altas temperaturas, de tal manera que las enzimas sean menos sensibles a los cambios de temperatura (Wei *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que el calentamiento global está previsto que afecte en mayor grado en altas latitudes y, especialmente, en el hemisferio norte (Collins *et al.*, 2013), el patrón obtenido sugiere que el incremento de la temperatura en aguas superficiales tendría un efecto más pronunciado en las regiones árticas con respecto a la zona ecuatorial.

La diferente sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas extracelulares estudiadas podría tener importantes consecuencias en un contexto ecológico de calentamiento global. Sin considerar los probables cambios que se generen en la producción neta de enzimas, los resultados de este trabajo predicen que, en aguas superficiales del océano, donde tiene lugar la mayor producción y liberación de materia orgánica fresca por parte de los productores primarios, el incremento de temperatura generará una respuesta de distinta magnitud en la velocidad de hidrólisis de los diferentes componentes de la materia orgánica disuelta de alto peso molecular.

Las proyecciones sobre la estequiometría de la materia orgánica de bajo peso molecular liberada en escenarios teóricos de calentamiento de las aguas superficiales predicen que, en comparación con la situación actual, se liberarán productos con un mayor contenido en carbono con respecto al nitrógeno y, particularmente, en comparación con el fósforo, afectando así a la ratio estequiométrica C:N:P. En concreto, nuestros resultados predijeron un incremento de la ratio C:N y, especialmente, incrementos en las ratios molares C:P (1,2 % en superficie y 0,8 % en DCM) y N:P (0,6 % en superficie y 1,0 en DCM) por cada grado que aumenta la temperatura. Esta diferencia en apariencia insignificante se vería multiplicada en la espiral de los ciclos bioquímicos de producción y remineralización de la materia orgánica, proceso que ocurre a mayor velocidad en el océano subtropical (Dore *et al.*, 2008).

En un escenario de reducción de la entrada de nutrientes en aguas superficiales debido a la acentuación de la termoclina (Sarmiento *et al.*, 2004), una desigual remineralización de nutrientes por parte de las comunidades bacterianas limitaría aun más la concentración de fosfato inorgánico en comparación con el carbono y el nitrógeno. Teniendo en cuenta además un posible exceso de carbono inorgánico debido a la profusa liberación de CO₂ (Riebesell, 2004), que el nitrógeno reactivo puede ser fijado a partir del N₂ atmosférico y que también se han detectado incrementos de su concentración debido a la actividad antropogénica (Duce *et al.*, 2008), todos los indicios apuntan hacia un océano cada vez más empobrecido en fósforo y, por lo tanto, cada vez más oligotrófico.

Además, esta tendencia podría verse exacerbada por la posible disminución del contenido en N y P de la materia orgánica liberada por los productores primarios. Experimentos realizados en mesocosmos han demostrado que el incremento de la temperatura induce un aumento en la liberación de carbono orgánico disuelto frente al nitrógeno orgánico disuelto (Engel *et al.*, 2011; Taucher *et al.*, 2012; Biermann *et al.*, 2014). En la misma línea, Wohlers-Zöllner *et al.* (2011) también observaron la

acumulación de carbono orgánico disuelto durante el crecimiento de una comunidad planctónica mixta en condiciones de limitación de nitrógeno al aumentar la temperatura. Adicionalmente, también se ha observado una relación directa y positiva entre la temperatura y la relación C:P y N:P en cianobacterias (Levitan *et al.*, 2010) y de la ratio molar C:N en diatomeas (Berges *et al.*, 2002), lo que presumiblemente conllevaría alteraciones similares en la composición de los productos de exudación. Por último, la expansión de las regiones oligotróficas en aguas superficiales del océano debido al calentamiento global (Sarmiento *et al.*, 2004), podría favorecer el aumento de la abundancia de los productores primarios de pequeño tamaño (procariotas) frente a los de mayor tamaño (eucariotas) (Morán *et al.*, 2010; Martiny *et al.*, 2013).

En relación con este hallazgo, Martiny *et al.* (2013) determinaron que la composición estequiométrica de las cianobacterias se caracteriza por una ratio C:N:P muy superior al de diatomeas (235:35:1 para *Prochlorococcus*, 161:25:1 para *Synechococcus* y 107:16:1 para diatomeas). Si se asume una relación directa entre la composición de la materia orgánica liberada y el organismo productor de la misma (Thornton, 2014), la ratio estequiométrica de las cianobacterias indicaría que en un escenario futuro en el que fueran más abundantes, predominaría la liberación de sustratos orgánicos carbonatados y empobrecidos en nitrógeno y en fósforo. En este contexto, el hecho de que los productos de hidrólisis también estén enriquecidos en carbono, no haría más que acentuar el cambio de composición de las comunidades fitoplanctónicas hacia el dominio de las picocianobacterias.

No obstante, hay que tener en consideración la capacidad de las comunidades microbianas para adaptarse a los posibles desequilibrios en la ratio C:N:P de la materia orgánica disponible (Mooshammer *et al.*, 2014), mediante mecanismos como el aumento de la producción de fosfatasa alcalina extracelular (Vidal *et al.*, 2003), la reducción de la demanda celular en N y P (Bertilsson *et al.*, 2003; Levitan *et al.*, 2010) o incluso la regulación de la eficiencia de los nutrientes utilizados (del Giorgio y Cole, 1998).

En resumen, la mayor sensibilidad a la temperatura observada en las enzimas extracelulares que llevan a cabo la hidrólisis de material orgánico de tipo carbohidrato, en comparación con aquellos responsables de la liberación de nitrógeno y fósforo, provocará una alteración en la proporción de nutrientes que son remineralizados. Esta tendencia será especialmente notoria en el caso del fósforo, lo que exacerbaría la tendencia ampliamente descrita hacia una oligotrofización del océano en un contexto de calentamiento global. Nuestros resultados sugieren que se desencadenará un

incremento de las velocidades de hidrólisis de la materia orgánica junto con un aumento de las ratios molares C:P y C:N de los productos liberados por la actividad enzimática. La consiguiente limitación de nutrientes puede provocar una cascada de efectos en procesos clave del ecosistema superficial marino, como la respiración microbiana (López-Urrutia *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2008), las tasas de crecimiento (Degerman *et al.*, 2013), la eficiencia de crecimiento bacteriana (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007) y la composición de la comunidad microbiana (Degerman *et al.*, 2013), ya de por sí alterados por el incremento de temperatura. Considerando en conjunto todo lo mencionado anteriormente, los resultados de este estudio permiten entrever, en un contexto de calentamiento global, un océano más oligotrófico dominado por cianobacterias y una ralentización de la bomba biológica.

3. La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo

En este trabajo se ha analizado comparativamente la actividad leucina aminopeptidasa en muestras de las zonas epipelágica (superficie y DCM) y batipelágica de la columna de agua, recogidas en 89 estaciones repartidas en los océanos Atlántico (norte, central y sur), Índico y Pacífico (norte y sur).

En el análisis de los datos se observó que la actividad leucina aminopeptidasa fue dos veces superior en la zona epipelágica del océano con respecto a la batipelágica, resultados acordes con los de estudios realizados en áreas más restringidas del Océano Atlántico (Baltar *et al.*, 2009 y 2010), la región de afloramiento del Mar Arábigo (Hoppe y Ullrich, 1999) o en el Mar Mediterráneo (Tamburini *et al.*, 2002 y 2009). Cabe resaltar, además, que esta tendencia se detectó en todas las estaciones de muestreo analizadas, con independencia de la presumible variabilidad en factores como el origen, tipo y concentración de la materia orgánica disponible (Hansell 2013; Benner y Amon, 2015) o la composición de las comunidades de procariotas de las zonas epi- y batipelágica (Cram *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2016; Mestre *et al.*, 2018; Bergauer *et al.*, 2018; Salazar *et al.*, 2019; Ruiz-González *et al.*, 2020). El hecho de que la velocidad de hidrólisis descienda solamente a la mitad resulta sorprendente, en tanto que otras variables medidas durante la misma expedición, como la densidad celular y la producción heterótrofa procariota descienden entre 1-3 órdenes de magnitud desde la zona epipelágica hasta la zona batipelágica (p. ej. Lønborg *et al.*, 2016; Ruiz-González *et al.*, 2020), descensos dentro de la magnitud de los descritos por otros autores (Hoppe

y Ullrich, 1999; Nagata *et al.*, 2000; Arístegui *et al.*, 2009; Nagata *et al.*, 2010 y referencias en este documento).

En lo que respecta al análisis comparativo de los parámetros cinéticos, se observaron, por un lado, valores superiores de eficiencia catalítica en aguas superficiales y, por otro lado, una escasa variabilidad de los valores de la K_m (357-457 μM) para las tres profundidades analizadas, resultados que fueron inesperados. En contraposición a la zona eufótica, donde existe una amplia disponibilidad de materia orgánica utilizable (Benner y Amon, 2015), la zona batipelágica del océano se caracteriza por albergar materia orgánica refractaria (Jiao *et al.*, 2010) y formada por una gran variedad de pequeñas moléculas (<700 Da) presentes en concentraciones muy bajas, lo que hace que la inversión energética necesaria para su captación y degradación no sea rentable para la microbiota (Arrieta *et al.*, 2015; Zark *et al.*, 2017; Zark y Dittmar, 2018). Bajo esta premisa, cabría esperar un descenso de los valores de la K_m con la profundidad y un aumento de la eficiencia catalítica (Azúa *et al.*, 2003) como consecuencia de la secreción de enzimas adaptadas a bajas concentraciones de materia orgánica proteica de alto peso molecular por parte de las comunidades bacterianas endémicas. Baltar *et al.* (2009 y 2010) también observaron valores muy elevados de la K_m de leucina aminopeptidasa en aguas profundas del océano Atlántico, llegando a alcanzar valores de $\sim 1200 \mu\text{M}$, resultados que contribuyen a reforzar los hallazgos de nuestro estudio.

Esta aparente contradicción en las muestras de aguas profundas entre el valor de los parámetros cinéticos y la concentración de sustrato disponible permite sugerir que el origen de las enzimas extracelulares pudiera ser la zona eufótica del océano. El hecho de haber encontrado una correlación positiva entre las distintas variables enzimáticas de las zonas epi- y batipelágicas del océano, a pesar de la distancia vertical de 3000-4000 m que las separa y del contexto ecológico tan diferenciado que las caracteriza (Nagata *et al.*, 2010 y referencias en este documento), confirma la conectividad existente entre ambas zonas de la columna de agua.

En relación con esta idea, el incremento experimental de la temperatura en las muestras de fondo puso de manifiesto, para el rango de temperatura ensayado (2-28 °C), un descenso de los valores de la K_m y un aumento de la eficiencia catalítica, de manera que el patrón de variación detectado fue similar para las enzimas de las comunidades bacterianas de las zonas epi- y batipelágica.

Dado que en la zona batipelágica del océano se puede presuponer la existencia de una comunidad microbiana eminentemente psicrófila, la evolución observada en los

parámetros cinéticos de las muestras de aguas profundas fue un resultado inesperado, por ser característica de las enzimas de microorganismos mesófilos (Feller y Gerday, 2003 y referencias en este documento). Según estudios realizados con bacterias en laboratorio (D'Amico *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2008; Poli *et al.*, 2017 y referencias en este documento), los microorganismos psicrófilos han adaptado su fisiología para sintetizar enzimas activas a bajas temperaturas mediante la desestabilización del sitio activo o de toda la proteína. En consecuencia, el centro catalítico es más flexible, lo que permite optimizar la afinidad por el sustrato y la eficiencia catalítica a temperaturas cercanas a la *in situ* (Lonhienne *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003; Williams *et al.*, 2011; Joshi y Satyanarayana, 2013). Desde este punto de vista, si las enzimas detectadas en muestras de la zona batipelágica procedieran de una microbiota estrictamente psicrófila, deberíamos haber encontrado un descenso en la afinidad por el sustrato (i.e., incremento de los valores de K_m) conforme aumentaba la temperatura experimental, en contraposición al comportamiento de las enzimas de los microorganismos mesófilos de las muestras de superficie.

El hecho de asumir que una fracción de las enzimas liberadas en la zona eufótica puedan ser exportadas a grandes profundidades plantea de manera inevitable la cuestión de si son capaces de permanecer estables y activas después de este proceso de transporte. A este respecto, los experimentos de estabilidad realizados indicaron que la vida media de las enzimas leucina aminopeptidasa de aguas oceánicas superficiales variaba entre los 9 y 35 días. Estos valores no son sustancialmente distintos a los obtenidos por otros autores en los escasos estudios realizados en otros sistemas marinos. Así, en aguas del Mar Adriático, Bozdansky *et al.* (1995) observaron que **alrededor del 70 % de la actividad disuelta inicial de α - y β -glucosidasa persistía** después de 22 h de incubación, mientras que Li *et al.* (1998) observaron en muestras del Mar Rojo que la actividad disuelta de fosfatasa alcalina se mantenía estable a lo largo de 40 días de incubación. Más recientemente, Steen y Arnosti (2011), en experimentos con agua superficial del Océano Ártico, observaron una vida media del **orden de cientos de horas en aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y β -glucosidasa**, en tanto que Baltar *et al.* (2013) calcularon un tiempo de hasta 3 días en fosfatasa alcalina y α - y β -glucosidasa en aguas del Océano Atlántico, y Thomson *et al.* (2019), determinaron un tiempo de 41 días para fosfatasa alcalina en aguas del Océano Pacífico. Por tanto, pese a la variabilidad existente en la bibliografía, es evidente que la actividad de las enzimas disueltas puede prolongarse por un período de varios días o incluso semanas.

En relación con la estabilidad de las enzimas disueltas, son varios los factores que pueden tener un efecto sobre su vida media y entre los principales está la temperatura (Arnosti, 2011; Baltar, 2018). En este trabajo, no se observó una prolongación de la vida media de las enzimas disueltas aminopeptidasa cuando las muestras de superficie se incubaron a temperaturas bajas (2-4 °C). En los escasos estudios realizados hasta la fecha, Baltar *et al.* (2013) observaron una relación inversa entre la temperatura y la vida media de las enzimas glucosidasa, mientras que observaron una relación directa con la vida media de fosfatasa alcalina, resultados que posteriormente corroboraron Thomson *et al.* (2017). A la luz de esta disparidad, parece evidente la necesidad de seguir trabajando en un futuro para resolver si hay un efecto diferencial de la temperatura en la vida media de las enzimas disueltas en función de la actividad enzimática y cuál es su magnitud.

La exportación de enzimas extracelulares al océano profundo relacionada con agregados de materia orgánica ya había sido planteada por otros autores en relación con los altos niveles de actividad enzimática en aguas profundas del Océano Pacífico (Koike y Nagata, 1997) y del Océano Índico (Hoppe y Ullrich, 1999). En consonancia con esta idea, en los agregados se han observado grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares (Bochdansky *et al.*, 2016; Flintrop *et al.*, 2018), que conforman una matriz polimérica en la que las enzimas pueden quedar atrapadas, lo que favorece la retención de la actividad hidrolítica (Ziervogel *et al.*, 2007 y 2010) y las confiere de cierta resistencia a la degradación (Nagata y Kirchman, 1992; Lozzi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2001). Estas evidencias, permiten sugerir que la adsorción a los agregados podría favorecer el transporte vertical de enzimas al océano profundo, en especial si el tiempo de residencia de los agregados en la zona eufótica es bajo. En relación con esto último, estudios recientes han determinado que entre ~10 % y hasta un 43 % de la materia orgánica que es exportada llega a la zona batipelágica del océano a los pocos días de salir de la zona eufótica (Stukel *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2018; Huffard *et al.*, 2020), resultados que concuerdan con la presencia constante de picocianobacterias y microalgas (Agustí *et al.*, 2015; Preston *et al.*, 2020; Boeuf *et al.*, 2019) y pellets fecales de zooplancton (Preston *et al.*, 2020, Huffard *et al.*, 2020; Lopez *et al.*, 2020) en la zona batipelágica del océano.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la exportación y posterior fraccionamiento y disolución de agregados en la zona batipelágica podría liberar enzimas extracelulares recientemente originadas en aguas superficiales y que, de acuerdo con nuestros experimentos de estabilidad, seguirían manteniendo la capacidad hidrolítica, ya que la inmovilización no afecta de manera irreversible a su

conformación original (Gopinath y Sugunan, 2006 y 2007). En nuestro estudio, entre un 90-100 % de la actividad total de leucina aminopeptidasa medida en aguas profundas correspondió a la fracción disuelta en los tres océanos analizados, resultados que corroboran los de trabajos anteriores (Baltar *et al.*, 2010 y 2013). Es plausible que la difusión de las enzimas a partir de los agregados sea uno de los motivos por los cuales se detecta una contribución tan alta de la fracción disuelta a la actividad total de leucina aminopeptidasa en el océano profundo.

