



TESIS DOCTORAL

Ainhoa Uranga Larralde

BIODIVERSIDAD MICROBIANA EN EL CANTÁBRICO ORIENTAL

Leioa, 2021

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

TESIS DOCTORAL

Biodiversidad microbiana en el Cantábrico oriental

Ainhoa Uranga Larralde

SUPERVISORES:

Dra. María Begoña Ayo Millán

Dr. Iñigo Azúa Pérez

Dr. Juan Iriberry Ramalle



LEIOA, 2021

AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar agradeciendo con estas líneas a todos los que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. Agradecer en primer lugar a mis directores iniciales, Juan y Begoña. Gracias por darme la oportunidad de colaborar en el laboratorio siendo estudiante y hacer que me picara el gusanillo de la ciencia, por brindarme el apoyo necesario y formarme como investigadora. Mención especial a mi tercer director de tesis, Iñigo, por recoger el testigo cuando Juan se jubiló. Gracias a los tres por la dedicación mostrada durante la realización de este trabajo.

A Itxaso y Marian, por ayudarme en las largas jornadas de muestreo y en el día a día del laboratorio. Siempre listas para echar una mano con una sonrisa. A Txetxu, por enseñarme las técnicas moleculares con las que he podido realizar esta tesis.

Zuriñeri, laborategian ikasle bezala sartu nintzenez eta laborategian lan egiten ikasi bitartean erakutsi zenidan pazientziagatik, baita laginketetan parte hartu eta laguntzeagatik.

Naiarari, ikasle bezala ezagutu genuen elkar eta lankide moduan jarraitu genuen laborategian. Lan hau aurrera ateratzeko behar dudan indarra izan zara momentu askotan. Gainera lankidea izateaz gain, harroki esan dezaket benetako laguna zarela (BIKIA?), momentu on eta txarretan nire alboan egon baitzara eta ziur nago hemendik aurrera ere momentu berezi asko elkarrekin partekatuko ditugula.

Olatz, eskerrik asko beti behar izan zaitudanean alboan egoteagatik. Zure irribarreak eta umore onak alaitu didalako bide luze hau. Eskerrik asko aholku eta emandako babesagatik.

Idoia, ezagutu ginenetik lagun moduan sentitu zintudan. Eskerrik asko izan ditugun elkarrizketengatik eta elkarrekin egindako txango eta bidaiengatik. Oraindik pendiente daukagu mendi irteera, ez zait ahaztu.

Aitziber (amoo!!!), zer esan, mila esker beti laguntzeko prest egon zarelako eta baita zure abestiekin egunak alaitu dizkidazulako.

Eskerrik asko benetan, lankideak izateaz gain, urte hauetan niretzako bereziak izan zaretelako eta izaten jarraituko duzutelako, benetako LAGUNAK. Bidaia, bixita, afari, aholku eta mila elkarrizketa elkarbanatu ditugulako. Ez inoiz aldatu, kristonak zarete!

A mis compañeros de Hongos (Andoni, Xabi, Aize, Ana, Leire, Leire, Uxue, Jimena, Nerea, Lorea) y Plásmidos (Idoia, Maite, Mikel), por estar ahí siempre que he necesitado algún consejo o ayuda. A todos los que han pasado en algún momento por el laboratorio, gracias, en especial a Iraide por salvarnos en más de una ocasión.

Amaya, Hodei, Esti, Jasone eta Markel, eskerrik asko, elkarrekin bizi izan ditugun uneengatik, eta zuen laguntzagatik. Zuen partetik "erokeri" honetan jarraitzeko babesa jaso dudalako.

Izeba-osabei eta bereziki zuri izeba Joxepa. Bide hau zu gabe ia ezinezkoa izango zen. Eskerrik asko nire alboan egoteagatik eta beti laguntzeagatik. Kostata bada ere, gure hitza bete dugu!

Ekhi, badakizu neretzat lehengusua baino ahizpa bat zarela eta horrekin dena esanda dago, eskerrik asko bihotzez. Nire hilobari, Zuhatz, une zailtan beti alaitzea lortzen duzulako.

Beti egon zarete nire alboan laguntzeko prest, une txar guztietan (tamalez, gehiegi bizi izan ditugu horrelakoak) indarra eta babesua ematen, eta ziur nere une berezi eta alaietan ere hor egongo zaretela.

Aita, zer esan zuri, eskerrik asko gorabeheraz beteriko bide luze honetan laguntzeagatik, alboan egoteagatik eta erakutsi didazun pazientzia eta babesagatik. Zu gabe ez dut uste bukaerara iristea lortuko nuenik.

Atal berezia zuretzat ama, nahiz eta dagoeneko ez zauden gurekin izatez, beti alboan zaitut eta zin egin nizun bezala, nahiz askotan amore emateko gogoak izan ditudan, aurrera jarraitu eta bukatzea lortu dut. Zure indarra beti alboan sentitu dut. Zure omenez!

A todas las personas que de una forma u otra he conocido a largo de esta etapa y que de alguna manera han hecho que sea la persona que soy hoy, muchas gracias.

Hondarribia, 2021

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda del Programa Predoctoral para la Formación de Personal Investigador No Doctor concedida por la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) en 2010. El trabajo presentado aquí ha sido financiado por los proyectos “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 (CTM210-19308) y “Enzimas Extracelulares y Cambio Climático en Aguas Costeras (ENZIMA)” del Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2016-75699-R) del Gobierno de España, así como por las ayudas a grupos de investigación GIU07/30, GIU10/17 y GIU17/43 de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea. Los autores agradecen el apoyo técnico y humano de los SGIker de la UPV/EHU.

RESUMEN

La relación entre la composición taxonómica de la comunidad bacteriana y su actividad en el espacio y tiempo es uno de los principales temas de estudio en el campo de la ecología microbiana, debido a la relevancia del bacterioplancton en el funcionamiento del océano global. Por ello, este trabajo se ha centrado en el estudio de la composición taxonómica de la comunidad bacteriana en aguas superficiales de un sistema marino costero del Mar Cantábrico oriental durante un periodo plurianual, para el que se utilizaron una combinación de diferentes técnicas moleculares y frecuencias de muestreo. Los resultados mostraron dos situaciones estacionales claramente diferenciadas: invierno, con dominancia de *Alfaproteobacteria*, y verano, con dominancia de *Bacteroidetes*. Ambas situaciones se conectaron mediante dos momentos de transición, en abril y septiembre, en los que ocurrieron cambios significativos en la composición y eficiencia de crecimiento de las comunidades bacterianas. En este sistema marino se detectó la coexistencia de tres comunidades bacterianas diferenciadas por su hábitat: la comunidad de bacterias adheridas a partículas, la comunidad de bacterias de vida libre y la comunidad mixta. La composición taxonómica de las tres comunidades fue muy específica del hábitat colonizado y mostró una marcada estacionalidad de OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) abundantes. Los factores que provocaron el cambio en la composición de cada comunidad fueron distintos, ya que los impulsores del cambio en la comunidad de bacterias adheridas a partículas fueron la concentración de clorofila *a*, la depredación por los nanoflagelados heterótrofos y la lisis vírica, y en la comunidad de bacterias de vida libre fueron la temperatura del sistema y la concentración de materia orgánica disuelta fluorescente de tipo proteico. El muestreo intensivo reveló que la variabilidad intrasituaciones de ciertas variables y grupos filogenéticos fue incluso superior al detectado en periodos largos de tiempo (entre situaciones). Por último, y en el contexto de calentamiento global del planeta, se estudió la sensibilidad a la temperatura de varias actividades de tres bacterias que fueron detectadas recurrentemente en las distintas situaciones que atraviesa este sistema costero. La actividad que mostró mayor sensibilidad a la temperatura en las tres bacterias fue la respiración, lo que permite predecir un incremento en la transferencia de CO₂ a la atmósfera. Asimismo, la sensibilidad a la temperatura de las distintas actividades de las tres bacterias fue heterogénea, lo que predice posibles cambios en la composición de la comunidad de bacterias naturales en respuesta a un aumento de la temperatura superficial del sistema costero.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
Evolución del estudio de la composición de las comunidades microbianas.....	3
Hibridación de Fluorescencia <i>In Situ</i> (FISH, Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization) y CARD-FISH, Catalysed Reported Deposition Fluorescent <i>In-Situ</i> Hybridization).....	5
Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).....	6
Análisis Automático del Espaciador Ribosómico Intergénico (ARISA).....	7
Bacterias adheridas a partículas y bacterias de vida libre.....	8
Estacionalidad de la composición del bacterioplancton marino.....	10
Sensibilidad térmica de las bacterias marinas.....	12
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Composición de la comunidad microbiana y variables ambientales.....	21
Área de estudio y estrategia de muestreo	21
Temperatura, salinidad y minutos de luz	23
Concentración de nutrientes inorgánicos: nitrato (NO ₃ ⁻), fosfato (PO ₄ ³⁻) y silicato (SiO ₄ ⁴⁻) ..	23
Concentración de materia orgánica fluorescente disuelta (MOFD).....	23
Concentración de carbono orgánico disuelto (COD)	24
Concentración de clorofila <i>a</i>	24
Densidades microbianas.....	24
Producción bacteriana (PB)	26
Respiración bacteriana (RB)	26
Demanda bacteriana de carbono (DBC) y eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) ..	26
CARD-FISH (Catalysed Reported Deposition-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)	27
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	27
ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).....	29
Análisis estadístico.....	30
Efecto de la temperatura en tres bacterias seleccionadas	31
Descripción de las bacterias estudiadas.....	31
Conservación y mantenimiento de las bacterias	32
Estrategia experimental.....	33
Fase I, Preparación y obtención del inóculo	34
Fase II, Preparación de los cultivos de agua de mar.....	35
Fase III, Determinación de las actividades	35
Producción bacteriana.....	35
Respiración bacteriana.....	36

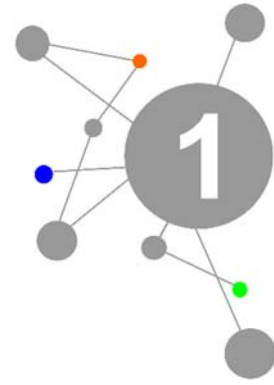
Medida de actividades enzimáticas extracelulares	37
Fase IV, Sensibilidad a la temperatura de las actividades bacterianas.....	38
Análisis estadístico	38
CAPÍTULO 1: Estudio plurianual de la composición y diversidad de la comunidad bacteriana.	39
Justificación y objetivos	41
Resultados.....	41
Caracterización del ciclo estacional de la estación costera de Armintza	41
Composición de la comunidad bacteriana	45
Relación entre la composición de la comunidad bacteriana y las variables estudiadas ..	53
Discusión	59
CAPÍTULO 2: Variabilidad de la composición de la comunidad bacteriana marina a corto plazo.....	71
Justificación y objetivos	73
Resultados.....	74
Caracterización fisicoquímica de la estación costera de Armintza mediante muestreo intensivo.....	74
Caracterización biológica de la estación costera de Armintza mediante muestreo intensivo	76
Organismos fototróficos	76
Partículas víricas	76
Nanoflagelados heterótrofos	77
Bacterias	77
Densidad bacteriana	77
Composición de la comunidad bacteriana	78
Caracterización de la fisiología heterótrofa bacteriana.....	88
Relaciones entre la composición y la fisiología heterótrofa bacteriana y variables abióticas y bióticas	89
Relaciones entre la composición y variables abióticas y bióticas.....	89
Relaciones entre la fisiología bacteriana y variables abióticas y bióticas.....	91
Discusión	92
CAPÍTULO 3: Estudio de la sensibilidad térmica en tres bacterias modelo	101
Justificación y objetivos	103
Resultados.....	104
Bacterias marinas representativas de la comunidad bacteriana de la estación costera de Armintza.....	104
Actividades bacterianas	105
Comparación de velocidades específicas de las tres bacterias a 12 °C y 20 °C.....	105
Comparación con la comunidad natural.....	107
Sensibilidad de la actividad bacteriana a la temperatura.....	109