Por último, se realizó una aproximación teórica de cuánta de la actividad enzimática generada en aguas superficiales podría llegar a la zona batipelágica mediante el transporte vertical de enzimas adsorbidas a agregados de materia orgánica. Para realizar el cálculo, se utilizaron los datos de V_{sat} de la fracción disuelta medidos en superficie a lo largo de la campaña oceanográfica y, a continuación, se establecieron las siguientes dos premisas. Por un lado, se asumió una capacidad de adsorción de las enzimas a agregados del 90 % basándonos en los resultados obtenidos por Ziervogel *et al.* (2007) después de 2 h de incubación. Por otro lado, se asumió que entre un 50 y 80 % de carbono orgánico particulado es exportado desde la zona eufótica al océano profundo (Gardner, 1997; Boyd *et al.*, 2019) y que entre un promedio de 27 % (Stukel *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2018; Huffard *et al.*, 2020) y hasta un 80 % (Carlson y Hansell, 2015) de esa exportación puede llegar a grandes profundidades. A continuación, se aplicaron las tasas de inactivación calculadas en cada océano a partir de los experimentos de estabilidad, como representativas de la pérdida de actividad causada por procesos abióticos. Por último, se aplicó el valor medio de $428 \text{ m}\cdot\text{d}^{-1}$ de velocidad de transporte vertical de partículas calculado por Agustí *et al.* (2015) durante la misma expedición.

La aproximación teórica realizada determinó que entre un $4,0 \pm 0,2 \text{ nM}\cdot\text{h}^{-1}$ y $18,8 \pm 0,8 \text{ nM}\cdot\text{h}^{-1}$ de la velocidad de hidrólisis en aguas batipelágicas podría tener su origen en enzimas extracelulares asociadas a la materia orgánica particulada proveniente de la zona eufótica (**Figura 32**), lo que significa que al menos entre un promedio de entre 10-55 % de la actividad de leucina aminopeptidasa del océano profundo podría explicarse por el transporte vertical de enzimas. Estos datos desvelan un aspecto importante del funcionamiento de la bomba microbiana en el océano profundo, ya que evidencian un desacoplamiento entre el lugar y/o momento en el que las enzimas extracelulares han sido producidas y aquél en el que potencialmente pueden seguir llevando a cabo su actividad (Wetzel, 1991).

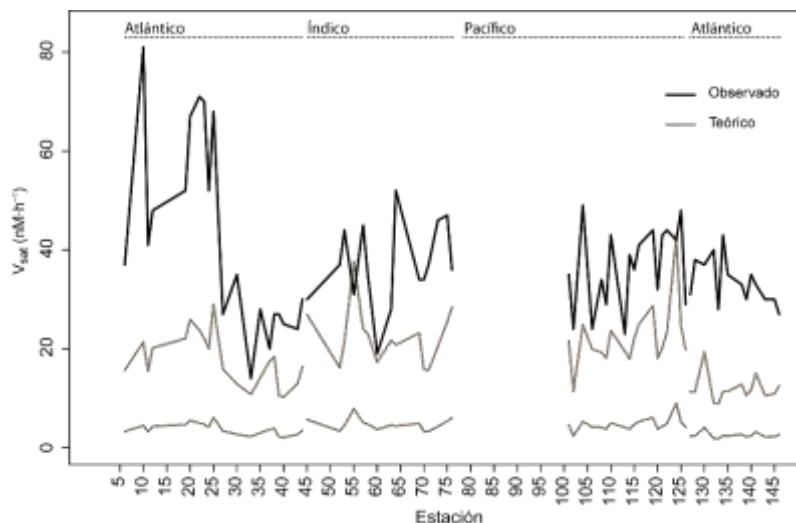


Figura 32: Representación de la aproximación teórica realizada en base a la vida media de las enzimas de leucina aminopeptidasa y de las velocidades de sedimentación de partículas calculados durante la *Expedición de Circunnavegación Malaspina 2010*. En negro se ha representado la velocidad de hidrólisis medida en las muestras de la zona batipelágica y en gris los datos correspondientes al valor mínimo y máximo de la velocidad de hidrólisis teórica calculada.

Una vez liberadas en la zona batipelágica, la capacidad hidrolítica de las enzimas estaría limitada por la probabilidad de encuentro con el sustrato. Dado que la composición de la materia orgánica disuelta del océano profundo es baja en labilidad (Jiao *et al.*, 2010) y está en concentraciones limitantes (Arrieta *et al.*, 2015; Zark *et al.*, 2017; Zark & Dittmar, 2018), sería la materia orgánica remanente de los agregados a los que estaban adsorbidas la principal fuente de sustrato. A este respecto, se ha demostrado que la exportación de agregados de fitoplancton está relacionada con la detección continua de proteínas por debajo de 2000 m en el mar de los Sargazos (Cisternas-Novoa *et al.*, 2015) y con el hecho de que < 30 % del carbono orgánico disuelto en aguas profundas del Océano Pacífico sea de producción reciente (Follet *et al.*, 2014).

Por tanto, en el océano profundo, la actividad de las enzimas leucina aminopeptidasa provenientes de la zona eufótica podría liberar de manera permanente aminoácidos y complementar así la actividad de las comunidades endémicas. Esta contribución sería un importante aporte para satisfacer la demanda metabólica de las comunidades batipelágicas, dado que la secreción de enzimas es un proceso energéticamente costoso a nivel individual en un entorno en el que las tasas de crecimiento están restringidas debido a la limitación de sustratos (Jannasch, 1967; Arrieta *et al.*, 2015; Traving *et al.*, 2015). Asimismo, la formación de materia orgánica en el océano oscuro se restringe a

los procesos quimioautótrofos llevados a cabo por las bacterias y arqueas (Swan *et al.*, 2011; Herndl *et al.*, 2005), por lo que las enzimas exportadas (Arnosti, 2011) junto con la materia orgánica de los agregados que ha persistido al transporte vertical serían una fuente de sustrato lábil en comparación con la existente en la zona batipelágica que puede llegar a estimular la producción secundaria (Carlson *et al.*, 2011; Severin *et al.*, 2016). De hecho, estudios recientes han determinado que las comunidades del océano profundo dependen esencialmente de la solubilización de la materia orgánica particulada que sedimenta en las profundidades oceánicas (Bergauer *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020), aporte que les proporcionaría la energía necesaria para secretar enzimas capaces de degradar materia orgánica recalcitrante (Guenet *et al.*, 2010).

En la aproximación teórica no se ha incluido el efecto de la presión hidrostática, factor que es indudablemente relevante en aguas profundas del océano. Si bien es cierto que se han visto diferencias en las medidas de actividad enzimática realizadas en la zona batipelágica en condiciones *in situ* y en descompresión (Tamburini *et al.*, 2013), estudios realizados con proteínas han demostrado que incluso en tratamientos de 100-500 MPa se mantenía la hidrólisis enzimática (Stapelfeldt *et al.*, 1996; De Maria *et al.*, 2017). No obstante, sería interesante ampliar el conocimiento a este respecto en futuras investigaciones.

Por último, en este estudio solamente se han considerado los agregados de materia orgánica particulada como vector de exportación de enzimas adheridas. Sin embargo, otros procesos como la mezcla de masas de agua, el transporte lateral y/o migración vertical del zooplankton también son mecanismos potenciales de conexión hidrolítica entre distintas zonas de la columna de agua (Burd *et al.*, 2010), tal y como se ha demostrado en la composición de las comunidades microbianas (Wilkins *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015; Frank *et al.*, 2016; Luna *et al.*, 2016; Severin *et al.*, 2016; Mestre *et al.*, 2018; Ruiz-González *et al.*, 2020). En relación con esto, los procariotas de las comunidades de aguas superficiales que son diseminados en el fondo del océano podrían ser productores de enzimas y contribuir a la actividad leucina aminopeptidasa que se detecta en aguas profundas; no obstante, todavía se desconoce si son capaces de adaptarse y mantenerse activos a nivel fisiológico o si, por el contrario, pasan a formar parte del *seed bank* del océano oscuro.

En resumen, este estudio ha contribuido a aumentar el conocimiento sobre la actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa en las zonas subtropical y tropical de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. En particular, es destacable el valor añadido de la ganancia en conocimiento del océano profundo, ya que ha sido escasamente

estudiado debido a la dificultad de muestreo y al gasto económico que implica, a pesar de la evidencia emergente de su importancia en la biogeoquímica del océano y como almacén de una alta diversidad microbiana genética y metabólica (Arístegui *et al.*, 2009).

Consideramos que observar valores de K_m similares en muestras de aguas superficiales y profundas, comparables a los obtenidos en agregados de materia orgánica, un efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos asociado al esperable en enzimas de microorganismos mesófilos en muestras del océano profundo y la correlación positiva entre las distintas variables enzimáticas entre las zonas epi- y batipelágicas apoyan la hipótesis de una conectividad entre ambas zonas de la columna de agua. Esta conectividad estaría mediada por el transporte vertical de las enzimas disueltas adheridas a los agregados de materia orgánica particulada que se originan en la zona eufótica del océano y que se liberarían en la zona batipelágica debido al fraccionamiento y disolución de los agregados manteniendo aún su capacidad hidrolítica.

La aproximación teórica realizada con los resultados generados en este estudio y complementados con la información descrita en bibliografía permitieron establecer que al menos entre un 5-30 % de la actividad leucina aminopeptidasa medida en la zona batipelágica podría ser consecuencia de dicho proceso de transporte vertical. La liberación de aminoácidos por parte de las enzimas exportadas podría estar contribuyendo a satisfacer una fracción de los requerimientos metabólicos de las comunidades del océano profundo en un entorno de limitado acceso al sustrato y servir, al mismo tiempo, de fuente de carbono y nitrógeno.

6



CONCLUSIONES

De los estudios realizados en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones principales:

Dinámicas temporales de los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa, β - y α -glucosidasa en aguas superficiales costeras

1. El modelo que mejor describió las cinéticas de las actividades enzimáticas leucina aminopeptidasa y β - y α -glucosidasa a lo largo de tres anualidades en aguas costeras de Bizkaia es un modelo multifásico, que refleja la actividad simultánea de un sistema enzimático de alta afinidad y de baja afinidad.
2. Estos hallazgos evidencian la importancia de incluir modelos complejos para identificar la diversidad y heterogeneidad de las enzimas presentes en aguas superficiales marinas en futuros trabajos que incluyan medidas enzimáticas, tanto en aquellos que sean exclusivamente sobre cinéticas como en los que se realice un estudio cinético previo de cara a utilizar concentraciones saturantes.
3. Los valores de K_m del sistema enzimático de alta afinidad coinciden con las concentraciones de sustrato descritas para la fase líquida del agua de mar, mientras que los valores de K_m del sistema de baja afinidad se asemejan a las altas concentraciones de sustrato que se han descrito en los agregados de materia orgánica. Estos resultados, unidos con el análisis filogenético realizado en otros trabajos, apuntan hacia la coexistencia de grupos funcionales de bacterias generalistas y especialistas de nicho.
4. El desarrollo del *bloom* primaveral, dominado por fitoplancton eucariota, desencadena un incremento en la disponibilidad de materia orgánica de alto peso molecular y favorece la secreción de isoenzimas optimizadas a altas concentraciones de sustrato. Por el contrario, el *bloom* dominado por cianobacterias y que tiene lugar entre finales de verano y otoño, parece liberar principalmente materia orgánica de bajo peso molecular, a la luz de la correlación negativa entre los parámetros cinéticos de las actividades enzimáticas y la abundancia de cianobacterias.
5. En estrecha relación con lo anterior, se observó que los miembros pertenecientes a *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria* y, en menor medida,

Roseobacter secretan isoenzimas optimizadas a altas concentraciones de sustrato, lo que les permite proliferar durante el *bloom* primaveral. En cambio, el ocaso del *bloom* de cianobacterias favorece la aparición de bacterias pertenecientes a SAR11 debido a su menor capacidad hidrolítica.

Diferencias en la sensibilidad a la temperatura de las actividades enzimáticas β -glucosidasa, leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en aguas superficiales del océano

6. El análisis de la sensibilidad a la temperatura puso de manifiesto una respuesta diferenciada de las tres actividades enzimáticas, estableciendo el siguiente **gradiente**: β -glucosidasa fue la actividad con mayor sensibilidad a la temperatura, seguida de leucina aminopeptidasa y, por último, fosfatasa alcalina.
7. La mayor sensibilidad a la temperatura de las enzimas responsables de la hidrólisis de material orgánico de tipo carbohidrato nos lleva a predecir, en posibles escenarios de entre 1-4 °C de calentamiento de las aguas superficiales, un enriquecimiento en carbono de la materia orgánica de bajo peso molecular, en detrimento del nitrógeno y, especialmente, del fósforo. En consecuencia, la expansión de las áreas oligotróficas del océano se vería exacerbada, en retroalimentación con cambios en otros procesos microbianos, lo que finalmente llevaría a una ralentización de la bomba microbiana.
8. La estrecha relación entre la energía de activación de las tres actividades enzimáticas y la latitud evidenció que el incremento de la temperatura en aguas superficiales será más acusado en las regiones cercanas a los polos geográficos con respecto a la zona ecuatorial.

La exportación de enzimas modela la actividad leucina aminopeptidasa del océano profundo

9. La actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa de las aguas profundas de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico está estrechamente relacionada con la actividad de aguas superficiales, lo que pone de manifiesto una conectividad funcional entre ambas zonas de la columna de agua, reflejo

del aporte continuo de agregados orgánicos procedentes de aguas superficiales, tal y como explica la bomba biológica de carbono.

10. Los enzimas leucina aminopeptidasa de la zona batipelágica presentan valores de K_m similares a los de la zona epipelágica. Teniendo en cuenta la incuestionable diferencia en la cantidad y calidad nutricional de ambas zonas, la similitud en los valores de K_m solo puede ser explicada por el transporte vertical de enzimas procedentes de superficie y asociadas a agregados orgánicos.
11. Los enzimas leucina aminopeptidasa de la zona batipelágica muestran una respuesta frente a la temperatura similar a los enzimas de superficie y típicamente asociada a la de enzimas de microorganismos mesófilos, lo que no se corresponde con enzimas sintetizados por las comunidades batipelágicas. Estos resultados confirman que los enzimas leucina aminopeptidasa de la zona batipelágica tienen fundamentalmente su origen en aguas de superficie.
12. La aproximación teórica llevada a cabo demostró que al menos entre un 10-55 % de la actividad medida en la zona batipelágica podría ser consecuencia de la exportación mediada por la sedimentación de agregados, lo que contribuye a explicar la alta contribución de la fracción disuelta a la actividad total en aguas profundas.



7



BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ, S., GONZÁLEZ-GORDILLO, J. I., VAQUÉ, D., ESTRADA, M., CEREZO, M. I., SALAZAR, G., . . . DUARTE, C. M. (2015). UBIQUITOUS HEALTHY DIATOMS IN THE DEEP SEA CONFIRM DEEP CARBON INJECTION BY THE BIOLOGICAL PUMP. *NATURE COMMUNICATIONS*, 6, 7608. doi:10.1038/ncomms8608
- ALDERKAMP, A. C., VAN RIJSEL, M., & BOLHUIS, H. (2007). CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA AND THE ACTIVITY OF THEIR ENZYME SYSTEMS INVOLVED IN DEGRADATION OF THE ALGAL STORAGE GLUCAN LAMINARIN. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 59, 108–117. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00219.x
- ALLDREDGE, A. L., GOTSCHALK, C., PASSOW, U., & RIEBESELL, U. (1995). MASS AGGREGATION OF DIATOM BLOOMS: INSIGHTS FROM A MESOCOSM STUDY. *DEEP-SEA RESEARCH PART II*, 42, 9–27. doi:10.1016/0967-0645(95)00002-8
- ALLISON, S. D., CHAO, Y., FARRARA, J. D., HATOSY, S., & MARTINY, A. C. (2012). FINE-SCALE TEMPORAL VARIATION IN MARINE EXTRACELLULAR ENZYMES OF COASTAL SOUTHERN CALIFORNIA. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 3, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00301
- ALONSO, C., & PERNTHALER, J. (2006). CONCENTRATION-DEPENDENT PATTERNS OF LEUCINE INCORPORATION BY COASTAL PICOPANKTON. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72, 2141–2147. doi:10.1128/AEM.72.3.2141-2147.2006
- ALONSO-GUTIÉRREZ, J., LEKUNBERRI, I., TEIRA, E., GASOL, J. M., FIGUERAS, A., & NOVOA, B. (2009). BACTERIOPANKTON COMPOSITION OF THE COASTAL UPWELLING SYSTEM OF 'RÍA DE VIGO', NW SPAIN. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 70, 493–505. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00766.x
- ALUWIHARE, L. I., & REPETA, D. J. (1999). A COMPARISON OF THE CHEMICAL CHARACTERISTICS OF OCEANIC DOM AND EXTRACELLULAR DOM PRODUCED BY MARINE ALGAE. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 186, 105–117. doi:10.3354/meps186105
- AMANN, R. I., BINDER, B. J., OLSON, R. J., CHISHOLM, S. W., DEVEREUX, R., & STAHL, D. A. (1990). COMBINATION OF 16S rRNA-TARGETED OLIGONUCLEOTIDE PROBES WITH FLOW CYTOMETRY FOR ANALYZING MIXED MICROBIAL POPULATIONS. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 56, 1919–1925. OBTENIDO DE [HTTP://WWW.PUBMEDCENTRAL.NIH.GOV/ARTICLERENDER.FCgi?ARTID=184531&TOOL=PMCENTREZ&RENDE](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract) RTYPE=ABSTRACT
- AMIN, S. A., PARKER, M. S., & ARMBRUST, V. E. (2012). INTERACTIONS BETWEEN DIATOMS AND BACTERIA. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR ...*, 76, 667–684. doi:10.1128/MMBR.00007-12
- AMON, R. M., & BENNER, R. (1996). BACTERIAL UTILIZATION OF DIFFERENT SIZE CLASSES OF DISSOLVED ORGANIC MATTER. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 41, 41–51.
- APPLE, J. K., DEL GIORGIO, P. A., & KEMP, W. (2006). TEMPERATURE REGULATION OF BACTERIAL PRODUCTION, RESPIRATION, AND GROWTH EFFICIENCY IN A TEMPERATE SALT-MARSH ESTUARY. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 43, 243–254. doi:10.3354/AME043243
- 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, 1501–1529. doi:10.4319/LO.2009.54.5.1501
- ARNOSTI, C. (2000). SUBSTRATE SPECIFICITY IN POLYSACCHARIDE HYDROLYSIS: CONTRASTS BETWEEN BOTTOM WATER AND SEDIMENTS. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 45, 1112–1119. doi:10.4319/LO.2000.45.5.1112

- ARNOSTI, C. (2003). MICROBIAL EXTRACELLULAR ENZYMES AND THEIR ROLE IN DISSOLVED ORGANIC MATTER CYCLING. EN S. E. FINDLAY, & R. L. SINSABAUGH (EDITS.), *AQUATIC ECOSYSTEMS* (PÁGS. 315–342). BURLINGTON: ACADEMIC PRESS. DOI:10.1016/B978-012256371-3/50014-7
- ARNOSTI, C. (2011). MICROBIAL EXTRACELLULAR ENZYMES AND THE MARINE CARBON CYCLE. *ANNUAL REVIEW OF MARINE SCIENCE*, 3, 401–425. DOI:10.1146/ANNUREV-MARINE-120709-142731
- ARNOSTI, C., BELL, C., MOORHEAD, D. L., SINSABAUGH, R. L., STEEN, A. D., STROMBERGER, M., . . . WEINTRAUB, M. N. (2014). EXTRACELLULAR ENZYMES IN TERRESTRIAL, FRESHWATER, AND MARINE ENVIRONMENTS: PERSPECTIVES ON SYSTEM VARIABILITY AND COMMON RESEARCH NEEDS. *BIOGEOCHEMISTRY*, 117, 5–21. DOI:10.1007/s10533-013-9906-5
- ARRHENIUS, S. (1889). ÜBER DIE REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT BEI DER INVERSION VON ROHRZUCKER DURCH SAUREN. *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE*, 4, 226–248.
- ARRIETA, J. M., & HERNDL, G. J. (2002). CHANGES IN BACTERIAL β -GLUCOSIDASE DIVERSITY DURING A COASTAL PHYTOPLANKTON BLOOM. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 47, 594–599.
- 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, 331–333.
- AYO, B., ABAD, N., ARTOLOZAGA, I., AZUA, I., BAÑA, Z., UNANUE, M., . . . IRIBERRI, J. (2017). IMBALANCED NUTRIENT RECYCLING IN A WARMER OCEAN DRIVEN BY DIFFERENTIAL RESPONSE OF EXTRACELLULAR ENZYMATIC ACTIVITIES. *GLOBAL CHANGE BIOLOGY*, 23, 4084–4093. DOI:10.1111/gcb.13779
- AZAM, F., FENCHEL, T., FIELD, J. G., GRAY, J. S., MEYER-REIL, L. A., & THINGSTAD, F. (1983). THE ECOLOGICAL ROLE OF WATER-COLUMN MICROBES IN THE SEA. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 10, 257–263. DOI:10.3354/meps010257
- AZÚA, I., UNANUE, M., AYO, B., ARTOLOZAGA, I., ARRIETA, J. M., & IRIBERRI, J. (2003). INFLUENCE OF ORGANIC MATTER QUALITY IN THE CLEAVAGE OF POLYMERS BY MARINE BACTERIAL COMMUNITIES. *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, 25, 1451–1460. DOI:10.1093/plankt/fbg105
- BAINES, S. B., & PACE, M. L. (1991). THE PRODUCTION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER BY PHYTOPLANKTON AND ITS IMPORTANCE TO BACTERIA: PATTERNS ACROSS MARINE AND FRESHWATER SYSTEMS. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 36, 1078–1090. DOI:10.4319/LO.1991.36.6.1078
- BALTAR, F. (2018). WATCH OUT FOR THE "LIVING DEAD": CELL-FREE ENZYMES AND THEIR FATE. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 8, 1–6. DOI:10.3389/fmicb.2017.02438
- BALTAR, F., ARÍSTEGUI, J., GASOL, J. M., SINTES, 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
- BALTAR, F., ARÍSTEGUI, J., SINTES, 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, 1998–2014. DOI:10.1111/j.1462-2920.2009.01922.x
- BAÑA, Z., ABAD, N., URANGA, A., AZÚA, I., ARTOLOZAGA, I., UNANUE, M., . . . AYO, B. (2020). RECURRENT SEASONAL CHANGES IN BACTERIAL GROWTH EFFICIENCY, METABOLISM AND COMMUNITY COMPOSITION IN COASTAL WATERS. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 22, 369–380. DOI:10.1111/1462-2920.14853
- BÁRTA, J., ŠLAJSOVÁ, P., TAHOVSKÁ, K., PICEK, T., & ŠANTRŮČKOVÁ, H. (2014). DIFFERENT TEMPERATURE SENSITIVITY AND KINETICS OF SOIL ENZYMES INDICATE SEASONAL SHIFTS IN C, N AND P NUTRIENT STOICHIOMETRY IN ACID FOREST SOIL. BIOGEOCHEMISTRY, 117, 525–537. DOI:10.1007/s10533-013-9898-1
- BECKER, J. W., BERUBE, P. M., FOLLETT, C. L., WATERBURY, J. B., CHISHOLM, S. W., DELONG, E. F., & REPETA, D. J. (2014). CLOSELY RELATED PHYTOPLANKTON SPECIES PRODUCE SIMILAR SUITES OF DISSOLVED ORGANIC MATTER. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 5, 1–14. DOI:10.3389/fmicb.2014.00111
- BELL, W., & MITCHELL, R. (1972). CHEMOTACTIC AND GROWTH RESPONSES OF MARINE BACTERIA TO ALGAL EXTRACELLULAR PRODUCTS. MARINE BIOLOGICAL LABORATORY, 143, 265–277.
- BENNER, R. (2002). CHEMICAL COMPOSITION AND REACTIVITY. EN D. A. HANSELL, & C. A. CARLSON (EDITS.), BIOGEOCHEMISTRY OF MARINE DISSOLVED ORGANIC MATTER (PÁGS. 59–90). SAN DIEGO: ACADEMIC PRESS. DOI:10.1016/B978-012323841-2/50005-1
- BENNER, R., & AMON, R. M. (2015). THE SIZE-REACTIVITY CONTINUUM OF MAJOR BIOELEMENTS IN THE OCEAN. ANNUAL REVIEW OF MARINE SCIENCE, 7, 185–205. DOI:10.1146/ANNUREV-MARINE-010213-135126
- BENNER, R., BIDDANDA, B., BLACK, B., & MCCARTHY, M. (1997). ABUNDANCE, SIZE DISTRIBUTION, AND STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPIC COMPOSITIONS OF MARINE ORGANIC MATTER ISOLATED BY TANGENTIAL-FLOW ULTRAFITRATION. MAR. CHEM., 57, 243–266.
- BERGAUER, K., FERNANDEZ-GUERRA, A., GARCIA, J. A., SPRENGER, R. R., STEPANAUSKAS, R., PACHIADAKI, M. G., . . . HERNDL, G. J. (2018). ORGANIC MATTER PROCESSING BY MICROBIAL COMMUNITIES THROUGHOUT THE ATLANTIC WATER COLUMN AS REVEALED BY METAPROTEOMICS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 115, E400–E408. DOI:10.1073/pnas.1708779115
- BERGES, J. A., VARELA, D. E., & HARRISON, P. J. (2002). EFFECTS OF TEMPERATURE ON GROWTH RATE, CELL COMPOSITION AND NITROGEN METABOLISM IN THE MARINE DIATOM THALASSIOSIRA PSEUDONANA (BACILLARIOPHYCEAE). MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES, 225, 139–146. DOI:10.3354/meps225139
- BERKHOUT, J., BOSDRIESZ, E., NIKEREL, E., MOLENAAR, D., DE RIDDER, D., TEUSINK, B., & BRUGGEMAN, F. J. (2013). HOW BIOCHEMICAL CONSTRAINTS OF CELLULAR GROWTH. GENETICS, 194, 505–512. DOI:10.1534/GENETICS.113.150631
- BERMAN, T. (1988). DIFFERENTIAL UPTAKE OF ORTHOPHOSPHATE AND ORGANIC PHOSPHORUS SUBSTRATES BY BACTERIA AND ALGAE IN LAKE KINNERET. JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH, 10, 1239–1249. DOI:10.1093/PLANKT/10.6.1239
- BERTILSSON, S., BERGLUND, O., KARL, D. M., & CHISHOLM, S. W. (2003). ELEMENTAL COMPOSITION OF MARINE PROCHLOROCOCCUS AND SYNECHOCOCCUS: IMPLICATIONS FOR THE ECOLOGICAL STOICHIOMETRY OF THE SEA. LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY, 48, 1721–1731. DOI:10.4319/LO.2003.48.5.1721

- BIDDANDA, B., & BENNER, R. (1997). CARBON, NITROGEN, AND CARBOHYDRATE FLUXES DURING THE PRODUCTION OF PARTICULATE AND DISSOLVED ORGANIC MATTER BY MARINE PHYTOPLANKTON. *LIMNOL. OCEANOGR.*, 42, 506–518.
- BIDLE, K. D., & AZAM, F. (2001). BACTERIAL CONTROL OF SILICON REGENERATION FROM DIATOM DETRITUS: SIGNIFICANCE OF BACTERIAL ECTOHYDROLASES AND SPECIES IDENTITY. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 46, 1606–1623. DOI:10.4319/LO.2001.46.7.1606
- BIERMANN, A., ENGEL, A., & RIEBESELL, U. (2014). CHANGES IN ORGANIC MATTER CYCLING IN A PLANKTON COMMUNITY EXPOSED TO WARMING UNDER DIFFERENT LIGHT INTENSITIES. *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, 36, 658–671. DOI:10.1093/PLANKT/FBU005
- BIERSMITH, A., & BENNER, R. (1998). CARBOHYDRATES IN PHYTOPLANKTON AND FRESHLY PRODUCED DISSOLVED ORGANIC MATTER. *MARINE CHEMISTRY*, 63, 131–144. DOI:10.1016/S0304-4203(98)00057-7
- BLACKBURN, N., FENCHEL, T., & MITCHELL, J. (1998). MICROSCALE NUTRIENT PATCHES IN PLANKTONIC HABITATS SHOWN BY CHEMOTACTIC BACTERIA. *SCIENCE*, 282, 2254–2256. DOI:10.1126/SCIENCE.282.5397.2254
- BLOIS, J. L., WILLIAMS, J. W., FITZPATRICK, M. C., JACKSON, S. T., & FERRIER, S. (2013). SPACE CAN SUBSTITUTE FOR TIME IN PREDICTING CLIMATE-CHANGE EFFECTS ON BIODIVERSITY. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 110, 9374–9379. DOI:10.5061/DRYAD.D5F1R.1
- BOCHDANSKY, A. B., CLOUSE, M. A., & HERNDL, G. J. (2016). DRAGON KINGS OF THE DEEP SEA: MARINE PARTICLES DEVIATE MARKEDLY FROM THE COMMON NUMBER-SIZE SPECTRUM. *SCIENTIFIC REPORTS*, 6, 22633. DOI:10.1038/SREP22633
- BOCHDANSKY, A. B., PUSKARIC, S., & HERNDL, G. J. (1995). INFLUENCE OF ZOOPLANKTON GRAZING ON FREE DISSOLVED ENZYMES IN THE SEA. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 121, 53–63.
- BOEUF, D., EDWARDS, B. R., EPPLEY, J. M., HU, S. K., POFF, K. E., ROMANO, A. E., . . . DELONG, E. F. (2019). BIOLOGICAL COMPOSITION AND MICROBIAL DYNAMICS OF SINKING PARTICULATE ORGANIC MATTER AT ABYSSAL DEPTHS IN THE OLIGOTROPHIC OPEN OCEAN. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 116, 11824–11832. DOI:10.1073/PNAS.1903080116
- BOGÉ, G., LESPILETTE, M., JAMET, D., & JAMET, J. L. (2012). ROLE OF SEA WATER DIP AND DOP IN CONTROLLING BULK ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN N.W. MEDITERRANEAN SEA (TOULON, FRANCE). *MARINE POLLUTION BULLETIN*, 64, 1989–1996. DOI:10.1016/J.MARPOLBUL.2012.07.028
- BOGÉ, G., LESPILETTE, M., JAMET, D., & JAMET, J. L. (2013). THE RELATIONSHIPS BETWEEN PARTICULATE AND SOLUBLE ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES AND THE CONCENTRATION OF PHOSPHORUS DISSOLVED IN THE SEAWATER OF TOULON BAY (NW MEDITERRANEAN). *MARINE POLLUTION BULLETIN*, 74, 413–419. DOI:10.1016/J.MARPOLBUL.2013.06.003
- BOYD, P. W., CLAUSTRE, H., LEVY, M., SIEGEL, D. A., & WEBER, T. (2019). MULTI-FACETED PARTICLE PUMPS DRIVE CARBON SEQUESTRATION IN THE OCEAN. *NATURE*, 568, 327–335. DOI:10.1038/s41586-019-1098-2
- BRONK, D. A. (2002). DYNAMICS OF DON. EN D. A. HANSELL, & C. A. CARLSON (EDITS.), *BIOGEOCHEMISTRY OF MARINE DISSOLVED ORGANIC MATTER* (PÁGS. 153–247). SAN DIEGO: ACADEMIC PRESS. DOI:10.1016/B978-012323841-2/50007-5