Discusión	110
DISCUSIÓN GENERAL	121
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
MATERIAL SUPLEMENTARIO	159

LISTADO DE ABREVIATURAS

Act	<i>Actinobacteria</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
Alf	<i>Alfaproteobacteria</i>
AMA	Agua de mar artificial
ARISA	Análisis automático del espaciador intergénico (Automated ribosomal intergenic spacer analysis)
ANOSIM	Análisis de semejanzas (Analysis of similarities)
ANOVA	Análisis de la varianza (Analysis of variance)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATC	Ácido tricloroacético
Bet	<i>Betaproteobacteria</i>
BLAST	Buscador de alineamiento (Basic local alignment search tool)
Brdt	<i>Bacteroidetes</i>
CARD-FISH	Hibridación <i>in situ</i> catalizada por deposición de fluorescencia (Catalysed reported deposition-fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
CCA	Análisis de correspondencia canónica (Canonical correspondence analysis)
CL a	Clorofila a
COD	Carbono orgánico disuelto
cv	Coefficiente de variación
DAPI	4'6'-diamidino-2phenyl-indol
DB AD	Densidad bacteriana de bacterias adheridas a partículas
DBC	Demanda bacteriana de carbono
DB LI	Densidad bacteriana de bacterias de vida libre
DB total	Densidad bacteriana total
Des	Desconocido
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (Denaturing gradient gel electrophoresis)
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_a	Energía de activación
ECB	Eficiencia de crecimiento bacteriana
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
e.e	Error estándar
Eub	<i>Eubacteria</i>
FA	Fosfatasa alcalina
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
Gam	<i>Gammaproteobacteria</i>
HRP	Peroxidasa de rábano (Horseradish-peroxidase)

HUM	Fracción húmica de la materia orgánica fluorescente disuelta
I	Invierno
IPCC	Panel intergubernamental del cambio climático (Intergovernmental panel on climate change)
ITS	Región intergénica (Internal transcribed spacer)
K_m	Constante de saturación de Michaelis-Menten
LAP	Leucina aminopeptidasa
LB	Caldo Luria (Luria-broth)
LBSS	Caldo Luria con sales marinas (Luria-broth with sea salts)
LS	Correlación de similitud local (Local similarity correlations)
LSA	Análisis de similitud local (Local similarity analysis)
MA	Agar marino (Marine agar)
MCA	7-amino-4-metilcumarina
ML	Minutos de luz
MOFD	Materia orgánica fluorescente disuelta
MUF	4-metilumbeliferona
NFH	Nanoflagelado heterótrofo
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric multidimensional scaling)
OTU	Unidad taxonómica operacional (Operational taxonomic unit)
PB	Producción bacteriana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
<i>Pro</i>	<i>Prochlorococcus</i>
PROT	Fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta
PV	Partículas víricas
<i>Syn</i>	<i>Synechococcus</i>
QSU	Unidades de sulfato de quinina (Quinine sulfate units)
RB	Respiración bacteriana
retr	Retraso
RPD	Base de datos ribosómico (Ribosomal database project)
T	Transición
T^a	Temperatura
TAE	Tris-acetato-ácido etilendiaminotetraacético
TEP	Partículas exopoliméricas transparentes (Transparent exopolymeric particles)
T-RFLP	Análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (Terminal restriction fragment length polymorphism)
UPV/EHU	Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea
UV	Ultravioleta
V	Verano
V_{max}	Velocidad máxima de la reacción enzimática



INTRODUCCIÓN

1 Evolución del estudio de la composición de las comunidades microbianas

Las bacterias heterótrofas marinas constituyen la mayor biomasa viva de los océanos (Morán *et al.*, 2017) y tienen un papel importante en la comunidad planctónica oceánica, ya que son organismos clave en los ciclos biogeoquímicos (Huete-Stauffer *et al.*, 2015) y los mayores responsables de remineralizar la materia orgánica (Azam *et al.*, 1983). La materia orgánica disuelta presente en el mar puede estar formada por compuestos de bajo o alto peso molecular. La materia orgánica de bajo peso molecular es rápidamente consumida por las bacterias, ya que la pueden incorporar directamente; mientras que para poder utilizar las moléculas de alto peso molecular, las bacterias deben descomponerlas mediante enzimas extracelulares de diferente naturaleza, que hidrolizan macromoléculas ricas en carbono, nitrógeno y fósforo, y generan moléculas pequeñas fácilmente utilizables por el bacterioplancton (Arnosti *et al.*, 2005) así como por los productores primarios (Fuentes-Lema *et al.*, 2018). Los procesos subsiguientes de utilización de la materia orgánica son por un lado, la asimilación para generar nueva biomasa bacteriana (producción secundaria) y la oxidación para generar energía (respiración) (del Giorgio *et al.*, 2006). Por ello, las bacterias tienen un papel importante en el denominado bucle microbiano (Azam *et al.*, 1983). A pesar de que cada vez hay más estudios de las comunidades bacterianas desde el punto de vista funcional, metabólico, y sobre su composición, distribución y diversidad, sigue siendo un reto conocer no solo qué bacterias se encuentran presentes en el ecosistema en una situación dada, sino también qué hace cada tipo particular de bacteria y cómo interactúa con el medio ambiente (Fuhrman y Steele, 2008).

Desde que Antony van Leeuwenhoek observó por primera vez microorganismos procariotas vivos, el avance en el conocimiento sobre los microorganismos y sus interacciones con el medio ambiente y otros organismos ha dependido en gran medida de la tecnología disponible en la comunidad científica (Cleary *et al.*, 2012). Los inicios de la caracterización de la composición de la comunidad bacteriana del medio marino fueron llevados a cabo por Zoëll (1946), quien identificó especies bacterianas marinas que previamente había cultivado y aislado. Aunque esta metodología se sigue usando y es de utilidad en determinado tipo de estudios, presenta el grave problema de que aproximadamente el 99 % de los miembros de la comunidad bacteriana marina no son cultivables por medios tradicionales (Amann *et al.*, 1995; Polymenakou *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2011). Durante mucho tiempo, la imposibilidad de conseguir el crecimiento de las especies bacterianas marinas más numerosas e importantes ecológicamente en los medios de cultivo diseñados, incluso en aquellos en los que su composición es similar al del medio marino (Suzuki *et al.*, 1997), dificultó la comprensión de la genética y fisiología bacteriana, así como de su ecología (Woese *et al.*, 1990; Khandeparker *et al.*, 2017).

Este enfoque de estudio de las comunidades bacterianas cambió con lo que se ha denominado la revolución molecular de la ecología bacteriana. Fue a finales de la década de los 70 cuando Woese y Fox (1977) propusieron una metodología basada en la comparación de secuencias del

ARNr 16S que permitió agrupar a las bacterias con un criterio filogenético, independiente de las características morfológicas y bioquímicas que se habían utilizado previamente para clasificar las bacterias. Una década después, investigadores del grupo de Pace (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986) desarrollaron la metodología para estudiar la composición de las comunidades bacterianas naturales mediante la secuenciación de genes clonados directamente a partir de la biomasa, y comenzaron a usar las secuencias de ARNr 16S para identificar bacterias en comunidades mixtas sin necesidad de cultivarlas. A medida que se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación se hizo más fácil, la clonación y secuenciación de genes codificadores de ARNr 16S permitió realizar análisis más detallados de las comunidades bacterianas (Giovannoni *et al.*, 1988). Se desarrollaron diversas formas de hibridación *in situ* basadas en la utilización de sondas de ARNr 16S específicas de grupo, como la hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) (Giovannoni *et al.*, 1988; DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1995). También cobraron importancia las técnicas de huella genética (*fingerprinting*) como el análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP) y la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), que separan físicamente fragmentos del gen que codifica el ARNr 16S o como el análisis automático del espaciador intergénico (ARISA) que separa fragmentos del espacio entre los genes del ARNr 16S y 23S, que detectan variaciones en la secuencia entre los miembros de las comunidades (Liu *et al.*, 1997; Muyzer, 1999). Desde que Stein *et al.* (1996) usaron por primera vez la metagenómica tal y como la conocemos hoy, se ha aplicado para explorar la capacidad genética y las actividades de las comunidades bacterianas planctónicas marinas (Béjà *et al.*, 2000; Konstantinidis *et al.*, 2009).

La evidencia molecular reunida hasta entonces permitió proponer a Pedrós-Alió (2006, 2012) un modelo que enlazaba los conceptos de biodiversidad y diversidad (definidos por Margalef en 1994). La biodiversidad engloba la información genética total, y la diversidad la constituyen los miembros "núcleo" de la comunidad, que son abundantes y se encuentran activos en un momento dado del espacio y tiempo. Estos últimos son miembros bien adaptados, que protagonizan los procesos fisiológicos y función ecológica de la comunidad en cada momento y su presencia es controlada por los recursos y/o mortalidad. A estos miembros núcleo se les suma una enorme cantidad de miembros poco abundantes denominados "biosfera rara" (*seed bank*) (Sogin *et al.*, 2006), que proporcionan potencial genético y capacidades fisiológicas a la comunidad, ya que estarían dispuestos a relevar a las especies abundantes cuando el ecosistema cambie su situación medioambiental.

Este modelo explica el cambio de abundancia de los miembros de la comunidad al pasar de una situación medioambiental a otra. Así, un miembro raro puede, en un intervalo de varios días o semanas, convertirse en un miembro abundante, siempre que se presenten las condiciones necesarias para su crecimiento activo y no sea eliminado del sistema. De la misma manera, un miembro abundante puede pasar a considerarse raro si el consumo por depredadores o la lisis vírica consiguen que disminuya por debajo de un umbral, cambiando de estado, pero sin desaparecer necesariamente del ecosistema.

Ahora bien, hablar de miembros abundantes o raros resulta poco preciso, por lo que es necesario establecer el límite para diferenciar estos dos estados de las especies bacterianas en el sistema marino. Para ello, se puede asumir la propuesta de Pedrós-Alió (2006), en el sentido de que aquellos taxones que pueden ser detectados mediante las técnicas clásicas de huella genética (DGGE, T-RFLP, ARISA, etc.) se consideren como abundantes en el sistema, y probablemente relevantes en los procesos microbianos que estén teniendo lugar. Este criterio se basa en que estas técnicas se encuentran limitadas en su capacidad de detección de aquellos taxones que representan al menos un 1 % del número total de células de la comunidad bacteriana (Suzuki y Giovannoni, 1996; Wintzingerode *et al.*, 1997).

La mayoría de las técnicas moleculares usadas para los estudios de diversidad bacteriana están basadas en la detección de una secuencia diana, específicamente el gen que codifica la subunidad menor del ribosoma bacteriano, el ARNr 16S. Este marcador se utiliza debido a las siguientes razones: (1) está altamente conservado, está presente en todos los organismos y tiene la misma función, por lo que permite un análisis comparativo de secuencias entre distintos organismos; (2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente vertical; (4) la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información minimizando las fluctuaciones estadísticas; (5) el análisis de la secuencia permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos entre especie o género (Amaral-Zettler *et al.*, 2008; Tringe y Hugenholtz, 2008; Prince Manzano, 2014) y (6) dado que resulta relativamente fácil secuenciar el ADNr 16S, existen bases de datos amplias (Rodicio y Mendoza, 2004).

Las técnicas que se basan en la detección del gen que codifica el ARNr 16S son numerosas: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993), análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP) (Moeseneder *et al.*, 1999), análisis automático del espaciador ribosómico intergénico (ARISA) (Fisher y Triplett, 1999), clonación y secuenciación de genes del ARNr (DeLong, 1992), PhyloChip (DeSantis *et al.*, 2007), hibridación cuantitativa del ARNr *Dot-Blot* (Stahl *et al.*, 1988), hibridación ADN/ADN (Lee y Fuhrman, 1991), medidas de re-asociación del ADN (Torsvik *et al.*, 1990), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Amann *et al.*, 1990b), o secuenciación capilar por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), entre otras. A continuación, paso a describir los aspectos más importantes que caracterizan a las principales técnicas usadas en esta tesis.

1.1 Hibridación de Fluorescencia *In Situ* (FISH, Fluorescent *In Situ* Hybridization) y CARD-FISH, Catalysed Reported Deposition Fluorescent *In-Situ* Hybridization)

La técnica FISH (de sus siglas en inglés Fluorescent *In Situ* Hybridization) fue propuesta por DeLong *et al.* en 1989, y se basa en el uso de sondas de oligonucleótidos asociadas a un solo

fluorocromo para la detección de células diana. Pero esta técnica FISH aplicada a las comunidades marinas tiene una baja sensibilidad de detección, ya que en las condiciones ambientales de los océanos, de baja concentración de nutrientes, el crecimiento bacteriano a menudo es muy lento, las bacterias presentan bajas cantidades de ribosomas (DeLong *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 2002), y la fluorescencia emitida por las bacterias diana a menudo queda por debajo del umbral de detección del método.

La técnica CARD-FISH (de sus siglas en inglés Catalysed Reported Deposition Fluorescent *In Situ* Hybridization) es una mejora de la técnica básica FISH, que fue utilizada por primera vez en microbiología ambiental en 1997 (Lebaron *et al.*, 1997; Schönhuber *et al.*, 1997). Se basa en la capacidad que tiene la enzima peroxidasa de convertir la molécula tiramida en un intermediario que se une a los compuestos aromáticos cercanos, como los aminoácidos tirosina y triptófano de las proteínas. De esta forma, y utilizando conjuntamente sondas de oligonucleótidos específicas de grupo unidas a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés HorseRadish-Peroxidase) y moléculas de tiramida unidas a moléculas fluorescentes, es posible conseguir en las células diana la deposición de un gran número de tiramidas fluorescentes en las proteínas cercanas al lugar de unión de la sonda de oligonucleótidos, lo que amplía hasta 10 veces el nivel de fluorescencia de dichas células diana en comparación con la técnica FISH. Esto da como resultado una sensibilidad muy mejorada para la visualización de pequeñas células bacterianas en el picoplancton marino o bacterias con bajo contenido en ribosomas (Pernthaler *et al.*, 2002).

Una de las principales ventajas de la hibridación de fluorescencia *in situ* es que permite la cuantificación de la abundancia de un grupo filogenético concreto (Alonso-Sáez *et al.*, 2007; Teira *et al.*, 2008) independientemente de los sesgos asociados a la amplificación mediante PCR. Con frecuencia se utiliza para monitorizar la dinámica de diferentes grupos filogenéticos en ambientes acuáticos (Comte *et al.*, 2006; Mary *et al.*, 2006). Sin embargo, una limitación importante de la técnica es el número y la resolución filogenética de las sondas (Alonso-Sáez *et al.*, 2007) ya que la exactitud y fiabilidad de los resultados obtenidos depende de lo específica que sea la sonda de oligonucleótidos. El diseño, así como la evaluación exhaustiva de nuevas sondas, son pasos críticos sin olvidar que en cada experimento se debe incluir tanto controles positivos como negativos (Kim *et al.*, 2006).

1.2 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o DGGE (de sus siglas en inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) es una técnica molecular que separa fragmentos de ADN de la misma longitud pero con diferentes secuencias de pares de bases después de la amplificación por PCR de la región variable V3 del ARNr 16S. Desde que comenzó a utilizarse esta técnica en el ámbito de la microbiología (Muyzer *et al.*, 1993), se ha aplicado en numerosas ocasiones para analizar la composición de grupos microbianos, incluyendo los virus, bacterias, arqueas y eucariotas (Short y Suttle, 2002; Høj *et al.*, 2005; Lovejoy *et al.*, 2006), e investigar los

patrones de distribución y perfilar la estructura de comunidades bacterianas marinas (Muyzer *et al.*, 1997; Schauer *et al.*, 2000; Díez *et al.*, 2001). Esta técnica tiene la ventaja de ser fiable, reproducible y rápida (Dowd *et al.*, 2008). También permite analizar múltiples muestras al mismo tiempo, lo que hace posible monitorizar los cambios en las poblaciones bacterianas (Muyzer *et al.*, 1997) ya que proporciona una representación visual de la composición bacteriana de muestras que varían en el espacio y/o el tiempo (Schauer *et al.*, 2003; Ghiglione *et al.*, 2005). Además, los miembros específicos de la comunidad bacteriana pueden identificarse mediante la secuenciación de bandas escindidas, y por lo tanto, permite seguir en detalle la dinámica de poblaciones particulares (Schauer *et al.*, 2003).

A pesar de ser una técnica que se usa ampliamente en ecología microbiana, las limitaciones de la técnica están bien documentadas. La extracción insuficiente de ADN, la amplificación preferencial por PCR (Wintzingerode *et al.*, 1997), las creaciones de secuencias quimera en la PCR, la migración conjunta de fragmentos de ADN con diferente composición de nucleótidos (Kowalchuk *et al.*, 1997) y la formación de múltiples bandas de una sola especie (Nübel *et al.*, 1996) pueden enmascarar la verdadera diversidad de las comunidades bacterianas. También es conocida la variación de gel a gel en los patrones de migración, causada durante la preparación de los gradientes desnaturizantes (Duck *et al.*, 2003; Nakatsu, 2007; Thies, 2007), y que representa un obstáculo importante en experimentos donde el número de muestras requiere comparaciones simultáneas de muchos geles (Powell *et al.*, 2003). Sin embargo, esto se soluciona siempre y cuando se hayan seleccionado cuidadosamente los estándares adecuados entre los geles. Dado que tales estándares no están disponibles comercialmente (Simpson *et al.*, 2000; Neufeld y Mohn, 2005), los investigadores tienen que producir los suyos propios. Así, se han utilizado mezclas de productos de PCR a partir de fragmentos del gen ARNr 16S de clones (Neufeld y Mohn, 2005), cepas bacterianas individuales (Simpson *et al.*, 2000), o incluso bandas DGGE escindidas (McOrist *et al.*, 2008) con el fin de facilitar las comparaciones entre geles.

1.3 Análisis Automático del Espaciador Ribosómico Intergénico (ARISA)

Otra técnica de huella genética rápida, económica y significativa para determinar la variabilidad global en la composición de la comunidad (Kilias *et al.*, 2015; Metfies *et al.*, 2016) y que es independiente del tamaño o la morfología de los organismos diana es el análisis automático del espaciador ribosómico intergénico o ARISA (de sus siglas en inglés Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Fisher y Triplett, 1999). La técnica conlleva la amplificación con cebadores fluorescentes de la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer), que es muy variable en secuencia de nucleótidos y longitud (Gürtler y Stanisich, 1996). Seguidamente un detector láser registra la diferente movilidad en función del distinto tamaño de las diferentes secuencias, y la cantidad de fluorescencia indica la abundancia relativa de fragmentos de ese tamaño (Fisher y Triplett, 1999).

En los últimos años se ha convertido en una herramienta muy útil para comparar la estructura de la comunidad a través de muestras múltiples y estimar la riqueza y diversidad bacteriana (Fuhrman *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2010) ya que el análisis de la región intergénica ofrece una resolución mayor que el análisis basado en la amplificación del ARNr 16S (García-Martínez *et al.*, 1999; Lerner *et al.*, 2006; Okubo y Sugiyama, 2009). Además muestra una alta sensibilidad, lo que permite la detección hasta el nivel de subespecie, aumentando la posibilidad de que el análisis detecte pequeños cambios en comunidades bacterianas complejas (Okubo y Sugiyama, 2009). Sin embargo, la técnica no permite determinar la composición taxonómica de la comunidad estudiada (Fisher y Triplett, 1999; Brown *et al.*, 2005; Gobet *et al.*, 2014).

A pesar de que esta técnica ha demostrado ser reproducible (Gobet *et al.*, 2014), también está sujeta a fallos. Entre los más habituales se encuentra que el proceso de amplificación de PCR es estocástico y susceptible de error, por lo que pueden introducirse equívocos en la longitud del ITS (Ruan *et al.*, 2006b). También es conocido que la máquina utilizada para el análisis de fragmentos aumenta la imprecisión a medida que aumenta el tamaño del fragmento (Brown *et al.*, 2005). Por lo tanto, dos fragmentos de idéntica longitud podrían ser medidos erróneamente y aparecer como de diferente tamaño, o, por el contrario, es posible que dos fragmentos de diferente longitud aparezcan como del mismo tamaño, por lo que es necesario un riguroso sistema de agrupamiento o binarización de OTUs en base a su tamaño (Ruan *et al.*, 2006b).

2 Bacterias adheridas a partículas y bacterias de vida libre

Las condiciones físicas y químicas en los sistemas marinos costeros no son uniformes. Entre los factores de heterogeneidad más conocidos se encuentra la presencia de partículas suspendidas, que pueden ser colonizadas por el bacterioplancton. Así, las partículas dan lugar al desarrollo de una comunidad bacteriana propia, denominada habitualmente “adherida a partículas”, en contraposición al resto del bacterioplancton de la columna de agua, al que se denomina “de vida libre”. Estas dos comunidades representan, por tanto, dos estilos de vida en los sistemas acuáticos, las bacterias adheridas a partículas y las bacterias de vida libre.

Son numerosos los estudios que han comparado ambas comunidades en términos de abundancia relativa (Bidle y Fletcher, 1995; Fernández-Gómez *et al.*, 2013), tamaño individual (Turley y Stutt, 2000; Zhang *et al.*, 2007) y actividad heterotrófica de cada comunidad (Unanue *et al.*, 1992; Turley y Stutt, 2000). Algunos estudios han demostrado una mayor actividad metabólica por célula en las comunidades de bacterias adheridas a partículas en comparación con las bacterias de vida libre (Becquevort *et al.*, 1998; Fandino *et al.*, 2001; Grossart *et al.*, 2006a), mientras que otros han demostrado resultados contrarios (Aldredge *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 1996). Mientras que las bacterias de vida libre son más numerosas y activas a nivel de comunidad, Unanue *et al.* (1992) demostraron que la actividad por célula de una bacteria adherida es claramente superior a la de una bacteria de vida libre, si bien al tener en cuenta la diferencia en tamaño celular, las actividades a nivel celular no resultaban significativamente

diferentes. Se ha demostrado el importante papel que pueden tener las bacterias adheridas a partículas en el ciclo del carbono a pesar de ser menos abundantes (Iriberry *et al.*, 1990), al igual que se ha detectado que las bacterias adheridas a partículas muestran sistemas de transporte de nutrientes orgánicos con baja afinidad, que caracterizan a una comunidad bacteriana adaptada a la alta concentración de sustratos (Ayo *et al.*, 2001). También se ha observado que las bacterias adheridas a partículas tienen adaptaciones muy específicas para la adherencia a las partículas, tales como mayor tamaño, movilidad deslizante (*gliding*) y producción de exoenzimas hidrolíticas (DeLong *et al.*, 1993; Acinas *et al.*, 1997). Además, la elevada actividad enzimática de las bacterias que residen en las partículas puede liberar compuestos al agua circundante, creando puntos calientes de alta actividad microbiana a su alrededor (Unanue *et al.*, 1998; Azam y Malfatti, 2007). Por el contrario, las bacterias de vida libre tienden a tener genomas más pequeños (Smith *et al.*, 2013) con alta expresión de genes transportadores de membrana que indican que estas bacterias están adaptadas a desarrollarse en condiciones de concentraciones bajas de sustratos (Satinsky *et al.*, 2014).