- BROWN, J. H., GILLOOLY, J. F., ALLEN, A. P., SAVAGE, V. M., & WEST, G. B. (2004). TOWARD A METABOLIC THEORY OF ECOLOGY. *ECOLOGY*, 85, 1771–1789.
- BURD, A. B., HANSELL, D. A., STEINBERG, D. K., ANDERSON, T. R., ARISTEGUI, J., BALTAR, F., . . . TANAKA, T. (2010). ASSESSING THE APPARENT IMBALANCE BETWEEN GEOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF MESO- AND BATHYPELAGIC BIOLOGICAL ACTIVITY: WHAT THE @\$#! IS WRONG WITH PRESENT CALCULATIONS OF CARBON BUDGETS? *DEEP-SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 57, 1557–1571. DOI:10.1016/J.DSR2.2010.02.022
- CALVO-DÍAZ, A., MORÁN, X. A., & SUÁREZ, L. Á. (2008). SEASONALITY OF PICOPHYTOPLANKTON CHLOROPHYLL A AND BIOMASS IN THE CENTRAL CANTABRIAN SEA, SOUTHERN BAY OF BISCAY. *JOURNAL OF MARINE SYSTEMS*, 72, 271–281. DOI:10.1016/J.JMARSYS.2007.03.008
- CARLSON, C. A., & HANSELL, D. A. (2015). DOM SOURCES, SINKS, REACTIVITY, AND BUDGETS. EN HANSELL C & CARLSON EDS *BIOGEOCHEMISTRY OF MARINE DISSOLVED ORGANIC MATTER: SECOND EDITION* (PP. 65-126). ELSEVIER INC.. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/B978-0-12-405940-5.00003-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00003-0)
- CARLSON, C. A., HANSELL, D. A., & TAMBURINI, C. (2011). DOC PERSISTENCE AND ITS FATE AFTER EXPORT WITHIN THE OCEAN INTERIOR. EN *MICROBIAL CARBON PUMP IN THE OCEAN* (VOL. 10, PÁGS. 57–59). SCIENCE/AAAS. DOI:10.1126/SCIENCE.OPMS.SB0001
- CARUSO, G. (2010). LEUCINE AMINOPEPTIDASE, B-GLUCOSIDASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY RATES AND THEIR SIGNIFICANCE IN NUTRIENT CYCLES IN SOME COASTAL MEDITERRANEAN SITES. *MARINE DRUGS*, 8, 916–940. DOI:10.3390/MD8040916
- CAVICCHIOLI, R., RIPPLE, W. J., TIMMIS, K. N., AZAM, F., BAKKEN, L. R., BAYLIS, M., . . . WEBSTER, N. S. (2019). SCIENTISTS' WARNING TO HUMANITY: MICROORGANISMS AND CLIMATE CHANGE. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, 17, 569–586. DOI:10.1038/s41579-019-0222-5
- CELUSSI, M., & NEGRO, P. D. (2012). MICROBIAL DEGRADATION AT A SHALLOW COASTAL SITE: LONG-TERM SPECTRA AND RATES OF EXOENZYMATIC ACTIVITIES IN THE NE ADRIATIC SEA. *ESTUARINE, COASTAL AND SHELF SCIENCE*, 115, 75–86. DOI:10.1016/J.ECSS.2012.02.002
- CHAVEZ, F. P., MESSÍE, M., & PENNINGTON, J. T. (2011). MARINE PRIMARY PRODUCTION IN RELATION TO CLIMATE VARIABILITY AND CHANGE. *ANNUAL REVIEW OF MARINE SCIENCE*, 3, 227–260. DOI:10.1146/ANNUREV.MARINE.010908.163917
- CHO, B. C., & AZAM, F. (1988). MAJOR ROLE OF BACTERIA IN BIOGEOCHEMICAL FLUXES IN THE OCEAN'S INTERIOR. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY*, 332, 441–443. DOI:10.1017/CBO9781107415324.004
- CHRISTIAN, J. R., & KARL, D. M. (1998). ECTOAMINOPEPTIDASE SPECIFICITY AND REGULATION IN ANTARCTIC MARINE PELAGIC MICROBIAL COMMUNITIES. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 15, 303–310. DOI:10.3354/AME015303
- CHRÓST, R. J. (1991). ENVIRONMENTAL CONTROL OF THE SYNTHESIS AND ACTIVITY OF AQUATIC MICROBIAL ECTOENZYMES. EN R. J. CHRÓST (ED.), *MICROBIAL ENZYMES IN AQUATIC ENVIRONMENTS* (PÁGS. 29–59). NEW, YORK, NY: SPRINGER NEW YORK. DOI:10.1007/978-1-4612-3090-8_3
- CISTERNAS-NOVOA, C., LEE, C., & ENGEL, A. (2015). TRANSPARENT EXOPOLYMER PARTICLES (TEP) AND COOMASSIE STAINABLE PARTICLES (CSP): DIFFERENCES BETWEEN THEIR ORIGIN AND VERTICAL DISTRIBUTIONS IN THE OCEAN. *MARINE CHEMISTRY*, 175, 56–71. DOI:10.1016/J.MARCHEM.2015.03.009

- COLLINS, M., KNUTTI, R., ARBLASTER, J., DUFRESNE, J.-L., FICHEFET, T., FRIEDLINGSTEIN, P., & GAO, X. (2013). LONG-TERM CLIMATE CHANGE: PROJECTIONS, COMMITMENTS AND IRREVERSIBILITY. CLIMATE CHANGE 2013 THE PHYSICAL SCIENCE BASIS: WORKING GROUP I CONTRIBUTION TO THE FIFTH ASSESSMENT REPORT OF THE INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 9781107057, 1029–1136. DOI:10.1017/CBO9781107415324.024
- COLLINS, T., ROULLING, F., PIETTE, F., MARX, J.-C., FELLER, G., GERDAY, C., & D'AMICO, S. (2008). FUNDAMENTALS OF COLD-ADAPTED ENZYMES. EN R. MARGESIN, F. SCHINNER, J.-C. MARX, & C. GERDAY (EDITS.), PSYCHROPHILES: FROM BIODIVERSITY TO BIOTECHNOLOGY (PÁGS. 211–227). BERLIN, HEIDELBERG: SPRINGER BERLIN HEIDELBERG. DOI:10.1007/978-3-540-74335-4_13
- CRAM, J. A., XIA, L. C., NEEDHAM, D. M., SACHDEVA, R., SUN, F., & FUHRMAN, J. A. (2015). CROSS-DEPTH ANALYSIS OF MARINE BACTERIAL NETWORKS SUGGESTS DOWNWARD PROPAGATION OF TEMPORAL CHANGES. THE ISME JOURNAL, 9, 2573–2586. DOI:10.1038/ISMEJ.2015.76
- DAIMS, H., BRÜHL, A., AMANN, R., SCHLEIFER, K.-H., & WAGNER, M. (1999). THE DOMAIN-SPECIFIC PROBE EUB338 IS INSUFFICIENT FOR THE DETECTION OF ALL BACTERIA: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A MORE COMPREHENSIVE PROBE SET. SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, 22, 434–444. DOI:10.1016/S0723-2020(99)80053-8
- D'AMICO, S., COLLINS, T., MARX, J. C., FELLER, G., & GERDAY, C. (2006). PSYCHROPHILIC MICROORGANISMS: CHALLENGES FOR LIFE. EMBO REPORTS, 7, 385–389. DOI:10.1038/SJ.EMBOR.7400662
- 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. THE BIOLOGICAL OCEANOGRAPHY OF THE NORTH-EAST ATLANTIC-THE PRIME STUDY, 48, 1003–1017. DOI:10.1016/S0967-0645(00)00106-5
- DAVIDSON, E. A., JANSSENS, I. A., & LOU, Y. (2006). ON THE VARIABILITY OF RESPIRATION IN TERRESTRIAL ECOSYSTEMS: MOVING BEYOND Q10. GLOBAL CHANGE BIOLOGY, 12, 154–164. DOI:10.1111/J.1365-2486.2005.01065.X
- DE MARIA, S., FERRARI, G., & MARESCA, P. (2017). EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BOVINE SERUM ALBUMIN. JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, 97, 3151–3158. DOI:10.1002/JSFA.8157
- DECAD, G. M., & NIKAIDO, H. (1976). OUTER MEMBRANE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA. XII. MOLECULAR-SIEVING FUNCTION OF CELL WALL. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 128, 325–336. OBTENIDO DE [HTTPS://JB.ASM.ORG/CONTENT/128/1/325](https://jb.asm.org/content/128/1/325)
- DECHO, A. W., & GUTIERREZ, T. (2017). MICROBIAL EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES (EPSs) IN OCEAN SYSTEMS. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 8, 1–28. DOI:10.3389/FMICB.2017.00922
- DEGERMAN, R., DINASQUET, J., RIEMANN, L., DE LUNA, S. S., & ANDERSSON, A. (2013). EFFECT OF RESOURCE AVAILABILITY ON BACTERIAL COMMUNITY RESPONSES TO INCREASED TEMPERATURE. AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY, 68, 131–142. DOI:10.3354/AME01609
- DEL GIORGIO, P. A., & COLE, J. J. (1998). BACTERIAL GROWTH EFFICIENCY IN NATURAL AQUATIC SYSTEMS. ANNU. REV. ECOL. SYST., 29, 503–541. DOI:10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.29.1.503

- DEMING, J. W., & VETTER, Y.-A. (1994). EXTRACELLULAR ENZYME ACTIVITY IN THE ARCTIC NORTHEAST WATER POLYNYA. *MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES*, 114, 23–34. DOI:10.3354/MEPS114023
- DOMAŃ-PYTKA, M., & BARDOWSKI, J. (2004). PULLULAN DEGRADING ENZYMES OF BACTERIAL ORIGIN. *CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY*, 30, 107–121. DOI:10.1080/10408410490435115
- DONG, Y., & SOMERO, G. N. (2009). TEMPERATURE ADAPTATION OF CYTOSOLIC MALATE DEHYDROGENASES OF LIMPETS (GENUS *LOTTIA*): DIFFERENCES IN STABILITY AND FUNCTION DUE TO MINOR CHANGES IN SEQUENCE CORRELATE WITH BIOGEOGRAPHIC AND VERTICAL DISTRIBUTIONS. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY*, 212, 169–177. DOI:10.1242/JEB.024505
- DORE, J. E., LETELIER, R. M., CHURCH, M. J., LUKAS, R., & KARL, D. M. (2008). SUMMER PHYTOPLANKTON BLOOMS IN THE OLIGOTROPHIC NORTH PACIFIC SUBTROPICAL GYRE: HISTORICAL PERSPECTIVE AND RECENT OBSERVATIONS. *PROGRESS IN OCEANOGRAPHY*, 76, 2–38. DOI:10.1016/j.pocean.2007.10.002
- DUARTE, C. M. (2015). SEAFARING IN THE 21ST CENTURY: THE MALASPINA 2010 CIRCUMNAVIGATION EXPEDITION. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY BULLETIN*, 24, 11–14. DOI:10.1002/LOB.10008
- DUCE, R. A., LAROCHE, J., ALTIERI, K., ARRIGO, K. R., BAKER, A. R., CAPONE, D. G., . . . ZAMORA, L. (2008). IMPACTS OF ATMOSPHERIC ANTHROPOGENIC NITROGEN ON THE OPEN OCEAN. *SCIENCE*, 320, 893–897. DOI:10.1126/SCIENCE.1150369
- DUHAMEL, S., DYHRMAN, S. T., & KARL, D. M. (2010). ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY AND REGULATION IN THE NORTH PACIFIC SUBTROPICAL GYRE. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 55, 1414–1425. DOI:10.4319/LO.2010.55.3.1414
- ELMENDORF, S. C., HENRY, G. H., HOLLISTER, R. D., FOSAA, A. M., GOULD, W. A., HERMANUTZ, L., . . . WALKER, M. D. (2015). EXPERIMENT, MONITORING, AND GRADIENT METHODS USED TO INFER CLIMATE CHANGE EFFECTS ON PLANT COMMUNITIES YIELD CONSISTENT PATTERNS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 112, 448–452. DOI:10.1073/PNAS.1511529112
- ENGEL, A., HÄNDEL, N., WOHLERS, J., LUNAU, M., GROSSART, H.-P., SOMMER, U., & RIEBESELL, U. (2011). EFFECTS OF SEA SURFACE WARMING ON THE PRODUCTION AND COMPOSITION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER DURING PHYTOPLANKTON BLOOMS: RESULTS FROM A MESOCOSM STUDY. *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, 33, 357–372. DOI:10.1093/PLANKT/FBQ122
- FELLER, G., & GERDAY, C. (2003). PSYCHROPHILIC ENZYMES: HOT TOPICS IN COLD ADAPTATION. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, 1, 200–208. DOI:10.1038/NRMICRO773
- FERNÁNDEZ, E., & BODE, A. (1991). SEASONAL PATTERNS OF PRIMARY PRODUCTION IN THE CENTRAL CANTABRIAN SEA (BAY OF BISCAY). *SEASONAL PATTERNS OF PRIMARY PRODUCTION IN THE CENTRAL CANTABRIAN SEA (BAY OF BISCAY)*, 55, 629–636.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B., RICHTER, M., SCHÜLER, M., PINHASSI, J., ACINAS, S. G., GONZÁLEZ, J. M., & PEDRÓS-ALIÓ, C. (2013). ECOLOGY OF MARINE BACTEROIDETES: A COMPARATIVE GENOMICS APPROACH. *THE ISME JOURNAL*, 7, 1026–37. DOI:10.1038/ISMEJ.2012.169
- FLINTROP, C. M., ROGGE, A., MIKSCH, S., THIELE, S., WAITE, A. M., & IVERSEN, M. H. (2018). EMBEDDING AND SLICING OF INTACT IN SITU COLLECTED MARINE SNOW. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY: METHODS*, 16, 339–355. DOI:10.1002/LOM3.10251