La composición taxonómica de la comunidad de bacterias adheridas a partículas y de vida libre es diferente, tanto en agua dulce como en agua marina (Acinas *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 1999; Mohit *et al.*, 2014). Así, se ha observado que *Sphingobacteria* y *Flavobacteria* suelen colonizar las partículas, mientras que *Alfaproteobacteria* forma parte principalmente de las comunidades de vida libre (Fandino *et al.*, 2001; Grossart *et al.*, 2005; Rink *et al.*, 2007). Hasta la fecha, el debate sobre cuál de las dos comunidades es más diversa en los ecosistemas marinos no ha sido resuelto. Algunos trabajos han encontrado que las comunidades de bacterias adheridas a partículas son más diversas que las bacterias de vida libre en mar abierto como indican varios trabajos llevados a cabo en el Océano Austral (Milici *et al.*, 2017) o en el Mar Mediterráneo (Crespo *et al.*, 2013), mientras que otros estudios tanto en aguas marinas superficiales (Ghiglione *et al.*, 2007; Kellogg y Deming, 2009) como en aguas batipelágicas (Salazar *et al.*, 2015) han mostrado una mayor riqueza de especies en las comunidades de bacterias de vida libre.

Mientras que algunos estudios indican una notable especialización de las bacterias adheridas a partículas (Crump *et al.*, 1999; Rösel y Grossart, 2012), otros señalan intercambios entre las comunidades de bacterias de vida libre y adheridas a partículas (Hollibaugh *et al.*, 2000; Ghiglione *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 2013). La interacción entre bacterias y partículas sugiere que algunos tipos de bacterias pueden desarrollar un estilo de vida complejo, que comprende etapas de vida libre así como otras asociadas a partículas (Grossart, 2010). Esto ha sido observado tanto en experimentos de laboratorio usando soportes de agar artificiales (Kjørboe *et al.*, 2002) como en muestras naturales (Grossart *et al.*, 2003). A este respecto, Ortega-Retuerta *et al.* (2013) sugirieron que la calidad de las partículas es un factor que influye en gran medida en el intercambio de las comunidades bacterianas entre las fracciones adheridas a partículas y de vida libre. La mayoría de las partículas orgánicas que se encuentran en la zona superficial de la columna de agua son de origen fitoplanctónico (Meon y Kirchman, 2001; Grossart *et al.*, 2007) y son colonizadas por especialistas que son capaces de degradar hasta cierto punto la partícula

en base a su potencial enzimático y a la labilidad de la materia orgánica (DeLong *et al.*, 1993; Azúa *et al.*, 2003; Kellogg y Deming, 2014). Una vez que la materia orgánica ha sido transformada y no puede ser consumida por los primeros colonizadores, estos se separarán y la partícula será colonizada por un nuevo grupo de bacterias con un conjunto diferente de enzimas (Tang *et al.*, 2017).

A la hora de estudiar la composición de estas dos comunidades, el método más frecuente para diferenciar las bacterias adheridas a partículas de las bacterias de vida libre es la filtración, pero no hay un consenso en el tamaño del poro ni tipo de filtro adecuado para ello. Esto es sorprendente dado que hay una extensa literatura que demuestra la variación en la retención de partículas y las tasas de obstrucción entre los tipos de filtro y en los espectros de tamaño de partículas retenidas por obstrucción (Nagata, 1986; Taguchi y Laws, 1988; Knefelkamp *et al.*, 2007) y un número menor de estudios que muestran la selección diferencial de taxones objetivo en función del tipo de filtro (Gasol y Morán, 1999; Mestre *et al.*, 2017). Tampoco está claro cómo la variación en el volumen de agua filtrada influye en la abundancia relativa de taxones retenidos en diferentes fracciones de filtro o en la eficiencia de extracción de ADN (Boström *et al.*, 2004). De hecho, el volumen de muestra varía ampliamente entre estudios, desde volúmenes menores de 1 l para ambientes costeros o eutróficos (Hollibaugh *et al.*, 2000) hasta de más de 100 l para entornos de mar abierto (Rusch *et al.*, 2007). Si bien se ha supuesto que la proporción de bacterias de vida libre retenidas en la fracción filtrada aumenta con el volumen de agua filtrada (Lee *et al.*, 1995), se desconocen los efectos de dicha retención en las medidas de la composición de la comunidad (Padilla *et al.*, 2015).

3 Estacionalidad de la composición del bacterioplancton marino

Los océanos son hábitats marcados por una fuerte estacionalidad. Los cambios ambientales temporales permiten una gran diversidad de la comunidad microbiana, ya que el ambiente puede acomodar diferentes especies en el mismo espacio, pero en épocas diferentes a lo largo del año (Tonkin *et al.*, 2017). La estacionalidad también puede afectar a la composición de la comunidad bacteriana, debido a la variación de diversos parámetros ambientales, biológicos, químicos y físicos (Chow *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015; Fuhrman *et al.*, 2015).

El Golfo de Vizcaya es un sistema costero templado típico, definido por un máximo anual de biomasa fitoplanctónica y producción primaria a finales de invierno/primavera y valores mínimos en verano. Además, muestra un marcado ciclo estacional, como resultado principalmente de la estratificación y mezcla del agua superficial a lo largo del año (Serret *et al.*, 1999). La estratificación empieza en torno a marzo-abril, con el aumento de la temperatura del agua superficial, que da como resultado una picnoclina estable hasta septiembre-octubre, cuando la temperatura superficial empieza a descender y empieza a mezclarse con el agua más profunda (Varela, 1996; Serret *et al.*, 1999; Sánchez y Olaso, 2004).

Concretamente, en el Mar Cantábrico, Baña *et al.* (2020) han descrito un ciclo estacional recurrente con dos situaciones estables, invierno (octubre-marzo) y verano (mayo-agosto), separados por dos momentos caracterizados por un afloramiento fitoplanctónico. El primero presenta un aumento en la concentración de clorofila *a* en marzo junto con un descenso de la concentración de silicato desde marzo a abril que indicaría un afloramiento de diatomeas (Sarthou *et al.*, 2005; Wasmund *et al.*, 2013) detectado recurrentemente en este sistema acuático (Estrada, 1982; Calvo-Díaz *et al.*, 2008). El segundo, ocurre entre julio y agosto, cuando el régimen eólico en el Mar Cantábrico a lo largo de la costa española induce un afloramiento costero (Botas *et al.*, 1990; Labry *et al.*, 2001) que estimula la producción de fitoplancton previamente limitada en nutrientes debido a la estratificación térmica (Varela, 1996). Este segundo afloramiento se caracteriza por densidades altas de cianobacterias (principalmente *Synechococcus*), coincidiendo con temperaturas más altas y concentraciones menores de nitrato y clorofila *a*, y ha sido detectado en otros estudios llevados a cabo en aguas costeras del Mar Cantábrico (Morán, 2007; Calvo-Díaz *et al.*, 2008).

Los estudios estacionales basados en muestreos mensuales han establecido que la sucesión estacional en la composición del bacterioplancton ocurre típicamente en las aguas superficiales oceánicas (Pinhassi y Hagström, 2000; Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2012), a menudo con patrones repetibles entre años (Fuhrman *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2010; Ladau *et al.*, 2013). Estos estudios muestran que diferentes factores ambientales estructuran comunidades de bacterioplancton en diferentes escalas temporales, siendo los procesos que rigen la variación en la composición de la comunidad diferentes en los distintos hábitats. Tanto la temperatura como los nutrientes inorgánicos se han correlacionado con el bacterioplancton de forma estacional, anual e interanual en diferentes sistemas marinos (Pinhassi y Hagström, 2000; Fuhrman *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2010). Esto ha proporcionado una amplia evidencia de la capacidad de grupos bacterianos específicos, así como de poblaciones individuales, para aprovechar los cambios en las condiciones de crecimiento (por ejemplo, nutrientes, afloramientos de fitoplancton, temperatura y pH).

A pesar de que el estudio de la estacionalidad de los sistemas acuáticos es relativamente común, resultan mucho menos frecuentes los trabajos que estudian series temporales largas derivadas de muestreos plurianuales. Sin embargo, las series temporales no solo facilitan la comprensión íntegra de la variabilidad de los océanos a largo plazo, sino que también permiten evaluar los cambios en la composición de las comunidades y relacionarlos con los parámetros ambientales, generando patrones predecibles que, potencialmente, muestran qué organismos interactúan y cómo lo hacen (Fuhrman *et al.*, 2015).

Con el fin de comprender la estacionalidad de las comunidades bacterianas marinas y su recurrencia, se han establecido varios programas de muestreo a largo plazo en las últimas décadas. Uno de los primeros estudios a largo plazo fue el realizado en el Océano Ártico por Bano y Hollibaugh (2002), donde analizaron durante tres temporadas las asociaciones del bacterioplancton, usando DGGE y bibliotecas de clones, y observaron que la mayoría de OTUs

eran comunes mientras que unas pocas solo aparecían en verano y otoño. Otros ejemplos son BATS en Bermudas, ALOHA en el giro subtropical del Pacífico Norte, SPOT en el sur de California o el Observatorio Microbiano de la Bahía de Blanes en Cataluña. Estos estudios plurianuales han permitido observar patrones temporales en la composición de la comunidad microbiana que se repiten recurrentemente (Fuhrman *et al.*, 2006; Hatosy *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015) y asociaciones entre taxones y variables ambientales (Eiler *et al.*, 2011; Díez-Vives *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de las series temporales han cubierto sitios de muestreo en mar abierto, pero hay pocos estudios que monitoricen a largo plazo las comunidades microbianas en sitios costeros (Lambert *et al.*, 2019).

Los estudios de series temporales con el objetivo de observar la dinámica temporal en las comunidades microbianas marinas suelen basarse en muestreos a escala mensual, e indican que las comunidades bacterianas son estacionales, dinámicas y repetitivas anualmente (Gilbert *et al.*, 2012; Ladau *et al.*, 2013; Chafee *et al.*, 2018). Sin embargo, la escala de tiempo parece ser determinante a la hora de conocer en detalle las asociaciones de organismos. Por ejemplo, es sabido que los miembros del grupo SAR11 correlacionan entre sí en una escala de tiempo diaria pero no mensual (Steele *et al.*, 2011; Needham *et al.*, 2013; Fuhrman *et al.*, 2015). Por ello, Needham *et al.* (2013) propusieron que un muestreo más frecuente podría revelar dinámicas ecológicas de la comunidad que se pierden en el muestreo mensual, lo que ayudaría a contextualizar las investigaciones basadas en muestreos mensuales. Estos cambios pueden estar inducidos por fuerzas *top-down* (Needham *et al.*, 2013) o responder significativamente a los afloramientos fitoplanctónicos en una rápida sucesión de diferentes taxones bacterianos (Teeling *et al.*, 2012). En cualquier momento o espacio, las OTUs poco abundantes de la biosfera rara pueden convertirse en abundantes y dominar la comunidad bacteriana a partir de cambios ambientales puntuales (Rappé *et al.*, 2000; Sogin *et al.*, 2006). Así, los factores ambientales pueden dar forma a las dinámicas de la comunidad bacteriana y potencialmente causar afloramientos de corta duración de especies bacterianas raras y particulares (Revilla *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, 2006).

4 Sensibilidad térmica de las bacterias marinas

La temperatura superficial del océano ha aumentado durante el siglo pasado entre 0,9 °C y 1,1 °C, debido principalmente al aumento de la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera (IPCC, 2021). Además, se espera que esta tendencia de calentamiento se acelere durante el siglo actual, provocando un calentamiento adicional que puede variar entre 1,5 °C y 4 °C, dependiendo del escenario de emisiones de CO₂ (IPCC, 2021). El aumento de los niveles atmosféricos de CO₂ y el consiguiente aumento en la temperatura media global están provocando una cascada de cambios físicos y químicos en todo el planeta, que produce una serie de cambios en el funcionamiento del océano global, y el sistema climático de la Tierra (Lønborg *et al.*, 2016).