- FOLLETT, C. L., REPETA, D. J., ROTHMAN, D. H., XU, L., & SANTINELLI, C. (2014). HIDDEN CYCLE OF DISSOLVED ORGANIC CARBON IN THE DEEP OCEAN. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 111, 16706–16711. DOI:10.1073/PNAS.1407445111
- FRANK, A. H., GARCIA, J. A., HERNDL, G. J., & REINTHALER, T. (2016). CONNECTIVITY BETWEEN SURFACE AND DEEP WATERS DETERMINES PROKARYOTIC DIVERSITY IN THE NORTH ATLANTIC DEEP WATER. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 18, 2052–2063. DOI:10.1111/1462-2920.13237
- FUHRMAN, J. A., STEELE, J. A., HEWSON, I., SCHWALBACH, M. S., BROWN, M. V., GREEN, J. L., & BROWN, J. H. (2008). A LATITUDINAL DIVERSITY GRADIENT IN PLANKTONIC MARINE BACTERIA. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 105, 7774–8. DOI:10.1073/PNAS.0803070105
- GARCÍA-CORRAL, L. S., BARBER, E., REGAUDIE-DE-GIOUX, A., SAL, S., HOLDING, J. M., AGUSTÍ, S., . . . DUARTE, C. M. (2014). TEMPERATURE DEPENDENCE OF PLANKTONIC METABOLISM IN THE SUBTROPICAL NORTH ATLANTIC OCEAN. *BIOGEOSCIENCES*, 11, 4529–4540. DOI:10.5194/BG-11-4529-2014
- GARDNER, W. D. (1997). THE FLUX OF PARTICLES TO THE DEEP SEA: METHODS, MEASUREMENTS, AND MECHANISMS. *OCEANOGRAPHY*, 10, 116–121. DOI:10.5670/OCEANOLOG.1997.03.
- GEIDER, R. J., & LA ROCHE, J. (2002). REDFIELD REVISITED: VARIABILITY OF C:N:P IN MARINE MICROALGAE AND ITS BIOCHEMICAL BASIS. *EUROPEAN JOURNAL OF PHYCOLOGY*, 37, 1–17. DOI:10.1017/S0967026201003456
- GERMAN, D. P., MARCELO, K. R., STONE, M. M., & ALLISON, S. D. (2012). THE MICHAELIS-MENTEN KINETICS OF SOIL EXTRACELLULAR ENZYMES IN RESPONSE TO TEMPERATURE: A CROSS-LATITUDINAL STUDY. *GLOBAL CHANGE BIOLOGY*, 18, 1468–1479. DOI:10.1111/J.1365-2486.2011.02615.X
- GIOVANNONI, S. J., TRIPP, H. J., GIVAN, S., PODAR, M., VERGIN, K. L., BAPTISTA, D., . . . MATHUR, E. J. (2005). GENOME STREAMLINING IN A COSMOPOLITAN OCEANIC BACTERIUM. *SCIENCE*, 309, 1242–1245. DOI:10.1126/SCIENCE.1114057
- GLATTING, G., KLETTING, P., RESKE, S. N., HOHL, K., & RING, C. (2007). CHOOSING THE OPTIMAL FIT FUNCTION: COMPARISON OF THE AKAIKE INFORMATION CRITERION AND THE F-TEST. *MEDICAL PHYSICS*, 34, 4285. DOI:10.1118/1.2794176
- GOLDMAN, J. C., & DENNETT, M. R. (2000). GROWTH OF MARINE BACTERIA IN BATCH AND CONTINUOUS CULTURE UNDER CARBON AND NITROGEN LIMITATION. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 45, 789–800. DOI:10.4319/LO.2000.45.4.0789
- GOPINATH, S., & SUGUNAN, S. (2006). ENHANCED pH AND THERMAL STABILITIES OF INVERTASE IMMOBILIZED ON MONTMORILLONITE K-10. *FOOD CHEMISTRY*, 94, 573–579. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2004.12.043
- GOPINATH, S., & SUGUNAN, S. (2007). ENZYMES IMMOBILIZED ON MONTMORILLONITE K 10: EFFECT OF ADSORPTION AND GRAFTING ON THE SURFACE PROPERTIES AND THE ENZYME ACTIVITY. *APPLIED CLAY SCIENCE*, 35, 67–75. DOI:10.1016/J.CLAY.2006.04.007
- GRAM, L., GROSSART, H.-P., SCHLINGLOFF, A., & KIØRBOE, T. (2002). POSSIBLE QUORUM SENSING IN MARINE SNOW BACTERIA : PRODUCTION OF ACYLATED HOMOSERINE LACTONES BY ROSEOBACTER STRAINS ISOLATED FROM MARINE SNOW. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68, 4111–4116. DOI:10.1128/AEM.68.8.4111

- GROSSART, H.-P., TANG, K. W., KIØRBOE, T., & PLOUG, H. (2007). COMPARISON OF CELL-SPECIFIC ACTIVITY BETWEEN FREE-LIVING AND ATTACHED BACTERIA USING ISOLATES AND NATURAL ASSEMBLAGES. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*, 266, 194–200. doi:10.1111/J.1574-6968.2006.00520.x
- GUENET, B., DANGER, M., ABBADIE, L., & LACROIX, G. (2010). PRIMING EFFECT: BRIDGING THE GAP BETWEEN TERRESTRIAL AND AQUATIC ECOLOGY. *ECOLOGY*, 91, 2850–2861. doi:10.1890/09-1968.1
- HAMA, T., YANAGI, K., & HAMA, J. (2004). DECREASE IN MOLECULAR WEIGHT OF PHOTOSYNTHETIC PRODUCTS OF MARINE PHYTOPLANKTON DURING EARLY DIAGENESIS. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 49, 471–481. doi:10.4319/LO.2004.49.2.0471
- HANSELL, D. A. (2013). RECALCITRANT DISSOLVED ORGANIC CARBON FRACTIONS. *ANNUAL REVIEW OF MARINE SCIENCE*, 5, 421–445. doi:10.1146/ANNUREV-MARINE-120710-100757
- HEALEY, F. P. (1980). SLOPE OF THE MONOD EQUATION AS AN INDICATOR OF ADVANTAGE IN NUTRIENT COMPETITION. *MICROBIAL ECOLOGY*, 5, 281–286. doi:10.1007/BF02020335
- HEDGES, J. I. (1992). GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES: PROGRESS AND PROBLEMS. *MARINE CHEMISTRY*, 39, 67–93. doi:10.1016/0304-4203(92)90096-S
- HERNDL, G. J., & REINTHALER, T. (2013). MICROBIAL CONTROL OF THE DARK END OF THE BIOLOGICAL PUMP. *NATURE GEOSCIENCE*, 6, 718–724. doi:10.1038/NNGEO1921
- HERNDL, G. J., REINTHALER, T., TEIRA, E., VAN AKEN, H. V., VETH, C., PERNTHALER, A., & PERNTHALER, J. (2005). CONTRIBUTION OF ARCHAEA TO TOTAL PROKARYOTIC PRODUCTION IN THE DEEP ATLANTIC OCEAN. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 71, 2303–2309. doi:10.1128/AEM.71.5.2303
- 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. doi:10.3354/MEPS011299
- 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. doi:10.3354/AME019139
- HOPPE, H.-G., ARNOSTI, C., & HERNDL, G. J. (2002). ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF BACTERIAL ENZYMES IN THE MARINE ENVIRONMENT. *EN ENZYMES IN THE ENVIRONMENT (PÁGS. 85–125)*. doi:10.1201/9780203904039.CH3
- HOPPE, H.-G., BREITHAUP, P., WALTHER, K., KOPPE, R., BLECK, S., SOMMER, U., & JÜRGENS, K. (2008). CLIMATE WARMING IN WINTER AFFECTS THE COUPLING BETWEEN PHYTOPLANKTON AND BACTERIA DURING THE SPRING BLOOM: A MESOCOSM STUDY. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 51, 105–115. doi:10.3354/AME01198
- HUETE-STAUFFER, T. M., ARANDIA-GOROSTIDI, N., DÍAZ-PÉREZ, L., & MORÁN, X. A. (2015). TEMPERATURE DEPENDENCES OF GROWTH RATES AND CARRYING CAPACITIES OF MARINE BACTERIA DEPART FROM METABOLIC THEORETICAL PREDICTIONS. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 91. doi:10.1093/FEMSEC/FIV111
- HUFFARD, C. L., DURKIN, C. A., WILSON, S. E., MCGILL, P. R., HENTHORN, R., & SMITH, K. L. (2020). TEMPORALLY-RESOLVED MECHANISMS OF DEEP-OCEAN PARTICLE FLUX AND IMPACT ON THE SEAFLOOR CARBON CYCLE IN THE NORTHEAST PACIFIC. *DEEP-SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 173, 104763. doi:10.1016/J.DSR2.2020.104763

- IRIBERRI, J., UNDURRAGA, A., MUELA, A., & EGEA, L. (1985). HETEROTROPHIC BACTERIAL ACTIVITY IN COASTAL WATERS: FUNCTIONAL RELATIONSHIP OF TEMPERATURE AND PHYTOPLANKTON POPULATION. *ECOLOGICAL MODELLING*, 28, 113–120.
- IVANČIĆ, I., FUKS, D., RADIĆ, T., LYONS, D. M., ŠILOVIĆ, T., KRAUS, R., & PRECALI, R. (2010). PHYTOPLANKTON AND BACTERIAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE NORTHERN ADRIATIC SEA. *MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH*, 69, 85–94. DOI:10.1016/J.MARENRES.2009.08.004
- JANNASCH, H. W. (1967). GROWTH OF MARINE BACTERIA AT LIMITING CONCENTRATIONS OF ORGANIC CARBON IN SEAWATER. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 12, 264–271. DOI:10.1029/TR015i001p00228
- JATT, A. N., TANG, K., LIU, J., ZHANG, Z., & ZHANG, X. H. (2015). QUORUM SENSING IN MARINE SNOW AND ITS POSSIBLE INFLUENCE ON PRODUCTION OF EXTRACELLULAR HYDROLYTIC ENZYMES IN MARINE SNOW BACTERIUM *PANTOEA ANANATIS* B9. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 91, 1–13. DOI:10.1093/FEMSEC/FIU030
- JIAO, N., HERNDL, G. J., HANSELL, D. A., BENNER, R., KATTNER, G., WILHELM, S. W., . . . AZAM, F. (2010). MICROBIAL PRODUCTION OF RECALCITRANT DISSOLVED ORGANIC MATTER: LONG-TERM CARBON STORAGE IN THE GLOBAL OCEAN. *NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY*, 8, 593–599. DOI:10.1038/NRMICRO2386
- JOSHI, S., & SATYANARAYANA, T. (2013). BIOTECHNOLOGY OF COLD-ACTIVE PROTEASES. *BIOLOGY*, 2, 755–783. DOI:10.3390/BIOLOGY2020755
- KARL, D. M., KNAUER, G. A., & MARTIN, J. H. (1988). DOWNWARD FLUX OF PARTICULATE ORGANIC MATTER IN THE OCEAN: A PARTICLE DECOMPOSITION PARADOX. *NATURE*, 332, 4–7.
- KARNER, M., & RASSOULZADEGAN, F. (1995). EXTRACELLULAR ENZYME ACTIVITY: INDICATIONS FOR HIGH SHORT-TERM VARIABILITY IN A COASTAL MARINE ECOSYSTEM. *MICROBIAL ECOLOGY*, 30, 143–156. DOI:10.1007/BF00172570
- KARNER, M., FERRIER PAGES, C., & RASSOULZADEGAN, F. (1994). PHAGOTROPHIC NANOFLAGELLATES CONTRIBUTE TO OCCURRENCE OF α -GLUCOSIDASE AND AMINOPEPTIDASE IN MARINE ENVIRONMENTS. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 114, 237–244. DOI:10.3354/MEPS114237
- KEIL, R. G., & KIRCHMAN, D. L. (1994). ABIOTIC TRANSFORMATION OF LABILE PROTEIN TO REFRACTORY PROTEIN IN SEA WATER. *MARINE CHEMISTRY*, 45, 187–196. DOI:10.1016/0304-4203(94)90002-7
- KIM, C., NISHIMURA, Y., & NAGATA, T. (2007). HIGH POTENTIAL ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN THE BENTHIC NEPHELOID LAYER OF A LARGE MESOTROPHIC LAKE: IMPLICATIONS FOR PHOSPHORUS REGENERATION IN OXYGENATED HYPOLIMNION. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 49, 303–311. DOI:10.3354/AME01137
- KIØRBOE, T., & JACKSON, G. A. (2001). MARINE SNOW, ORGANIC SOLUTE PLUMES, AND OPTIMAL CHEMOSENSORY BEHAVIOR OF BACTERIA. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 46, 1309–1318. DOI:10.4319/LO.2001.46.6.1309
- KIØRBOE, T., GROSSART, H.-P., PLOUG, H., & TANG, K. (2002). MECHANISMS AND RATES OF COLONISATION OF SINKING AGGREGATES. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68, 3996–4006. DOI:10.1128/AEM.68.8.3996
- KIRCHMAN, D. L. (2002). THE ECOLOGY OF CYTOPHAGA-FLAVOBACTERIA IN AQUATIC ENVIRONMENTS. *FEMS MICROBIOL ECOL*, 39, 91–100.

- KOCH AL. (1985). THE MACROECONOMICS OF BACTERIAL GROWTH. EN M. FLETCHER & G.D. FLOODGATE (EDITS.), SPECIAL PUBLICATIONS OF THE SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY (PÁGS. 1-42). LONDON: ACADEMIC PRESS.
- KOCH, O., TSCHERKO, D., & KANDELER, E. (2007). TEMPERATURE SENSITIVITY OF MICROBIAL RESPIRATION, NITROGEN MINERALIZATION, AND POTENTIAL SOIL ENZYME ACTIVITIES IN ORGANIC ALPINE SOILS. GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES, 21, 1–11. doi:10.1029/2007GB002983
- KOIKE, I., & NAGATA, T. (1997). HIGH POTENTIAL ACTIVITY OF EXTRACELLULAR ALKALINE PHOSPHATASE IN DEEP WATERS OF THE CENTRAL PACIFIC. DEEP SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY, 44, 2283–2294. doi:10.1016/S0967-0645(97)00025-8
- KOYAMA, A., WALLENSTEIN, M. D., SIMPSON, R. T., & MOORE, J. C. (2013). CARBON-DEGRADING ENZYME ACTIVITIES STIMULATED BY INCREASED NUTRIENT AVAILABILITY IN ARCTIC TUNDRA SOILS. PLoS ONE, 8, 1–12. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0077212
- LABRY, C., DELMAS, D., & HERBLAND, A. (2005). PHYTOPLANKTON AND BACTERIAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES IN RELATION TO PHOSPHATE AND DOP AVAILABILITY WITHIN THE GIRONDE PLUME WATERS (BAY OF BISCAY). JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY, 318, 213–225. doi:10.1016/J.JEMBE.2004.12.017
- LARA, E., ARRIETA, J. M., GARCIA-ZARANDONA, I., BORAS, J. A., DUARTE, C. M., AGUSTÍ, S., . . . VAQUÉ, D. (2013). EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE WARMING EFFECT ON VIRAL, BACTERIAL AND PROTISTAN COMMUNITIES IN TWO CONTRASTING ARCTIC SYSTEMS. AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY, 70, 17–32. doi:10.3354/AME01636
- LEVITAN, O., BROWN, C. M., SUDHAUS, S., CAMPBELL, D., LAROCHE, J., & BERMAN-FRANK, I. (2010). REGULATION OF NITROGEN METABOLISM IN THE MARINE DIAZOTROPH TRICHODESMIUM IMS101 UNDER VARYING TEMPERATURES AND ATMOSPHERIC CO₂ CONCENTRATIONS. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 12, 1899–1912. doi:10.1111/J.1462-2920.2010.02195.X
- LI, H., VELDHUIS, M. J., & POST, A. F. (1998). ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES AMONG PLANKTONIC COMMUNITIES IN THE NORTHERN RED SEA. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES, 173, 107–115. doi:10.3354/MEPS173107
- LØNBORG, C., CUEVAS, L. A., REINTHALER, T., HERNDL, G. J., GASOL, J. M., MORÁN, X. A., . . . ÁLVAREZ-SALGADO, X. A. (2016). DEPTH DEPENDENT RELATIONSHIPS BETWEEN TEMPERATURE AND OCEAN HETEROTROPHIC PROKARYOTIC PRODUCTION. FRONTIERS IN MARINE SCIENCE, 3, 1–9. doi:10.3389/FMARS.2016.00090
- LONHIENNE, T., ZOIDAKIS, J., VORGAS, C. E., FELLER, G., GERDAY, C., & BOURIOTIS, V. (2001). MODULAR STRUCTURE, LOCAL FLEXIBILITY AND COLD-ACTIVITY OF A NOVEL CHITOBIASE FROM A PSYCHROPHILIC ANTARCTIC BACTERIUM. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 310, 291–297. doi:10.1006/JMBI.2001.4774
- LOPEZ, C. N., ROBERT, M., GALBRAITH, M., BERCOVICI, S. K., ORELLANA, M. V., & HANSELL, D. A. (2020). HIGH TEMPORAL VARIABILITY OF TOTAL ORGANIC CARBON IN THE DEEP NORTHEASTERN PACIFIC. FRONTIERS IN EARTH SCIENCE, 8, 1–11. doi:10.3389/FEART.2020.00080
- LÓPEZ-URRUTIA, A., SAN MARTIN, E., HARRIS, R. P., & IRIGOIEN, X. (2006). SCALING THE METABOLIC BALANCE OF THE OCEANS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 103, 8739–8744. doi:10.1073/PNAS.0601137103