Si bien la zona costera es minoritaria en cuanto a superficie y de escasa profundidad cuando se compara con el océano global, precisamente esas características hacen que las aguas superficiales costeras sean uno de los dominios oceánicos que se está calentando más intensamente (Longhurst, 1995; Informe especial del IPCC, 2019), con valores de incremento medio de la temperatura de la superficie del mar de 0,1 °C por década (IPCC, 2021) o 0,2 °C y 0,3 °C por década para la zona del sur-oeste de Europa (Lima y Wetthey, 2012; Costoya *et al.*, 2015). Además, las aguas superficiales de las zonas costeras tienen una serie de características, como su elevada diversidad biológica y productividad, que las hacen especialmente interesantes para detectar y analizar las respuestas de los organismos marinos al calentamiento global.

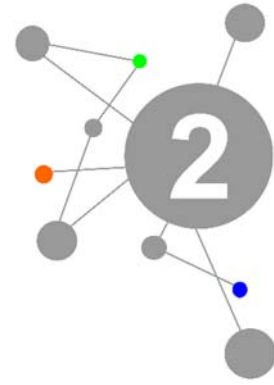
En esta situación, resulta un reto importante conocer cómo van a responder los distintos tipos de microorganismos al calentamiento de la superficie marina. Los procesos ecológicos dependen en gran medida de la temperatura (López-Urrutia *et al.*, 2006), que es un importante regulador de los procesos biológicos, incluida la actividad metabólica de los procariotas (López-Urrutia y Morán, 2007). Por ello, para poder comprender la estructura y el funcionamiento del océano en un escenario de cambio climático como el actual, es necesario estudiar la respuesta de las bacterias marinas heterótrofas ante los cambios de temperatura (Huete-Stauffer *et al.*, 2015).

La mayoría de los trabajos que estudian el efecto del aumento de la temperatura sobre los microorganismos marinos se han centrado en la respuesta del fitoplancton (Morán *et al.*, 2010), en tanto que resulta más escasa la investigación del efecto de la temperatura en la utilización de materia orgánica por los procariotas. El primer paso de la degradación de moléculas de alto peso molecular por parte de las bacterias viene dado por la actividad de sus enzimas extracelulares. A este respecto, y como consecuencia de una activación heterogénea de las distintas actividades enzimáticas bacterianas (Piontek *et al.*, 2014; Ayo *et al.*, 2017), el incremento de temperatura producirá un cambio en la estequiometría de la materia orgánica utilizable por las bacterias y en la disponibilidad de nutrientes (Ayo *et al.*, 2017). Los procesos subsiguientes de utilización de la materia orgánica hidrolizada que dan lugar a la producción y respiración bacterianas también son sensibles a la temperatura (Toolan, 2001; Apple *et al.*, 2006; Huete-Stauffer *et al.*, 2018), aunque de nuevo de forma heterogénea: los resultados indican un mayor efecto sobre la respiración que sobre la producción, lo que en términos globales significa una reducción de la eficiencia del océano como sumidero de CO₂ (Toolan, 2001; Apple *et al.*, 2006; Hoegh-Guldberg y Bruno, 2010).

La mayoría de los trabajos previamente indicados se han llevado a cabo con comunidades bacterianas amplias y complejas (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007; Sarmiento *et al.*, 2010; Ayo *et al.*, 2017), en tanto que los estudios sobre el efecto de la temperatura sobre bacterias marinas concretas son muy escasos (Cho y Giovannoni, 2004; Arandia-Gorostidi *et al.*, 2017). Por ejemplo, Cho y Giovannoni (2004) estudiaron diferentes cepas de *Gammaproteobacteria* de la zona costera del Océano Pacífico y observaron que la cepa HTCC2207 perteneciente al clado SAR92, estrechamente relacionada con otras cepas HTCC estudiadas pertenecientes al mismo clado, mostró un rango de temperatura y una temperatura de crecimiento óptima mayor que las

otras cepas. Por otro lado, Arandia-Gorostidi *et al.* (2017) analizaron el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de grupos filogenéticos predominantes (SAR11, *Rhodobacteraceae*, *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidetes*) del bacterioplancton en el sur del Golfo de Vizcaya (Gijón), y observaron que las tasas de crecimiento de *Rhodobacteraceae* mostraron una respuesta a la temperatura más fuerte que los otros grupos estudiados.

Si bien se acepta que las especies bacterianas marinas responden individualmente al cambio de temperatura (Schiel *et al.*, 2004), ya que muestran una temperatura mínima, máxima y óptima para llevar a cabo los procesos vitales (Pomeroy y Wiebe, 2001), resulta necesario caracterizar el efecto de la temperatura en la mayor cantidad posible de procesos biológicos y de especies bacterianas. Solo así se podrá explicar la distribución y la abundancia de especies en relación a su tolerancia térmica y su capacidad de adaptación (Harley *et al.*, 2006), ya que la temperatura puede jugar un papel importante como reguladora no solo de los niveles de actividad metabólica bacteriana, sino también de la composición taxonómica de la comunidad bacterioplanctónica (Selje *et al.*, 2004; Sikorski y Nevo, 2007; Yung *et al.*, 2015).

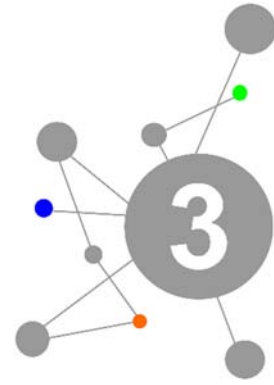


OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es obtener conocimiento sobre la composición filogenética de las comunidades de bacterias de vida libre y adheridas a partículas en aguas superficiales costeras del Mar Cantábrico oriental, así como comprender los factores que regulan su variabilidad. El análisis de la composición de la comunidad se realizó en la estación costera de Armintza (Bizkaia), que el grupo de investigación Microbios Marinos (UPV/EHU) estudia desde 2011, mediante la combinación de diferentes frecuencias de muestreo y técnicas moleculares. Además, en el contexto actual de cambio climático, se ha dedicado especial atención a analizar el efecto que el aumento de la temperatura tendrá sobre el metabolismo heterótrofo bacteriano y sus posibles consecuencias en el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos en este sistema marino costero.

Para alcanzar el objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Explorar, en un contexto plurianual, la estacionalidad de la composición y diversidad filogenéticas de las comunidades bacterianas de vida libre y adheridas a partículas, relacionar la presencia de miembros específicos con las condiciones ambientales fisicoquímicas y biológicas, y desvelar los principales factores reguladores de la estructura filogenética y la función ecológica de la comunidad bacteriana en aguas costeras superficiales de la estación de Armintza del Mar Cantábrico oriental (**Capítulo 1**).
2. Caracterizar, en una escala temporal corta, la variabilidad de la composición filogenética de las comunidades de bacterias de vida libre y adheridas a partículas que se suceden durante las situaciones de transición entre las situaciones estacionales de invierno y verano, determinar los principales factores ambientales reguladores de esta variabilidad, y establecer nexos de unión entre los cambios taxonómicos y fisiológicos bacterianos en aguas costeras superficiales de la estación de Armintza del Mar Cantábrico oriental (**Capítulo 2**).
3. Estudiar la sensibilidad a la temperatura de tres bacterias modelo representativas de la comunidad bacteriana natural de este sistema marino. Analizar la influencia de la temperatura en actividades metabólicas clave, y caracterizar la respuesta de estas tres bacterias frente a un potencial aumento de temperatura del sistema derivado de la actual situación de cambio climático (**Capítulo 3**).



MATERIAL Y MÉTODOS

1 Composición de la comunidad microbiana y variables ambientales

1.1 Área de estudio y estrategia de muestreo

Se recogieron muestras de agua de mar superficial (1 m de profundidad) en la estación de muestreo de Armintza ($43^{\circ}44'N$, $2^{\circ}90'O$), situada a 500 m de la línea de costa de Vizcaya, en la parte oriental del Mar Cantábrico (sureste del Golfo de Vizcaya) (**Figura 1**). Las muestras se prefiltraron a través de una malla de nylon de $100\ \mu m$ para la eliminación del mesozooplankton, y se transportaron en bidones que se mantuvieron en frío y oscuridad. Las muestras se procesaron inmediatamente tras la llegada al laboratorio, y siempre antes de 2 horas después de la recogida. Todo el material utilizado fue previamente lavado con ácido clorhídrico al 1 % y aclarado repetidamente con agua ultrapura (Milli Q; Millipore).

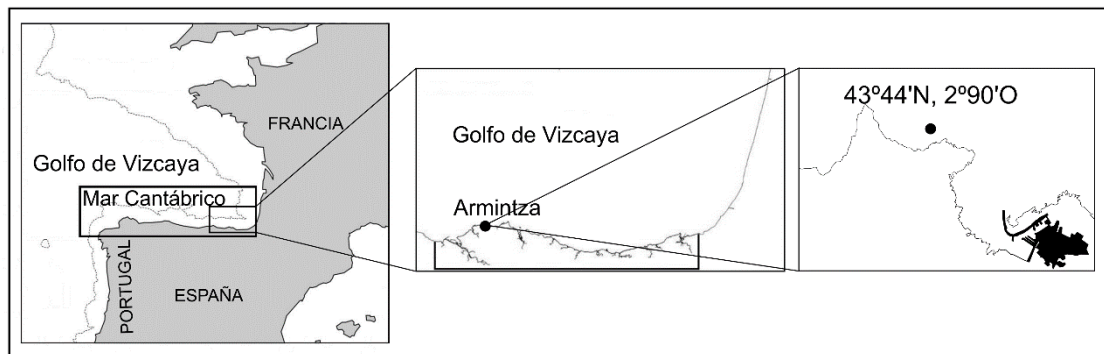


Figura 1. Localización geográfica de la estación costera de Armintza ($43^{\circ}44'N$, $2^{\circ}90'O$), situada en la zona oriental del Mar Cantábrico.

1.1.1 Muestreo mensual

Desde febrero de 2011 hasta septiembre de 2013 se recogieron un total de 27 muestras, con periodicidad mensual siempre que las condiciones meteorológicas lo permitieron (**Tabla 1**).

Tabla 1. Fecha de los muestreos mensuales llevados a cabo desde febrero del 2011 a septiembre del 2013.

MUESTRA	FECHA	MUESTRA	FECHA	MUESTRA	FECHA
		E12	24/01/2012		
F11	26/02/2011	F12	21/02/2012	F13	21/02/2013
M11	10/03/2011	M12	20/03/2012	M13	15/03/2013
A11	08/04/2011	A12	30/04/2012	A13	17/04/2013
		Ma12	28/05/2012		
J11	19/06/2011	J12	19/06/2012	J13	06/06/2013
Ju11	12/07/2011	Ju12	16/07/2012	Ju13	03/07/2013
Ag11	16/08/2011	Ag12	30/07/2012	Ag13	21/08/2013
S11	28/09/2011			S13	25/09/2013
O11	26/10/2011	O12	02/10/2012		
N11	22/11/2011	N12	20/11/2012		
		D12	10/12/2012		
2011		2012		2013	

1.1.2 Muestreo intensivo

Durante el año 2011, se recogieron un total de 14 muestras, 4 en la situación de invierno (I), 5 en la de transición (T) y 5 en la de verano (V). Las muestras de cada situación se recogieron con intervalos de tres días entre cada muestreo siempre que fue posible (**Tabla 2**).

Tabla 2. Fecha de los muestreos intensivos llevados a cabo desde febrero del 2011 a junio 2011.

MUESTRA	FECHA	MUESTRA	FECHA	MUESTRA	FECHA
I1	26/02/2011	T1	02/04/2011	V1	13/06/2011
I2	01/03/2011	T2	05/04/2011	V2	16/06/2011
I3	07/03/2011	T3	08/04/2011	V3	19/06/2011
I4	10/03/2011	T4	11/04/2011	V4	22/06/2011
		T5	14/04/2011	V5	25/06/2011

1.2 Temperatura, salinidad y minutos de luz

La temperatura y salinidad fueron medidas *in situ* mediante un conductivímetro-salinómetro (VWR EC300). Los minutos de luz se obtuvieron de la página web euskalmet (www.euskalmet.euskadi.eus).