- LOZZI, I., CALAMAI, L., FUSI, P., BOSETTO, M., & STOTZKY, G. (2001). INTERACTION OF HORSERADISH PEROXIDASE WITH MONTMORILLONITE HOMOIONIC TO Na^+ AND Ca^{2+} : EFFECTS ON ENZYMIC ACTIVITY AND MICROBIAL DEGRADATION. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 33, 1021–1028.
- LUDDEN, T. M., BEAL, S. L., & SHEINER, L. B. (1994). COMPARISON OF THE AKAIKE INFORMATION CRITERION, THE SCHWARZ CRITERION AND THE F TEST AS GUIDES TO MODEL SELECTION. *JOURNAL OF PHARMACOKINETICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 22, 431–445. doi:10.1007/BF02353864
- LUNA, G. M., CHIGGIATO, J., QUERO, G. M., SCHROEDER, K., BONGIORNI, L., KALENITCHENKO, D., & GALAND, P. E. (2016). DENSE WATER PLUMES MODULATE RICHNESS AND PRODUCTIVITY OF DEEP SEA MICROBES. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 18, 4537–4548. doi:10.1111/1462-2920.13510
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., VANCANNEYT, M., & SCHLEIFER, K. H. (1996). APPLICATION OF A SUITE OF 16S rRNA-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES DESIGNED TO INVESTIGATE BACTERIA OF THE PHYLUM CYTOPHAGA-FLAVOBACTER-BACTEROIDES IN THE NATURAL ENVIRONMENT. *MICROBIOLOGY*, 142, 1097–1106. doi:10.1099/13500872-142-5-1097
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M., & SCHLEIFER, K.-H. (1992). PHYLOGENETIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDE PROBES FOR THE MAJOR SUBCLASSES OF PROTEOBACTERIA: PROBLEMS AND SOLUTIONS. *SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY*, 15, 593–600. doi:10.1016/S0723-2020(11)80121-9
- MARIE, D., PARTENSKY, F., VAULOT, D., & BRUSSAARD, C. (1999). ENUMERATION OF PHYTOPLANKTON, BACTERIA, AND VIRUSES IN MARINE SAMPLES. EN CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY (VOL. 10, PÁGS. 11.11.1–11.11.15). doi:10.1002/0471142956.cy1111s10
- MARTINY, A. C., PHAM, C. T., PRIMEAU, F. W., VRUGT, J. A., MOORE, J. K., LEVIN, S. A., & LOMAS, M. W. (2013). STRONG LATITUDINAL PATTERNS IN THE ELEMENTAL RATIOS OF MARINE PLANKTON AND ORGANIC MATTER. *NATURE GEOSCIENCE*, 6, 279–283. doi:10.1038/NGEO1757
- MARTINY, J. B., BOHANNAN, B. J., BROWN, J. H., COLWELL, R. K., FUHRMAN, J. A., GREEN, J. L., . . . STALEY, J. T. (2006). MICROBIAL BIOGEOGRAPHY: PUTTING MICROORGANISMS ON THE MAP. *NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY*, 4, 102–112. doi:10.1038/NRMICRO1341
- MARX, M.-C., WOOD, M., & JARVIS, S. C. (2001). A MICROPLATE FLUORIMETRIC ASSAY FOR THE STUDY OF ENZYME DIVERSITY IN SOILS. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 33, 1633–1640. doi:10.1016/S0038-0717(01)00079-7
- MESTRE, M., RUIZ-GONZÁLEZ, C., LOGARES, R., DUARTE, C. M., GASOL, J. M., & SALA, M. M. (2018). SINKING PARTICLES PROMOTE VERTICAL CONNECTIVITY IN THE OCEAN MICROBIOME. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 115, E6799–E6807. doi:10.1073/PNAS.1802470115
- MICHAELIS, L., & MENTEN, M. L. (1913). DIE KINETIK DER INVERTINWIRKUNG. *BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIF*.
- MICHAELIS, L., & MENTEN, M. L. (1913). DIE KINETIK DER INVERTINWIRKUNG. *BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIF*, 49, 333–369. OBTENIDO DE [HTTP://NEMO.LF1.CUNI.CZ/MLAB/FTP/PAPERS/HISTORIC/1920-AND-BEFORE/MICHAELIS-MENTEN-DE-1913.PDF](http://NEMO.LF1.CUNI.CZ/MLAB/FTP/PAPERS/HISTORIC/1920-AND-BEFORE/MICHAELIS-MENTEN-DE-1913.PDF)
- MIDDELBOE, M., JØRGENSEN, N. O., & KROER, N. (1996). EFFECTS OF VIRUSES ON NUTRIENT TURNOVER AND GROWTH EFFICIENCY OF NON-INFECTED MARINE BACTERIOPANKTON. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 62, 1991–1997. OBTENIDO DE [HTTPS://AEM.ASM.ORG/CONTENT/62/6/1991](https://AEM.ASM.ORG/CONTENT/62/6/1991)

- MISIC, C., CASTELLANO, M., FABIANO, M., RUGGIERI, N., SAGGIOMO, V., & POVERO, P. (2006). ECTOENZYMATIC ACTIVITY IN SURFACE WATERS: A TRANSECT FROM THE MEDITERRANEAN SEA ACROSS THE INDIAN OCEAN TO AUSTRALIA. *DEEP-SEA RESEARCH PART I: OCEANOGRAPHIC RESEARCH PAPERS*, 53, 1517–1532. doi:10.1016/j.dsr.2006.07.001
- MISLAN, K. A., STOCK, C. A., DUNNE, J. P., & SARMIENTO, J. L. (2014). GROUP BEHAVIOR AMONG MODEL BACTERIA INFLUENCES PARTICULATE CARBON REMINERALIZATION DEPTHS. *JOURNAL OF MARINE RESEARCH*, 72, 183–218. doi:10.1357/002224014814901985
- MOOSHAMMER, M., WANER, W., ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S., & RICHTER, A. (2014). STOICHIOMETRIC IMBALANCES BETWEEN TERRESTRIAL DECOMPOSER COMMUNITIES AND THEIR RESOURCES: MECHANISMS AND IMPLICATIONS OF MICROBIAL ADAPTATIONS TO THEIR RESOURCES. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*, 5, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00022
- MORAN, M. A., BELAS, R., SCHELL, M. A., GONZÁLEZ, J. M., SUN, F., SUN, S., . . . BUCHAN, A. (2007). ECOLOGICAL GENOMICS OF MARINE ROSEOBACTERS. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 73, 4559–4569. doi:10.1128/AEM.02580-06
- MORAN, M. A., KUJAWINSKI, E. B., STUBBINS, A., FATLAND, R., ALUWIHARE, L. I., BUCHAN, A., . . . WALDBAUER, J. R. (2016). DECIPHERING OCEAN CARBON IN A CHANGING WORLD. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 113, 3143–3151. doi:10.1073/pnas.1514645113
- MORÁN, X. A. (2007). ANNUAL CYCLE OF PICOPHYTOPLANKTON PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH RATES IN A TEMPERATE COASTAL ECOSYSTEM: A MAJOR CONTRIBUTION TO CARBON FLUXES. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 49, 267–279. doi:10.3354/AME01151
- MORÁN, X. A., LÓPEZ-URRUTIA, A., CALVO-DÍAZ, A., & LI, W. K. (2010). INCREASING IMPORTANCE OF SMALL PHYTOPLANKTON IN A WARMER OCEAN. *GLOBAL CHANGE BIOLOGY*, 16, 1137–1144. doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01960.x
- MÜNSTER, U., & CHRÓST, R. J. (1990). ORIGIN, COMPOSITION, AND MICROBIAL UTILIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER. EN *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR APPROACHES* (PÁGS. 8–46).
- MYKLESTAD, S. M. (2000). DISSOLVED ORGANIC CARBON FROM PHYTOPLANKTON. EN P. J. WANGERSKY (Ed.), *MARINE CHEMISTRY* (PÁGS. 111–148). BERLIN, HEIDELBERG: SPRINGER BERLIN HEIDELBERG. doi:10.1007/10683826_5
- NAGATA, T. (2008). ORGANIC MATTER–BACTERIA INTERACTIONS IN SEAWATER. EN D. L. KIRCHMAN (Ed.), *MICROBIAL ECOLOGY OF THE OCEANS* (PÁGS. 207–241). JOHN WILEY & SONS, LTD. doi:10.1002/9780470281840.ch7
- NAGATA, T., & KIRCHMAN, D. L. (1992). RELEASE OF MACROMOLECULAR ORGANIC COMPLEXES BY HETEROTROPHIC MARINE FLAGELLATES. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 83, 233–240. doi:10.3354/meps083233
- NAGATA, T., FUKUDA, H., FUKUDA, R., & KOIKE, I. (2000). BACTERIOPLANKTON DISTRIBUTION AND PRODUCTION IN DEEP PACIFIC WATERS: LARGE-SCALE GEOGRAPHIC VARIATIONS AND POSSIBLE COUPLING WITH SINKING PARTICLE FLUXES. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 45, 426–435.
- NAGATA, T., TAMBURINI, C., ARISTEGUI, J., BALTAR, F., BOCHDANSKY, A. B., FONDA-UMANI, S., . . . BARTLETT, D. H. (2010). EMERGING CONCEPTS ON MICROBIAL PROCESSES IN THE BATHYPELAGIC OCEAN - ECOLOGY, BIOGEOCHEMISTRY, AND GENOMICS. *DEEP-SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 57, 1519–1536. doi:10.1016/j.dsr2.2010.02.019

- NANNIPIERI, P., CECCANTI, B., CERVELLI, S., & CONTI, C. (1982). HYDROLASES EXTRACTED FROM SOIL: KINETIC PARAMETERS OF SEVERAL ENZYMES CATALYSING THE SAME REACTION. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 14, 429–432. doi:10.1016/0038-0717(82)90100-6
- OBAYASHI, Y., & SUZUKI, S. (2008). ADSORPTION OF EXTRACELLULAR PROTEASES IN SEAWATER ONTO FILTERS DURING SIZE FRACTIONATION. *JOURNAL OF OCEANOGRAPHY*, 64, 367–372. doi:10.1007/s10872-008-0029-x
- OBAYASHI, Y., & SUZUKI, S. (2008). OCCURRENCE OF EXO- AND ENDOPEPTIDASES IN DISSOLVED AND PARTICULATE FRACTIONS OF COASTAL SEAWATER. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 50, 231–237. doi:10.3354/AME01169
- OGAWA, H., AMAGAI, Y., KOIKE, I., KAISER, K., & BENNER, R. (2001). PRODUCTION OF REFRACTORY DISSOLVED ORGANIC MATTER BY BACTERIA. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)*, 292, 917–20. doi:10.1126/SCIENCE.1057627
- PANIKOV, N. S., BLAGODATSKY, S. A., BLAGODATSKAYA, J. V., & GLAGOLEV, M. V. (1992). DETERMINATION OF MICROBIAL MINERALIZATION ACTIVITY IN SOIL BY MODIFIED WRIGHT AND HOBBIE METHOD. *BIOLOGY AND FERTILITY OF SOILS*, 14, 280–287. doi:10.1007/BF00395464
- PANTOJA, S., LEE, C., & MARECEK, J. F. (1997). HYDROLYSIS OF PEPTIDES IN SEAWATER AND SEDIMENT. *MARINE CHEMISTRY*, 57, 25–40. doi:10.1016/S0304-4203(97)00003-0
- PASSOW, U. (2002). PRODUCTION OF TRANSPARENT EXOPOLYMER PARTICLES (TEP) BY PHYTO- AND BACTERIOPLANKTON. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 236, 1–12. doi:10.3354/MEPS236001
- PASSOW, U. (2002). TRANSPARENT EXOPOLYMER PARTICLES (TEP) IN AQUATIC ENVIRONMENTS. *PROGRESS IN OCEANOGRAPHY*, 55, 287–333. doi:10.1016/S0079-6611(02)00138-6
- PEACOCK, M. B., & KUDELA, R. M. (2013). ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY DETECTED IN DISTINCT PHYTOPLANKTON COMMUNITIES IN THE NORTHERN GULF OF ALASKA. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 473, 79–90. doi:10.3354/MEPS10069
- PERNTHALER, A., PERNTHALER, J., & AMANN, R. (2002). FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION AND CATALYZED REPORTER DEPOSITION FOR THE IDENTIFICATION OF MARINE BACTERIA. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68, 3094–3101. doi:10.1128/AEM.68.6.3094
- PICKETT, S. T. (1989). SPACE-FOR-TIME SUBSTITUTION AS AN ALTERNATIVE TO LONG-TERM STUDIES. EN G. E. LIKENS (ED.), *LONG-TERM STUDIES IN ECOLOGY: APPROACHES AND ALTERNATIVES* (PÁGS. 110–135). NEW, YORK, NY: SPRINGER NEW YORK. doi:10.1007/978-1-4615-7358-6_5
- PINHASSI, J., AZAM, F., HEMPHÄLÄ, J., LONG, R. A., MARTINEZ, J., ZWEIFEL, U. L., & HAGSTRÖM, Å. (1999). COUPLING BETWEEN BACTERIOPLANKTON SPECIES COMPOSITION, POPULATION DYNAMICS, AND ORGANIC MATTER DEGRADATION. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 17, 13–26. doi:10.3354/AME017013
- PIONTEK, J., HÄNDEL, N., DE BODT, C., HARLAY, J., CHOU, L., & ENGEL, A. (2011). THE UTILIZATION OF POLYSACCHARIDES BY HETEROTROPHIC BACTERIOPLANKTON IN THE BAY OF BISCAY (NORTH ATLANTIC OCEAN). *JOURNAL OF PLANKTON RESEARCH*, 33, 1719–1735. doi:10.1093/PLANKT/FBR069
- PIONTEK, J., SPERLING, M., NÖTHIG, E. M., & ENGEL, A. (2014). REGULATION OF BACTERIOPLANKTON ACTIVITY IN FRAM STRAIT (ARCTIC OCEAN) DURING EARLY SUMMER: THE ROLE OF ORGANIC MATTER SUPPLY AND TEMPERATURE. *JOURNAL OF MARINE SYSTEMS*, 132, 83–94. doi:10.1016/J.JMARSYS.2014.01.003