1.3 Concentración de nutrientes inorgánicos: nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) y silicato (SiO_4^{4-})

Se filtraron submuestras de 500 ml de agua de mar a través de filtros de policarbonato de 0,2 μm de tamaño de poro (Millipore), se recogió el filtrado en botellas de polietileno y se congeló inmediatamente a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis (Azzi-Tecnalia). Las concentraciones de los nutrientes inorgánicos disueltos NO_3^- , PO_4^{3-} y SiO_4^{4-} se cuantificaron con un autoanalizador Bran-Luebbe AAIII pentacanal con células de 10 mm de camino óptico, según los métodos descritos en Grasshoff *et al.* (1983) para el análisis automático de nutrientes en flujo segmentado, con ligeras modificaciones de adaptación para los analizadores tipo AAIII. La concentración del nitrato se midió mediante la reacción colorimétrica de Griess-Ilosvay (Griess, 1858), tras la reducción a nitrito utilizando una columna de reducción de Cd-Cu, y las concentraciones de fosfato y silicato se determinaron por el método del azul de molibdeno (Brewer y Riley, 1966).

1.4 Concentración de materia orgánica fluorescente disuelta (MOFD)

La determinación de MOFD se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Nieto-Cid *et al.* (2006). Se tomaron submuestras de 15 ml de agua de mar para determinar su fluorescencia mediante un espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS50B) utilizando una celda de fluorescencia de cuarzo no fluorescente de 1 cm. El ancho de banda para las longitudes de onda de excitación y emisión fue de 10 nm, y la velocidad de exploración fue de 250 nm min^{-1} . Se usaron las longitudes de onda de excitación/emisión establecidas por Coble (1996): 280 nm / 350 nm (pico T) como indicador de sustancias proteicas (PROT), 340 nm / 440 nm (pico C) y 320 nm / 410 nm (pico M) como indicadores de sustancias húmicas (HUM). Las medidas de fluorescencia se transformaron en unidades de sulfato de quinina (QSU, del inglés Quinine Sulfate Units) utilizando dihidrato de sulfato de quinina disuelto en ácido sulfúrico $0,05\text{ mol l}^{-1}$, con curvas estándar medidas con ondas de longitud de excitación/emisión de 340 nm / 440 nm, siendo 1 QSU equivalente a la emisión de fluorescencia de $1\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$. La fluorescencia del blanco (agua ultrapura Milli Q; Millipore) se restó a todas las muestras.

1.5 Concentración de carbono orgánico disuelto (COD)

Se cuantificó el carbono orgánico disuelto (COD) siguiendo el método de Benner y Strom (1993). Las muestras fueron filtradas a través de filtros GF/C (Whatman) previamente quemados (450 °C, 4 h) utilizando un sistema de filtración lavado con ácido clorhídrico al 10 % y aclarado abundantemente con agua ultrapura (Milli Q; Millipore). Después de descartar una primera fracción del filtrado, se tomaron en ampollas de vidrio quemadas submuestras por triplicado de 10-15 ml de agua de mar filtrada, y se acidificaron a pH ~ 2 con ácido ortofosfórico (25 % v / v). Las ampollas se sellaron térmicamente y se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta su análisis. El carbono orgánico disuelto se cuantificó mediante un analizador de carbono orgánico Shimadzu TOC-CVS, con una precisión de $\pm 0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$. El equipo se normalizó diariamente con un estándar de ftalato de hidrógeno y potasio. La concentración del carbono orgánico disuelto se determinó restándole el área del pico del blanco preparado con agua ultrapura (Milli Q; Millipore) al área del pico promedio de la muestra y dividiéndolo por la pendiente de la curva estándar.

1.6 Concentración de clorofila a

Los datos de concentración de clorofila a se obtuvieron del satélite Aqua-Modis de la Administración de la Aeronáutica y del Espacio (NASA). Se utilizaron los ficheros de nivel 3 (L3) con una resolución espacial de 4 km x 4 km que fueron tratados con el paquete *RNetCDF* (Michna y Woods, 2013) del software R (versión 3.61; R Core Team, 2019).

1.7 Densidades microbianas

La densidad de las cianobacterias marinas *Synechococcus* (*Syn*) y *Prochlorococcus* (*Pro*) se determinó mediante citometría de flujo siguiendo la técnica descrita por Marie *et al.* (1999) y Gasol y del Giorgio (2000). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) equipado con un láser de emisión de 488 nm. Como fluido envolvente se empleó agua ultrapura (Milli Q; Millipore). La calibración se realizó utilizando una suspensión de microesferas fluorescentes (10^5 esferas ml^{-1}) de 1 μm de diámetro (Molecular Probes). Las muestras se procesaron a alta velocidad de flujo hasta la adquisición de 100.000 eventos o durante al menos 10 min. La separación e identificación de las cianobacterias se consiguió a partir de: i) la dispersión lateral de la luz como indicador del tamaño relativo de las células; ii) la emisión de fluorescencia en el espectro de luz naranja (filtro BP 585 / 42 nm) como indicador de la presencia de ficoeritrina; y iii) la emisión de fluorescencia en el espectro de luz roja (filtro LP 670 nm) como indicador de la presencia de clorofila.

La densidad de bacterias totales se estimó mediante recuento directo al microscopio de epifluorescencia siguiendo el protocolo de Porter y Feig (1980). Se tomaron submuestras de 10 ml y se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico filtrada por 0,2 μm (2 % v / v

concentración final). Las submuestras fijadas se guardaron a 4 °C y en oscuridad hasta su procesamiento, que se realizó siempre durante las 24 horas siguientes. Para el recuento de bacterias totales, se tomaron volúmenes conocidos de submuestras por duplicado y se tiñeron con DAPI (4'6'-diamidino-2phenyl-indol; concentración final 2 µg ml⁻¹) durante 10 min. Las células se recogieron en filtros de policarbonato negro (Whatman) de 25 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro. Los filtros se montaron sobre portaobjetos de vidrio con aceite de inmersión no fluorescente y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon E400, equipado con el sistema ED-F de fluorescencia (luz UV). Se contaron 20 campos de microscopio seleccionados aleatoriamente o 400 bacterias, y la densidad celular bacteriana se calculó aplicando el factor de conversión específico del microscopio.

La densidad de bacterias de vida libre se determinó de modo similar, pero procesando submuestras de agua filtradas por un filtro de policarbonato (GTTP; Millipore) de 3 µm de diámetro de poro. La densidad de bacterias adheridas a partículas se calculó mediante la resta de la densidad de bacterias de vida libre de la densidad bacteriana total.

La densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH) se estimó mediante recuento directo al microscopio de epifluorescencia siguiendo el protocolo de Porter y Feig (1980). Se tomaron submuestras de 20 ml y se fijaron con formalina tamponada con tetraborato sódico y filtrada por 0,2 µm (2 % v / v concentración final). Las submuestras fijadas se guardaron a 4 °C y en oscuridad hasta su procesamiento, que se realizó siempre durante las 24 horas siguientes. Para su procesamiento, se tomaron volúmenes conocidos de submuestras por duplicado y se tiñeron con DAPI (4'6'-diamidino-2phenyl-indol; concentración final 2 µg ml⁻¹) durante 10 min. Las células se recogieron en filtros de policarbonato negro (Whatman) de 25 mm de diámetro y 0,8 µm de tamaño de poro. Los filtros se montaron sobre portaobjetos de vidrio con aceite de inmersión no fluorescente, y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon E400, equipado con el sistema ED-F de fluorescencia (luz UV y luz azul). Se contaron los nanoflagelados heterótrofos en 100 campos de microscopio seleccionados aleatoriamente, y la densidad se calculó aplicando el factor de conversión específico del microscopio.

La densidad de partículas víricas (PV), se obtuvo mediante recuento directo al microscopio de epifluorescencia siguiendo el protocolo de Noble y Fuhrman (1998). Las muestras se fijaron con formalina tamponada con carbonato cálcico y filtrada por 0,2 µm (2 % v / v concentración final) y se guardaron a 4 °C y en oscuridad hasta su procesamiento. Se filtraron volúmenes conocidos de submuestras por duplicado a través de filtros Whatman de Acrodisc de 0,02 µm tamaño de poro, y los filtros se colocaron sobre una gota de SYBR Green I (0,2 % concentración final) y se tiñeron durante 15 min. Seguidamente, se aclararon con agua destilada y filtrada por 0,02 µm. Los filtros se montaron sobre portaobjetos de vidrio con aceite de inmersión no fluorescente, y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon E400, equipado con el sistema ED-F de fluorescencia (luz azul). Se contaron las partículas víricas presentes en 20 campos de microscopio seleccionados aleatoriamente, y la densidad se calculó aplicando el factor de conversión específico del microscopio.

1.8 Producción bacteriana (PB)

Se estimaron las velocidades de producción bacteriana a partir de la toma de leucina tritiada siguiendo la metodología de Kirchman *et al.* (1985). Se añadió el isótopo [³H-leucina] a concentración saturante (40 nM concentración final) a tres submuestras de 5 ml, y se incubaron a la temperatura *in situ* y en oscuridad durante 1 hora. Simultáneamente se repitió el mismo procedimiento con 2 blancos de 5 ml, previamente fijados con ácido tricloroacético (ATC) (concentración final de 5 %). Las incubaciones se detuvieron añadiendo ATC a las submuestras en una concentración final del 5 % y colocándolas en hielo durante 5 min. Seguidamente, las submuestras y blancos se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa (Sartorius) de 0,22 µm de tamaño de poro, y se lavaron cinco veces con 5 ml de ATC al 5 %. Los filtros se dejaron secar al aire y se introdujeron en viales de centelleo junto con 500 µl de acetato de etilo para su disolución durante 20 min. Por último, se añadieron 4 ml de cóctel de centelleo (Ultima Gold; Perkin Elmer) y se midió la radiactividad mediante un contador de centelleo Perkin Elmer Tri-Carb 2900TR, utilizando estándares externos para la corrección de extinción. Se estimó la producción de biomasa usando el factor de conversión teórico de 1,55 kg C mol leu⁻¹ asumiendo que no se produce dilución interna del isótopo (Simon y Azam, 1989).

1.9 Respiración bacteriana (RB)

Se recogieron submuestras por duplicado en cámaras de vidrio de 4 ml diseñadas para prevenir el intercambio de oxígeno con el exterior. El descenso de la concentración de oxígeno dentro de las cámaras fue monitorizado por microamperimetría utilizando un sistema de microrespiración y microsensores de oxígeno (OX-MR) (Unisense) que permitieron una medida continua (Briand *et al.*, 2004) de la concentración de oxígeno durante el periodo de incubación. Las cámaras se mantuvieron en un baño de agua ajustado a la temperatura *in situ*. La velocidad de respiración de la comunidad se cuantificó a partir de la pendiente negativa de la regresión entre la concentración de oxígeno y el tiempo en incubaciones inferiores a 6 horas (Baña, 2020). Las velocidades de desaparición de oxígeno fueron transformadas en velocidades de respiración de carbono mediante el uso de un cociente de respiración de 1 (del Giorgio *et al.*, 2006). Por las condiciones metodológicas utilizadas, se asume que la mayor parte de la respiración es debida a la comunidad de bacterias.

1.10 Demanda bacteriana de carbono (DBC) y eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB)

La demanda bacteriana de carbono (DBC) se calculó como la suma de la producción (PB) y la respiración (RB) bacterianas, según la expresión:

$$DBC = PB + RB$$

La eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) (del Giorgio y Cole, 1998) se calculó como el cociente de la producción bacteriana entre la demanda bacteriana de carbono, y se expresó como un porcentaje:

$$ECB = \frac{PB}{DBC} \times 100$$

1.11 CARD-FISH (Catalysed Reported Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization)

La composición de la comunidad bacteriana se analizó mediante CARD-FISH siguiendo la metodología descrita por Pernthaler *et al.* (2002). Se recogieron submuestras de agua de mar, se fijaron con paraformaldehído 4 % (concentración final 2 %) y se mantuvieron durante 24 h a 4 °C en oscuridad. A continuación, las muestras se filtraron a través de filtros de policarbonato (GTTP; Millipore), de 0,22 µm de tamaño de poro, se lavaron tres veces con 5 ml de agua ultrapura (Milli Q; Millipore), y tras el secado se conservaron a -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 cortaron en secciones y se hibridaron con oligonucleótidos (Biomers) conjugados con peroxidasa de rábano diseñados específicamente para el dominio *Bacteria* (mezcla de sondas EUB I (Amann *et al.*, 1990a) y EUB II-III (Daims *et al.*, 1999)) y para los grupos filogenéticos *Alfaproteobacteria* (sonda Alf968 (Neef, 1997)) *Betaproteobacteria* (sonda Beta42a (Manz *et al.*, 1992)), *Gammaproteobacteria* (sonda Gam42a (Manz *et al.*, 1992)), *Bacteroidetes* (sonda CF319a (Manz *et al.*, 1996) y *Actinobacteria* (sonda HGC69a (Roller *et al.*, 1994)). La sonda NON338 antisentido de *Bacteria* (Wallner *et al.*, 1993) se usó como control negativo. Todas las hibridaciones se llevaron a cabo durante 2 h a 35 °C y fueron seguidas de amplificación durante 15 min con Tiramida-Alexa488. La concentración de formamida en el tampón de hibridación de la sonda Alf968 fue de 45 %, para la sonda HGC69a fue de 25 % y para la sonda Non338 fue de 20 %, y del 55 % para el resto de sondas. Una vez finalizada la hibridación, las secciones de los filtros se tiñeron con DAPI, se montaron en portaobjetos como se indica en la sección 1.7 y se realizaron los recuentos para determinar el porcentaje de hibridación de cada sonda con respecto al total de bacterias.

1.12 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

1.12.1 Extracción de ADN y PCR

Tras prefiltrar el agua por una malla de 100 µm de nylon de diámetro de poro para eliminar mesozooplankton, la muestra se filtró mediante bombas peristálticas y la biomasa bacteriana se recogió sucesivamente en filtros de policarbonato (GTTP; Millipore) de 3 µm de diámetro de poro y a continuación de 0,22 µm de diámetro de poro (3 réplicas de 3 l cada uno). La extracción

y purificación del ADN a partir de la biomasa se realizó mediante el Kit Power Water DNA Isolation Kit (MO-Bio).

Para la amplificación de ADN, se usaron cebadores específicos para el dominio *Bacteria*, el cebador 341F con una cola GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') y el cebador 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') (Invitrogen), y se usó el termociclador K960 Gradient Thermal Cycler (Jingle Scientific) consiguiendo fragmentos de ~ 550 pares de bases. El protocolo de PCR usado consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 10 ciclos *touchdown* consistentes en un paso de desnaturalización (94 °C durante 1min), anillación (de 65 °C a 55 °C decreciendo 1 °C por minuto) y extensión (72 °C durante 3 min); seguido de 20 ciclos estándar consistentes en desnaturalización (94 °C durante 1min), anillación (55 °C durante 1 min) y extensión (72 °C durante 3 min) y una extensión final (72 °C durante 5 min). La verificación de la PCR se hizo mediante el uso del gel de agarosa 1 % y la cuantificación mediante un nanofotómetro (Implen) a longitudes de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm. Se usaron los cocientes A_{260} / A_{280} y A_{260} / A_{230} para determinar la cantidad y pureza del producto-PCR.

1.12.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

La DGGE se realizó con el sistema DGGE-2001-220 (CBS Scientific Company) siguiendo el método descrito por Muyzer *et al.* (1993). Se analizaron 1000 ng de producto-PCR de cada muestra en un gel de acrilamida 6 % con un gradiente de desnaturalizantes de ADN entre el 40 % y el 60 % donde el agente desnaturalizante 100 % se compone de urea 7 M en 40 ml de formamida. El gel corrió durante 18 h con un voltaje constante de 180 V a 60°C en un tampón de 1X TAE (2 M Tris, 1 M ácido acético y 50 mM EDTA para la solución madre de 50X). Tras teñir el gel con SybrGold (SYBR Gold 10000x en DMSO; Invitrogen), el gel se visualizó con luz azul mediante un transiluminador Syngene G:Box chemi xRQ y el software GeneSys. Las imágenes digitalizadas del gel fueron analizadas mediante el software TotalLab 120 software (Nonlinear dynamics) y el software R (versión 3.61; R Core Team, 2019). Cada gel contenía dos carriles adicionales para muestras que contenían estándares (mezcla de producto-PCR) para ajustar y normalizar diferentes geles usados en el trabajo.

1.12.3 Secuenciación de las bandas de DGGE

Las bandas de ADN se escindieron de los geles usando escalpelos estériles. Se colocaron los pequeños fragmentos de gel de acrilamida escindidos en 20 µl de agua estéril para la difusión pasiva del ADN durante una noche a 4 °C, tras lo cual se amplificaron mediante el cebador 907R. Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron utilizando un analizador de ADN ABI3730XL, en la empresa MacroGen. Los números de acceso para todas las bandas DGGE secuenciadas se pueden encontrar en GenBank (MW672400-MW672444). La identidad

filogenética de las bandas de DGGE se evaluó utilizando BLAST de NCBI GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), RPD 11 (https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) y SILVA (<https://www.arb-silva.de/aligner/>), tras comprobar que no había ninguna secuencia quimera mediante la página web Decipher (<http://www2.decipher.codes/FindChimeras.html>).

1.13 ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Tras prefiltrar el agua por una malla de de nylon de 100 μm de diámetro de poro para eliminar mesozooplancton, la muestra se filtró mediante bombas peristálticas y la biomasa bacteriana se recogió sucesivamente en filtros de policarbonato (GTTP; Millipore) de 3 μm de diámetro de poro y a continuación de 0,22 μm de diámetro de poro (3 réplicas de 3 l cada uno). La extracción y purificación del ADN a partir de la biomasa se realizó mediante el Kit Power Water DNA Isolation Kit (MO-Bio).

El análisis ARISA se realizó siguiendo el protocolo de Fisher y Triplett (1999). La amplificación de ADN se llevó a cabo utilizando los cebadores 1392F (5'-GYACACACCGCCCGT-3') y 5'-6-FAM-23SR (6-FAM-5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3') (Invitrogen) en un termociclador K960 Gradient Thermal Cycler (Jingle Scientific) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización (a 94 °C durante 30 s), anillación (a 56 °C durante 30 s), extensión (a 72 °C durante 45 s) y extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al igual que en la sección 1.12.1.

El producto-PCR se precipitó con isopropanol y poliacrilamida lineal (sin bisacrilamida). Seguidamente se enjuagó con agua ultrapura (Milli Q; Millipore) e isopropanol y se secó a 60 °C durante 3 min. Luego, se resuspendió en 5 μl de agua ultrapura (Milli Q; Millipore) autoclavada y se dejó toda la noche a 4 °C. El análisis de los productos se llevó a cabo en el servicio SGiker junto con un estándar interno (GeneScan 1200 LIZ; Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado que funcionó como un analizador de fragmentos. Los electroferogramas del secuenciador se analizaron a continuación utilizando el software ABI Genescan. Estos resultados se utilizaron como entrada para un *script* de agrupación de longitud de fragmento personalizado (Ramette, 2009) mediante el software R (versión 3.61; R Core Team, 2019). Para los fragmentos de hasta 700 pares de bases de longitud, se agruparon las OTUs con una diferencia de 3 pares de bases, para los fragmentos de entre 700 y 1000 pares de bases de longitud se agruparon las OTUs con una diferencia de 5 pares de bases y para los fragmentos mayores de 1000 pares de base se agruparon las OTUs con una diferencia de 10 pares de bases como en Brown *et al.* (2005).

1.14 Análisis estadístico

La significancia de la diferencia entre dos grupos se determinó mediante un test t-Student (análisis paramétrico) o mediante U Mann-Whitney (análisis no paramétrico). Las diferencias en el valor medio entre más de dos grupos se determinaron con ANOVA (varianzas homogéneas) y Kruskal-Wallis (varianzas heterogéneas), seguido de test de t-Student y U Mann Whitney, respectivamente, después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante correlaciones rho de Spearman. Los análisis estadísticos se realizaron con la versión 22 de IBM SPSS Statistics para Windows.

Para poder analizar la variabilidad/dispersión de los datos entre situaciones y dentro de cada situación (intrasituación) se calculó el coeficiente de variación:

$$cv = \frac{\text{desviación típica}}{\text{media}} \times 100$$

Con los datos de composición de la comunidad bacteriana obtenidos de DGGE y ARISA se creó una matriz de intensidad a partir del porcentaje de intensidad para cada OTU respecto de la intensidad total en la muestra (Brown *et al.*, 2005; Hewson y Fuhrman, 2006).

La diversidad alfa se determinó mediante el índice de diversidad de Shannon (H') mediante el programa informático PAST (PAAlaeontological STatistics analysis program, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>), utilizando la ecuación:

$$\text{Índice Shannon} = - \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$$

Donde P_i es la contribución relativa de i OTU al total de una muestra.

Las asociaciones entre las dinámicas temporales de las variables y las OTUs se analizaron mediante el Análisis de Similitud Local (LSA, Ruan *et al.*, 2006a). Este análisis calcula correlaciones tanto contemporáneas como desplazadas en el tiempo basándose en datos ordenados en rangos y normalizados. De esta forma, genera coeficientes de correlación, denominados correlaciones de similitud local (LS, del inglés Local Similarity correlations), análogos al coeficiente de correlación de Spearman. En los casos puntuales en los que no se disponía de datos, dado que las fechas de recogida de muestra estaban separadas por un periodo de un mes entre sí, se asumió un cambio gradual de las variables del ecosistema y se aplicó una interpolación lineal de los valores perdidos (Ruan *et al.*, 2006a). Los valores p se determinaron mediante aproximación estadística seguida de pruebas de permutación (1000) para reducir el tiempo de cálculo y garantizar precisión. Las matrices de correlaciones LS con valores $p < 0,05$ y $q < 0,10$ se visualizaron en Cytoscape v3.3.0 (Shannon *et al.*, 2003; Cline *et al.*, 2007).

La matriz resultante de los datos de ARISA, se utilizó para construir un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, de sus siglas en inglés Non-parametric MultiDimensional Scaling) con el software R (versión 3.61; R Core Team, 2019). El NMDS es un procedimiento no paramétrico que utiliza rangos de las similitudes entre las muestras para construir un mapa en el que las posiciones de las muestras reflejan lo más estrechamente posible las diferencias entre ellos. Con la matriz de intensidad obtenida mediante ARISA se realizó el análisis multivariado y no paramétrico llamado Análisis de Semejanzas (ANOSIM) utilizando los protocolos del sitio web GUSTAME (<https://mb3is.megx.net/gustame>).

El índice de cambio de Whittaker se calculó manualmente utilizando la ecuación proporcionada por Legendre y Legendre (1998):

$$\text{Índice Whittaker} = 1 - \sum_{i=1}^n \frac{|b_{i1} - b_{i2}|}{2}$$

Donde b_{i1} y b_{i2} son las contribuciones relativas de la i OTU del total de las OTU en las muestras 1 y 2, respectivamente. El resultado del índice escala de 0 (completamente diferente) a 1 (idéntico). Posteriormente, se dividió el valor de este índice de dos muestras adyacentes entre el tiempo transcurrido en días entre ellas, asumiendo un cambio lineal en ese periodo para obtener el índice de cambio diario (Whittaker d^{-1}) (Hewson *et al.*, 2006; Sintés *et al.*, 2013).