- POLI, A., FINORE, I., ROMANO, I., GIOIELLO, A., LAMA, L., & NICOLAUS, B. (2017). MICROBIAL DIVERSITY IN EXTREME MARINE HABITATS AND THEIR BIOMOLECULES. *MICROORGANISMS*, 5, 25. DOI:10.3390/MICROORGANISMS5020025
- POLOVINA, J. J., DUNNE, J. P., WOODWORTH, P. A., & HOWELL, E. A. (2011). PROJECTED EXPANSION OF THE SUBTROPICAL BIOME AND CONTRACTION OF THE TEMPERATE AND EQUATORIAL UPWELLING BIOMES IN THE NORTH PACIFIC UNDER GLOBAL WARMING. *ICES JOURNAL OF MARINE SCIENCE*, 68, 986–995. DOI:10.1093/ICESJMS/FSQ198
- POLOVINA, J. J., HOWELL, E. A., & ABECASSIS, M. (2008). OCEAN'S LEAST PRODUCTIVE WATERS ARE EXPANDING. *GEOPHYSICAL RESEARCH LETTERS*, 35, 2–6. DOI:10.1029/2007GL031745
- POMMIER, T., CANBÄCK, B., RIEMANN, L., BOSTRÖM, K. H., SIMU, K., LUNDBERG, P., . . . HAGSTRÖM, Å. (2007). GLOBAL PATTERNS OF DIVERSITY AND COMMUNITY STRUCTURE IN MARINE BACTERIOPLANKTON. *MOLECULAR ECOLOGY*, 16, 867–880. DOI:10.1111/J.1365-294X.2006.03189.x
- PORTER, K. G., & FEIG, Y. S. (1980). THE USE OF DAPI FOR IDENTIFYING AND COUNTING AQUATIC MICROFLORA. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 25, 943–948. DOI:10.4319/LO.1980.25.5.0943
- PRESTON, C. M., DURKIN, C. A., & YAMAHARA, K. M. (2020). DNA METABARCODING REVEALS ORGANISMS CONTRIBUTING TO PARTICULATE MATTER FLUX TO ABYSSAL DEPTHS IN THE NORTH EAST PACIFIC OCEAN. *DEEP-SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 173, 104708. DOI:10.1016/J.DSR2.2019.104708
- RAVEN, J. A., & GEIDER, R. J. (1988). TEMPERATURE AND ALGAL GROWTH. *NEW PHYTOLOGIST*, 110, 441–461. DOI:10.1111/J.1469-8137.1988.TB00282.X
- REGAUDIE-DE-GIOUX, A., & DUARTE, C. M. (2012). TEMPERATURE DEPENDENCE OF PLANKTONIC METABOLISM IN THE OCEAN. *GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES*, 26, 1–10. DOI:10.1029/2010GB003907
- REINTHALER, T., VAN AKEN, H., VETH, C., ARÍSTEGUI, J., ROBINSON, C., WILLIAMS, P. J., . . . HERNDL, G. J. (2006). PROKARYOTIC RESPIRATION AND PRODUCTION IN THE MESO- AND BATHYPELAGIC REALM OF THE EASTERN AND WESTERN NORTH ATLANTIC BASIN. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 51, 1262–1273. DOI:10.4319/LO.2006.51.3.1262
- RIEBESSELL, U. (2004). EFFECTS OF CO₂ ENRICHMENT ON MARINE PHYTOPLANKTON. *JOURNAL OF OCEANOGRAPHY*, 60, 719–729. DOI:10.1007/s10872-004-5764-z
- RIEMANN, L., STEWARD, G. F., & AZAM, F. (2000). DYNAMICS OF BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITION AND ACTIVITY DURING A MESOCOSM DIATOM BLOOM. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 66, 578–587. DOI:10.1128/AEM.66.2.578-587.2000.UPDATED
- RUAN, Q., DUTTA, D., SCHWALBACH, M. S., STEELE, J. A., FUHRMAN, J. A., & SUN, F. (2006). LOCAL SIMILARITY ANALYSIS REVEALS UNIQUE ASSOCIATIONS AMONG MARINE BACTERIOPLANKTON SPECIES AND ENVIRONMENTAL FACTORS. *BIOINFORMATICS*, 22, 2532–2538. DOI:10.1093/BIOINFORMATICS/BTL417
- RUIZ-GONZÁLEZ, C., MESTRE, M., ESTRADA, M., SEBASTIÁN, M., SALAZAR, G., AGUSTÍ, S., . . . GASOL, J. M. (2020). MAJOR IMPRINT OF SURFACE PLANKTON ON DEEP OCEAN PROKARYOTIC STRUCTURE AND ACTIVITY. *MOLECULAR ECOLOGY*, 00, 1–19. DOI:10.1111/MEC.15454

- SALAZAR, G., PAOLI, L., ALBERTI, A., HUERTA-CEPAS, J., RUSCHEWEYH, H. J., CUENCA, M., . . . WINCKER, P. (2019). GENE EXPRESSION CHANGES AND COMMUNITY TURNOVER DIFFERENTIALLY SHAPE THE GLOBAL OCEAN METATRANSCRIPTOME. *CELL*, 179, 1068–1083.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.10.014
- SARMENTO, H., MONTOYA, J. M., VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., VAQUÉ, D., & GASOL, J. M. (2010). WARMING EFFECTS ON MARINE MICROBIAL FOOD WEB PROCESSES: HOW FAR CAN WE GO WHEN IT COMES TO PREDICTIONS? *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. SERIES B, BIOLOGICAL SCIENCES*, 365, 2137–49. doi:10.1098/rstb.2010.0045
- SARMENTO, H., MORANA, C., & GASOL, J. M. (2016). BACTERIOPANKTON NICHE PARTITIONING IN THE USE OF PHYTOPLANKTON-DERIVED DISSOLVED ORGANIC CARBON: QUANTITY IS MORE IMPORTANT THAN QUALITY. *THE ISME JOURNAL*. doi:10.1038/ismej.2016.66
- SARMENTO, H., ROMERA-CASTILLO, C., LINDH, M., PINHASSI, J., SALA, M. M., GASOL, J. M., . . . TAYLOR, G. T. (2013). PHYTOPLANKTON SPECIES-SPECIFIC RELEASE OF DISSOLVED FREE AMINO ACIDS AND THEIR SELECTIVE CONSUMPTION BY BACTERIA. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 58, 1123–1135. doi:10.4319/lo.2013.58.3.1123
- SARMIENTO, J. L., SLATER, R., BARBER, R., BOPP, L., DONEY, S. C., HIRST, A. C., . . . STOFFER, R. (2004). RESPONSE OF OCEAN ECOSYSTEMS TO CLIMATE WARMING. *GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES*, 18. doi:10.1029/2003GB002134
- SEVERIN, T., SAURET, C., BOUTRIF, M., DUHAUT, T., KESSOURI, F., ORIOL, L., . . . GHIGLIONE, J. F. (2016). IMPACT OF AN INTENSE WATER COLUMN MIXING (0–1500 M) ON PROKARYOTIC DIVERSITY AND ACTIVITIES DURING AN OPEN-OCEAN CONVECTION EVENT IN THE NW MEDITERRANEAN SEA. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 18, 4378–4390. doi:10.1111/1462-2920.13324
- SEYMOUR, J. R., AHMED, T., DURHAM, W. M., & STOCKER, R. (2010). CHEMOTACTIC RESPONSE OF MARINE BACTERIA TO THE EXTRACELLULAR PRODUCTS OF SYNECHOCOCCUS AND PROCHLOROCOCCUS. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 59, 161–168. doi:10.3354/ame01400
- SHANNON, P., MARKIEL, A., OZIER, O., BALIGA, N. S., WANG, J. T., RAMAGE, D., . . . IDEKER, T. (2003). CYTOSCAPE: A SOFTWARE ENVIRONMENT FOR INTEGRATED MODELS OF BIOMOLECULAR INTERACTION NETWORKS. *GENOME RESEARCH*, 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303
- SIMON, M., GROSSART, H.-P., SCHWEITZER, B., & PLOUG, H. (2002). MICROBIAL ECOLOGY OF ORGANIC AGGREGATES IN AQUATIC ECOSYSTEMS. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 28, 175–211. doi:10.3354/ame028175
- SINSABAUGH, R. L., & FOLLSTAD SHAH, J. J. (2012). ECOENZYMATIC STOICHIOMETRY AND ECOLOGICAL THEORY. *ANNUAL REVIEW OF ECOLOGY, EVOLUTION, AND SYSTEMATICS*, 43, 313–343. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160245
- SINSABAUGH, R. L., BELNAP, J., FINDLAY, S. G., SHAH, J. J., HILL, B. H., KUEHN, K. A., . . . WARNOCK, D. D. (2014). EXTRACELLULAR ENZYME KINETICS SCALE WITH RESOURCE AVAILABILITY. *BIOGEOCHEMISTRY*, 121, 287–304. doi:10.1007/s10533-014-0030-y
- SMITH, D. C., SIMON, M., ALLDREDGE, A. L., & AZAM, F. (1992). INTENSE HYDROLYTIC ENZYME ACTIVITY ON MARINE AGGREGATES AND IMPLICATIONS FOR RAPID PARTICLE DISSOLUTION. *LETTERS TO NATURE*, 359, 139–141.

- SMITH, K. L., RUHL, H. A., HUFFARD, C. L., MESSIÉ, M., & KAHRU, M. (2018). EPISODIC ORGANIC CARBON FLUXES FROM SURFACE OCEAN TO ABYSSAL DEPTHS DURING LONG-TERM MONITORING IN NE PACIFIC. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 115, 12235–12240. DOI:10.1073/PNAS.1814559115
- SOMERO, G. N. (2004). ADAPTATION OF ENZYMES TO TEMPERATURE: SEARCHING FOR BASIC "STRATEGIES". COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY - B BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 139, 321–333. DOI:10.1016/J.CBPC.2004.05.003
- SOMVILLE, M., & BILLEN, G. (1983). A METHOD FOR DETERMINING EXOPROTEOLYTIC ACTIVITY IN NATURAL WATERS. LIMNOLOGY & OCEANOGRAPHY, 28, 190–193.
- STAPELFELDT, H., PETERSEN, P. H., KRISTIANSEN, K. R., QVIST, K. B., & SKIBSTED, L. H. (1996). EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ENZYMIC HYDROLYSIS OF B-LACTOGLOBULIN B BY TRYPSIN, THERMOLYSIN AND PEPSIN. JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, 63, 111–118. DOI:10.1017/S0022029900031587
- STEELE, J. A., COUNTWAY, P. D., XIA, L., VIGIL, P. D., BEMAN, J. M., KIM, D. Y., . . . FUHRMAN, J. A. (2011). MARINE BACTERIAL, ARCHAEAL AND PROTISTAN ASSOCIATION NETWORKS REVEAL ECOLOGICAL LINKAGES. THE ISME JOURNAL, 5, 1414–25. DOI:10.1038/ISMEJ.2011.24
- STEEN, A. D., & ARNOSTI, C. (2011). LONG LIFETIMES OF B-GLUCOSIDASE, LEUCINE AMINOPEPTIDASE, AND PHOSPHATASE IN ARCTIC SEAWATER. MARINE CHEMISTRY, 123, 127–132. DOI:10.1016/J.MARCHEM.2010.10.006
- 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. 75, 271–281. DOI:10.3354/AME01755
- STEEN, A. D., ZIERVOGEL, K., & ARNOSTI, C. (2010). COMPARISON OF MULTIVARIATE MICROBIAL DATASETS WITH THE SHANNON INDEX: AN EXAMPLE USING ENZYME ACTIVITY FROM DIVERSE MARINE ENVIRONMENTS. ORGANIC GEOCHEMISTRY, 41, 1019–1021. DOI:10.1016/J.ORGGEOCHEM.2010.05.012
- STEINWEG, J. M., JAGADAMMA, S., FRERICHS, J., & MAYES, M. A. (2013). ACTIVATION ENERGY OF EXTRACELLULAR ENZYMES IN SOILS FROM DIFFERENT BIOMES. PLOS ONE, 8. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0059943
- STOCKER, R. (2012). MARINE MICROBES SEE A SEA OF GRADIENTS. SCIENCE, 338, 628–633. DOI:10.1126/SCIENCE.1208929
- STOCKER, R., & SEYMOUR, J. R. (2012). ECOLOGY AND PHYSICS OF BACTERIAL CHEMOTAXIS IN THE OCEAN. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS : MMBR, 76, 792–812. DOI:10.1128/MMBR.00029-12
- STONE, M. M., WEISS, M. S., GOODALE, C. L., ADAMS, M. B., FERNANDEZ, I. J., GERMAN, D. P., & ALLISON, S. D. (2012). TEMPERATURE SENSITIVITY OF SOIL ENZYME KINETICS UNDER N-FERTILIZATION IN TWO TEMPERATE FORESTS. GLOBAL CHANGE BIOLOGY, 18, 1173–1184. DOI:10.1111/J.1365-2486.2011.02545.X
- STUKEL, M. R., ALUWIHARE, L. I., BARBEAU, K. A., CHEKALYUK, A. M., GOERICKE, R., MILLER, A. J., . . . LANDRY, M. R. (2017). MESOSCALE OCEAN FRONTS ENHANCE CARBON EXPORT DUE TO GRAVITATIONAL SINKING AND SUBDUCTION. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 114, 1252–1257. DOI:10.1073/PNAS.1609435114

- SUNAGAWA, S., COELHO, L. P., CHAFFRON, S., KULTIMA, J. R., LABADIE, K., SALAZAR, G., . . . BORK, P. (2015). STRUCTURE AND FUNCTION OF THE GLOBAL OCEAN MICROBIOME. (E. BOSS, C. BOWLER, M. FOLLOWS, L. KARP-BOSS, U. KRZIC, E. G. REYNAUD, . . . D. VELAYOUDON, EDITS.) *SCIENCE*, 348. DOI:10.1126/SCIENCE.1261359
- SUTTLE, C. A. (2007). MARINE VIRUSES-MAJOR PLAYERS IN THE GLOBAL ECOSYSTEM. *NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY*, 5, 801–812. DOI:10.1038/NRMICRO1750
- SWAN, B. K., MARTINEZ-GARCIA, M., PRESTON, C. M., SCZYRBA, A., WOYKE, T., LAMY, D., . . . STEPANAUSKAS, R. (2011). POTENTIAL FOR CHEMOLITHOAUTOTROPHY AMONG UBIQUITOUS BACTERIA LINEAGES IN THE DARK OCEAN. *SCIENCE*, 333, 1296–300. DOI:10.1126/SCIENCE.1203690
- TALBOT, V., & BIANCHI, M. (1997). BACTERIAL PROTEOLYTIC ACTIVITY IN SEDIMENTS OF THE SUBANTARCTIC INDIAN OCEAN SECTOR. *DEEP-SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 44, 1069–1084. DOI:10.1016/S0967-0645(96)00107-5
- TAMBURINI, C., BOUTRIF, M., GAREL, M., COLWELL, R. R., & DEMING, J. W. (2013). PROKARYOTIC RESPONSES TO HYDROSTATIC PRESSURE IN THE OCEAN - A REVIEW. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 15, 1262–1274. DOI:10.1111/1462-2920.12084
- TAMBURINI, C., GARCIN, J., & BIANCHI, A. (2003). ROLE OF DEEP-SEA BACTERIA IN ORGANIC MATTER MINERALIZATION AND ADAPTATION TO HYDROSTATIC PRESSURE CONDITIONS IN THE NW MEDITERRANEAN SEA. *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 32, 209–218. DOI:10.3354/AME032209
- TAMBURINI, C., GARCIN, J., RAGOT, M., & BIANCHI, A. (2002). BIOPOLYMER HYDROLYSIS AND BACTERIAL PRODUCTION UNDER AMBIENT HYDROSTATIC PRESSURE THROUGH A 2000 M WATER COLUMN IN THE NW MEDITERRANEAN. *DEEP SEA RESEARCH PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 49, 2109–2123. DOI:10.1016/S0967-0645(02)00030-9
- 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 PART II: TOPICAL STUDIES IN OCEANOGRAPHY*, 56, 700–712. DOI:10.1016/J.DSR2.2008.07.021
- TANAKA, T., HENRIKSEN, P., LIGNELL, R., OLLI, K., SEPPÄLÄ, J., TAMMINEN, T., & THINGSTAD, T. F. (2006). SPECIFIC AFFINITY FOR PHOSPHATE UPTAKE AND SPECIFIC ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY AS DIAGNOSTIC TOOLS FOR DETECTING PHOSPHORUS-LIMITED PHYTOPLANKTON AND BACTERIA. *ESTUARIES AND COASTS*, 29, 1226–1241. DOI:10.1007/BF02781823
- TAUCHER, J., SCHULZ, K. G., DITTMAR, T., SOMMER, U., OSCHLIES, A., & RIEBESELL, U. (2012). ENHANCED CARBON OVERCONSUMPTION IN RESPONSE TO INCREASING TEMPERATURES DURING A MESOCOSM EXPERIMENT. *BIOGEOSCIENCES*, 9, 3531–3545. DOI:10.5194/BG-9-3531-2012
- TEELING, H., FUCHS, B. M., BECHER, D., KLOCKOW, C., GARDEBRECHT, A., BENNKE, C. M., . . . AMANN, R. (2012). SUBSTRATE-CONTROLLED SUCCESSION OF MARINE BACTERIOPLANKTON POPULATIONS INDUCED BY A PHYTOPLANKTON BLOOM. *SCIENCE*, 336, 608–611. DOI:10.1126/SCIENCE.1218344
- TEELING, H., FUCHS, B. M., BENNKE, C. M., KRÜGER, K., CHAFEE, M., KAPPELMANN, L., . . . AMANN, R. (2016). RECURRING PATTERNS IN BACTERIOPLANKTON DYNAMICS DURING COASTAL SPRING ALGAE BLOOMS. *eLIFE*, 5, 1–31. DOI:10.7554/eLIFE.11888

- THOLOSAN, O., LAMY, F., GARCIN, J., POLYCHRONAKI, T., & BIANCHI, A. (1999). BIPHASIC EXTRACELLULAR PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITY IN BENTHIC WATER AND SEDIMENT IN THE NORTHWESTERN MEDITERRANEAN SEA. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 65, 1619–1626.
- THOMSON, B., HEPBURN, C. D., LAMARE, M., & BALTAR, F. (2017). TEMPERATURE AND UV LIGHT AFFECT THE ACTIVITY OF MARINE CELL-FREE ENZYMES. *BIOGEOSCIENCES DISCUSSIONS*, 14, 3971–3977. doi:10.5194/bg-2017-29
- THOMSON, B., WENLEY, J., CURRIE, K., HEPBURN, C., HERNDL, G. J., & BALTAR, F. (2019). RESOLVING THE PARADOX: CONTINUOUS CELL-FREE ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY DESPITE HIGH PHOSPHATE CONCENTRATIONS. *MARINE CHEMISTRY*, 214, 103671. doi:10.1016/j.marchem.2019.103671
- THORNTON, D. C. (2014). DISSOLVED ORGANIC MATTER (DOM) RELEASE BY PHYTOPLANKTON IN THE CONTEMPORARY AND FUTURE OCEAN. *EUROPEAN JOURNAL OF PHYCOLOGY*, 49, 20–46. doi:10.1080/09670262.2013.875596
- TISCHER, A., BLAGODATSKAYA, E., & HAMER, U. (2015). MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AND RESOURCE AVAILABILITY DRIVE THE CATALYTIC EFFICIENCY OF SOIL ENZYMES UNDER LAND-USE CHANGE CONDITIONS. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 89, 226–237. doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.011
- TRASAR-CEPEDA, C., GIL-SOTRES, F., & LEIRÓS, M. C. (2007). THERMODYNAMIC PARAMETERS OF ENZYMES IN GRASSLAND SOILS FROM GALICIA, NW SPAIN. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 39, 311–319. doi:10.1016/j.soilbio.2006.08.002
- TRAVING, S. J., THYGESEN, U. H., RIEMANN, L., & STEDMON, C. A. (2015). A MODEL OF EXTRACELLULAR ENZYMES IN FREE-LIVING MICROBES: WHICH STRATEGY PAYS OFF? *APPL ENVIRON MICROBIOL*. doi:10.1128/AEM.02070-15
- TREUSCH, A. H., VERGIN, K. L., FINLAY, L. A., DONATZ, M. G., BURTON, R. M., CARLSON, C. A., & GIOVANNONI, S. J. (2009). SEASONALITY AND VERTICAL STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITIES IN AN OCEAN GYRE. *THE ISME JOURNAL*, 3, 1148–63. doi:10.1038/ISMEJ.2009.60
- UNANUE, M., AYO, B., AGIS, M., SLEZAK, D., HERNDL, G. J., & IRIBERRI, J. (1999). ECTOENZYMATIC ACTIVITY AND UPTAKE OF MONOMERS IN MARINE BACTERIOPANKTON DESCRIBED BY A BIPHASIC KINETIC MODEL. *MICROBIAL ECOLOGY*, 37, 36–48. doi:10.1007/s002489900128
- UNANUE, M., AZÚA, I., ARRIETA, J. M., HERNDL, G. J., & IRIBERRI, J. (1998). LABORATORY-MADE PARTICLES AS A USEFUL APPROACH TO ANALYSE MICROBIAL PROCESSES IN MARINE MACROAGGREGATES. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*, 26, 325–334. doi:10.1016/S0168-6496(98)00048-8
- VAQUER-SUNYER, R., & DUARTE, C. M. (2013). EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE RESPONSE OF COASTAL MEDITERRANEAN PLANKTONIC AND BENTHIC METABOLISM TO WARMING. *ESTUARIES AND COASTS*, 36, 697–707. doi:10.1007/s12237-013-9595-2
- VAQUER-SUNYER, R., DUARTE, C. M., SANTIAGO, R., WASSMANN, P., & REIGSTAD, M. (2010). EXPERIMENTAL EVALUATION OF PLANKTONIC RESPIRATION RESPONSE TO WARMING IN THE EUROPEAN ARCTIC SECTOR. *POLAR BIOLOGY*, 33, 1661–1671. doi:10.1007/s00300-010-0788-x
- VARELA, M. (1996). PHYTOPLANKTON ECOLOGY IN THE BAY OF BISCAY. *CIRCULATION*, 60, 45–53. OBTENIDO DE [HTTP://WWW.ICM.CSIC.ES/SCIMAR/PDF/60/SM60S2045.PDF](http://www.icm.csic.es/scimar/pdf/60/sm60s2045.pdf)

- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., VAQUÉ, D., & GASOL, J. M. (2007). OCEAN WARMING ENHANCES RESPIRATION AND CARBON DEMAND OF COASTAL MICROBIAL PLANKTON. *GLOBAL CHANGE BIOLOGY*, 13, 1327–1334. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01377.x
- VERDUGO, P. (2012). MARINE MICROGELS. *ANNUAL REVIEW OF MARINE SCIENCE*, 4, 375–400. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142759
- VERDUGO, P., ALLDREDGE, A. L., AZAM, F., KIRCHMAN, D. L., PASSOW, U., & SANTSCHI, P. H. (2004). THE OCEANIC GEL PHASE: A BRIDGE IN THE DOM-POM CONTINUUM. *MARINE CHEMISTRY*, 92, 67–85. doi:10.1029/2002GL016046
- VERDUGO, P., ORELLANA, M. V., CHIN, W. C., PETERSEN, T. W., VAN DEN ENG, G., BENNER, R., & HEDGES, J. I. (2008). MARINE BIOPOLYMER SELF-ASSEMBLY: IMPLICATIONS FOR CARBON CYCLING IN THE OCEAN. *FARADAY DISCUSSIONS*, 139, 393–398. doi:10.1039/b800149a
- VETTER, Y.-A., DEMING, J. W., JUMARS, P. A., & KRIEGER-BROCKETT, B. B. (1998). A PREDICTIVE MODEL OF BACTERIAL FORAGING BY MEANS OF FREELY RELEASED EXTRACELLULAR ENZYMES. *MICROBIAL ECOLOGY*, 36, 75–92. doi:10.1007/s002489900095
- VIDAL, M., DUARTE, C. M., AGUSTÍ, S., GASOL, J. M., & VAQUÉ, D. (2003). ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES IN THE CENTRAL ATLANTIC OCEAN INDICATE LARGE AREAS WITH PHOSPHORUS DEFICIENCY. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 262, 43–53. doi:10.3354/meps262043
- VILLACORTE, L. O., EKOWATI, Y., NEU, T. R., KLEIJN, J. M., WINTERS, H., AMY, G., . . . KENNEDY, M. D. (2015). CHARACTERISATION OF ALGAL ORGANIC MATTER PRODUCED BY BLOOM-FORMING MARINE AND FRESHWATER ALGAE. *WATER RESEARCH*, 73, 216–230. doi:10.1016/j.watres.2015.01.028
- VRBA, J., NEDOMA, J., & FILANDR, P. (1996). RESOLVING COMPLEX SATURATION KINETICS: A POTENTIAL TOOL IN INTERPRETATION OF EXTRACELLULAR B-N-ACETYLHEXOSAMINIDASE DATA FROM NATURAL FRESHWATERS. *CHITIN ENZYMOLOGY*, 2, 303–311.
- WALLENSTEIN, M. D., MCMAHON, S. K., & SCHIMEL, J. P. (2009). SEASONAL VARIATION IN ENZYME ACTIVITIES AND TEMPERATURE SENSITIVITIES IN ARCTIC TUNDRA SOILS. *GLOBAL CHANGE BIOLOGY*, 15, 1631–1639. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01819.x
- WALLNER, G., AMANN, R., & BEISKER, W. (1993). OPTIMIZING FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION WITH rRNA-TARGETED OLIGONUCLEOTIDE PROBES FOR FLOW CYTOMETRIC IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS. *CYTOMETRY*, 14, 136–143. doi:10.1002/cyto.990140205
- WANG, G., POST, W. M., MAYES, M. A., FRERICHS, J. T., & SINDHU, J. (2012). PARAMETER ESTIMATION FOR MODELS OF LIGNINOLYTIC AND CELLULOLYTIC ENZYME KINETICS. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 48, 28–38. doi:10.1016/j.soilbio.2012.01.011
- WEI, H., GUENET, B., VICCA, S., NUNAN, N., ABDELGAWAD, H., POUTEAU, V., . . . JANSSENS, I. A. (2014). THERMAL ACCLIMATION OF ORGANIC MATTER DECOMPOSITION IN AN ARTIFICIAL FOREST SOIL IS RELATED TO SHIFTS IN MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, 71, 1–12. doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.003
- WEISS, M. S., ABELE, U., WECKESSER, J., WELTE, W., SCHILTZ, E., & SCHULZ, G. E. (1991). MOLECULAR ARCHITECTURE AND ELECTROSTATIC PROPERTIES OF A BACTERIAL PORIN. *SCIENCIE*, 254, 1627–1630.

- WETZ, M. S., & WHEELER, P. A. (2007). RELEASE OF DISSOLVED ORGANIC MATTER BY COASTAL DIATOMS. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 52, 798–807. DOI:10.4319/Lo.2007.52.2.0798
- WETZEL, R. G. (1991). EXTRACELLULAR ENZYMATIC INTERACTIONS: STORAGE, REDISTRIBUTION, AND INTERSPECIFIC COMMUNICATION. EN R. J. CHRÓST (ED.), *MICROBIAL ENZYMES IN AQUATIC ENVIRONMENTS* (PÁGS. 6–28). NEW, YORK, NY: SPRINGER NEW YORK. DOI:10.1007/978-1-4612-3090-8_2
- WHITFIELD, C. (2006). BIOSYNTHESIS AND ASSEMBLY OF CAPSULAR POLYSACCHARIDES IN *ESCHERICHIA COLI*. *ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY*, 75, 39–68. DOI:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142545
- WILKINS, D., VAN SEBILLE, E., RINTOUL, S. R., LAURO, F. M., & CAVICCHIOLI, R. (2013). ADVECTION SHAPES SOUTHERN OCEAN MICROBIAL ENVIRONMENT EFFECTS. *NATURE COMMUNICATIONS*, 4, 1–7. DOI:10.1038/ncomms3457
- WILLIAMS, P. J. (1973). THE VALIDITY OF THE APPLICATION OF SIMPLE KINETIC ANALYSIS TO HETEROGENEOUS MICROBIAL POPULATIONS. *LIMNOL. AND OCEANOGR.*, 18, 159–165.
- WILLIAMS, T. J., LAURO, F. M., ERTAN, H., BURG, D. W., POLJAK, A., RAFTERY, M. J., & CAVICCHIOLI, R. (2011). DEFINING THE RESPONSE OF A MICROORGANISM TO TEMPERATURES THAT SPAN ITS COMPLETE GROWTH TEMPERATURE RANGE (-2°C TO 28°C) USING MULTIPLEX QUANTITATIVE PROTEOMICS. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 13, 2186–2203. DOI:10.1111/j.1462-2920.2011.02467.x
- WOHLERS-ZÖLLNER, J., BREITHAUPT, P., WALTHER, K., JÜRGENS, K., & RIEBESELL, U. (2011). TEMPERATURE AND NUTRIENT STOICHIOMETRY INTERACTIVELY MODULATE ORGANIC MATTER CYCLING IN A PELAGIC ALGAL-BACTERIAL COMMUNITY. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY*, 56, 599–610. DOI:10.4319/Lo.2011.56.2.0599
- ZARK, M., & DITTMAR, T. (2018). UNIVERSAL MOLECULAR STRUCTURES IN NATURAL DISSOLVED ORGANIC MATTER. *NATURE COMMUNICATIONS*, 9, 1–8. DOI:10.1038/s41467-018-05665-9
- ZARK, M., CHRISTOFFERS, J., & DITTMAR, T. (2017). MOLECULAR PROPERTIES OF DEEP-SEA DISSOLVED ORGANIC MATTER ARE PREDICTABLE BY THE CENTRAL LIMIT THEOREM: EVIDENCE FROM TANDEM FT-ICR-MS. *MARINE CHEMISTRY*, 191, 9–15. DOI:10.1016/j.marchem.2017.02.005
- ZHAO, Z., BALTAR, F., & HERNDL, G. J. (2020). LINKING EXTRACELLULAR ENZYMES TO PHYLOGENY INDICATES A PREDOMINANTLY PARTICLE-ASSOCIATED LIFESTYLE OF DEEP-SEA PROKARYOTES. *SCIENCE ADVANCES*, 6, 1–11. DOI:10.1126/SCIADV.AAZ4354
- ZIERVOGEL, K., & ARNOSTI, C. (2008). POLYSACCHARIDE HYDROLYSIS IN AGGREGATES AND FREE ENZYME ACTIVITY IN AGGREGATE-FREE SEAWATER FROM THE NORTH-EASTERN GULF OF MEXICO. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 10, 289–299. DOI:10.1111/j.1462-2920.2007.01451.x
- ZIERVOGEL, K., KARLSSON, E., & ARNOSTI, C. (2007). SURFACE ASSOCIATIONS OF ENZYMES AND OF ORGANIC MATTER: CONSEQUENCES FOR HYDROLYTIC ACTIVITY AND ORGANIC MATTER REMINERALIZATION IN MARINE SYSTEMS. *MARINE CHEMISTRY*, 104, 241–252. DOI:10.1016/j.marchem.2006.12.001
- ZIERVOGEL, K., STEEN, A. D., & ARNOSTI, C. (2010). CHANGES IN THE SPECTRUM AND RATES OF EXTRACELLULAR ENZYME ACTIVITIES IN SEAWATER FOLLOWING AGGREGATE FORMATION. *BIOGEOSCIENCES*, 7, 1007–1015. DOI:10.5194/bg-7-1007-2010