El CCA (de sus siglas en inglés Canonical Correspondence Analysis) se llevó a cabo utilizando el programa informático PAST. El CCA se utilizó para probar qué parámetros ambientales explicaban de manera significativa la variación en la estructura de la comunidad bacteriana analizados mediante ARISA (los datos se transformaron mediante el paquete *decostand* del software R (versión 3.61; R Core Team, 2019) antes del análisis con el fin de normalizar su distribución) y elegidos en base a la prueba de Monte Carlo ($p < 0,05$).

2 Efecto de la temperatura en tres bacterias seleccionadas

2.1 Descripción de las bacterias estudiadas

Las tres especies bacterianas seleccionadas para el estudio del efecto de la temperatura fueron detectadas mediante la técnica DGGE en la comunidad bacterioplanctónica de la estación de muestreo de Armintza (**Capítulo 1**). *Winogradskyella* fue detectada en diferentes situaciones del sistema a lo largo del ciclo anual, tanto con altas como con bajas temperaturas, *Jannaschia* se detectó únicamente en muestras correspondientes a invierno y *Aliiroseovarius* solo fue detectada en muestras de verano.

Las tres bacterias que se utilizaron en este estudio proceden de la Colección Alemana de Cultivos Tipo (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*): *Winogradskyella*

jejuensis (DSM-25330), *Jannaschia helgolandensis* (DSM-14858) y *Aliiroseovarius halocynthiae* (DSM-27840). Todas ellas están clasificadas en el nivel 1 de bioseguridad.

W. jejuensis pertenece a la familia *Flavobacteriaceae* (Bernardet, 2011) del filo *Bacteroidetes*. Se aisló por primera vez a partir de un alga marrón de la especie *Carpopeltis affinis* en la costa de la isla de Jeju, República de Corea (Kim y Oh, 2012). El aislado se cultivó en agar marino y creció en un rango de temperatura de 10-37 °C. Crece óptimamente en el rango de temperaturas de 20-25 °C y a pH 6,5-9,5 siendo su pH óptimo 7,0. Requiere iones de sodio, NaCl 1-3 % (p / v). Son bacilos Gram negativos aerobios rectos o ligeramente curvados de 0,2-0,3 µm de ancho y 1,8-4,3 µm de largo. En agar marino, las colonias muestran una morfología redonda, de 1-1,5 mm de diámetro, pigmentación naranja y superficie brillante.

J. helgolandensis se aisló de una muestra de 10 m de profundidad del Mar del Norte, a 2 km de la costa de la isla de Helgoland (Wagner-Döbler *et al.*, 2003). Esta bacteria pertenece al grupo "*Roseobacter-Sulfitobacter-Silicibacter*" de la familia *Rhodobacteraceae* y la clase *Alphaproteobacteria*. Desarrollan pequeñas colonias blanquecinas y brillantes en el medio de cultivo LBSS [LB (Difco. Ref.: 240230) + Sea Salts (Sigma. Ref.: S9883)] que es el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de la bacteria. Son bacterias inmóviles con forma de bacilos irregulares, aerobias y Gram negativas, con tendencia a formar cadenas durante el crecimiento. Los bacilos son irregulares, con una longitud de 1,9-3,2 µm y una anchura de 0,7-1,1 µm. La temperatura óptima de crecimiento es de 25-30 °C y el rango de pH tolerado de 7,0-8,0.

A. halocynthiae (sinónimos: *Pseudoroseovarius halocynthiae*, *Roseovarius halocynthiae*) pertenece a la clase *Alphaproteobacteria*. Se aisló de una ascidia (*Halocynthia roretzi*) del Mar del Sur, Corea (Kim *et al.*, 2012). Crece óptimamente en medio de cultivo agar marino (MA; PanReac. Ref.: 414680) a pH 7,0-8,0 a 30 °C y en presencia de NaCl al 2 % (p / v). Son bacterias aerobias, Gram negativas, de forma ovalada a bacilo, de 0,4-0,7 µm de diámetro y de 0,9-6,5 µm de largo. Son móviles gracias a un único flagelo polar. Las colonias que crecen en agar marino son circulares o ligeramente irregulares, planas, lisas, brillantes, de color crema y con un diámetro de 2,0-3,0 mm después de una incubación durante 3 días a 30 °C.

2.2 Conservación y mantenimiento de las bacterias

Las tres bacterias se conservaron a -80 °C en el medio de cultivo caldo marino (PanReac. Ref.: 414698) suplementado con glicerol 10 % y DMSO (dimetilsulfóxido) 7 % como agentes crioprotectores. Para su mantenimiento, se utilizó el medio de cultivo sólido agar marino 2216 (PanReac. Ref.: 414680), y se hicieron resiembras periódicas por triplicado cada 15 días. *W. jejuensis* y *J. helgolandensis* se incubaron a 28 °C durante 48 h, en tanto que *A. halocynthiae* se incubó a 28 °C durante 24 h. Posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

2.3 Estrategia experimental

Se prepararon microcosmos compuestos de agua de mar filtrada y autoclavada en los que se inocularon suspensiones de cada una de las bacterias estudiadas. Tras un breve periodo de aclimatación a 20 °C, se tomaron submuestras para determinar la respuesta a las diferentes temperaturas de cuatro actividades bacterianas: producción, respiración y dos actividades enzimáticas extracelulares, leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA). Las temperaturas fueron, 12 °C, 16 °C, 20 °C y 24 °C, valores que corresponden al rango de temperaturas registradas en la zona de estudio (costa de Armitza). Se realizaron 7 experiencias para cada bacteria.

Para llevar a cabo este análisis se siguió el esquema experimental que se presenta en la **Figura 2**, y que se divide en las siguientes fases:

Fase I, Preparación y obtención del inóculo:

Obtención de la biomasa bacteriana mediante cultivos sucesivos en los que se reduce tanto la temperatura de incubación como la cantidad de nutrientes accesibles.

Fase II, Preparación de los cultivos de agua de mar:

Preparación de los microcosmos para imitar las condiciones naturales, para lo cual se utilizó agua de mar filtrada y esterilizada en la que se inocularon las bacterias.

Fase III, Determinación de las actividades:

Determinación de la producción, respiración y actividades enzimáticas extracelulares a las 4 temperaturas de estudio, y el análisis de los resultados para obtener las velocidades de cada actividad a cada temperatura.

Fase IV, Sensibilidad a la temperatura de las actividades bacterianas:

Obtención de la energía de activación de cada actividad microbiana.

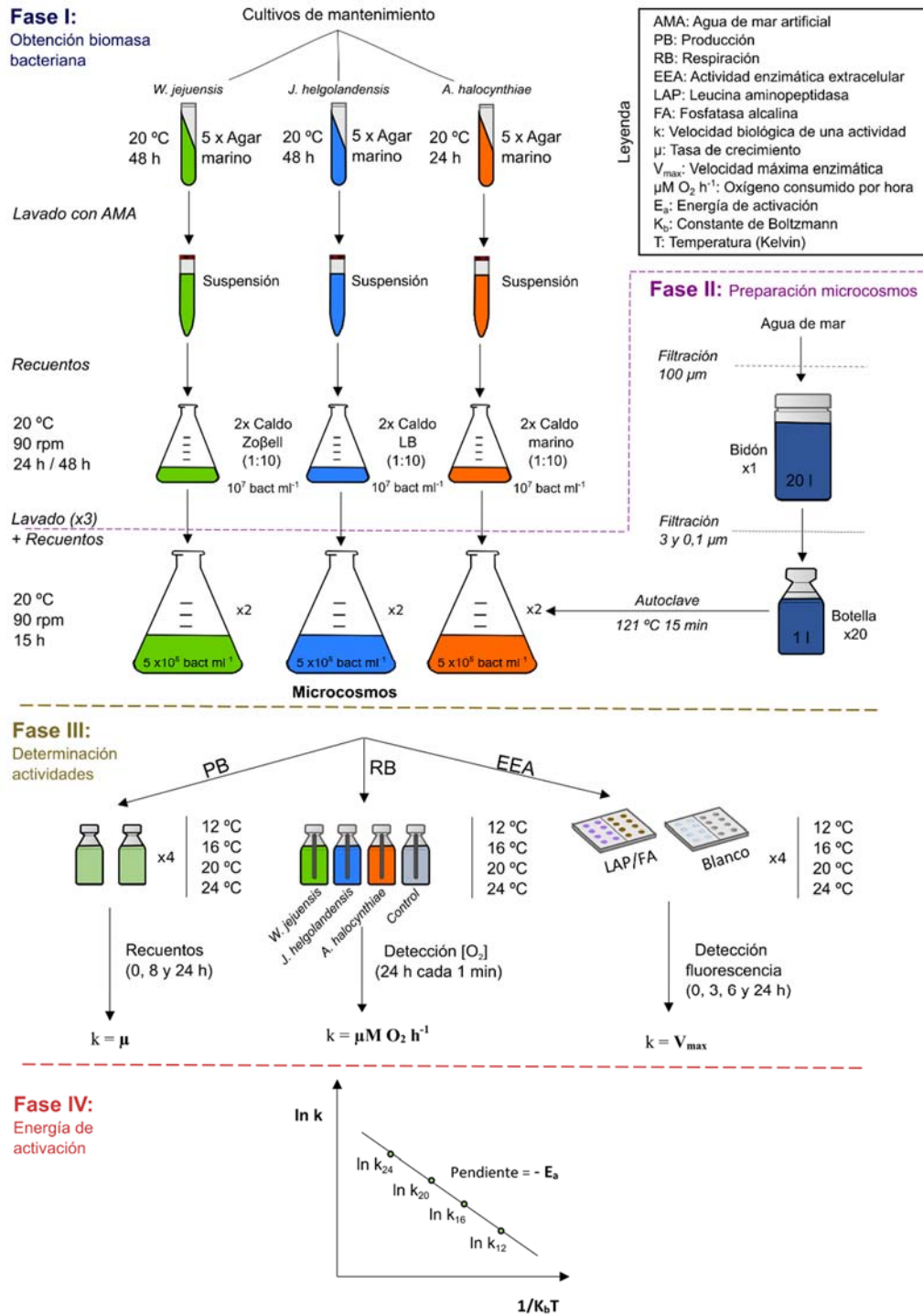


Figura 2. Esquema ilustrativo de la estrategia experimental (modificado de Campos (2020)).

2.3.1 Fase I, Preparación y obtención del inóculo

Para la obtención del inóculo se cultivaron las tres bacterias en medio de cultivo líquido diluido 1:10 con agua de mar artificial (AMA) estéril (Sea Salts; Sigma. Ref.: S9883), con el objetivo de que las bacterias comenzaran una adaptación progresiva a las bajas concentraciones de nutrientes del agua de mar que se darán en el microcosmos experimental. Los medios de cultivo utilizados fueron distintos para cada bacteria, y se determinaron como óptimos en experimentos

previos. *W. jejuensis* se cultivó en medio Zoßell (Zoßell, 1941; 5 g de Bacto-peptona, 1 g de extracto de levadura en 1 l de agua de mar artificial, complementado con 0,1 g l⁻¹ de citrato férrico esterilizado por filtración y añadido al medio ya autoclavado para evitar formación de precipitados de sales). *J. helgolandensis* se cultivó en caldo LB (Difco™ LB Broth; Lennox. Ref.: 240230) complementado con sales marinas (14 % Sea Salts; Sigma. Ref.: S9883) y por último, *A. halocynthiae* se cultivó en caldo marino (Cultimed. Ref.: 414698).

Cada especie bacteriana se sembró en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 100 ml de medio líquido diluido 1:10 y una densidad bacteriana inicial de 1 x10⁷ cél ml⁻¹. Estos matraces se incubaron a 20 °C durante 48 h para *W. jejuensis* y *J. helgolandensis* y durante 24 h para *A. halocynthiae*.

Las células se recogieron por centrifugación (20 min, 4200 rpm) y se lavaron 3 veces con AMA estéril. La pastilla final se resuspendió en 20 ml de AMA estéril, y 1 ml de esta suspensión se fijó con formalina tamponada con carbonato cálcico (2 % v / v concentración final) y filtrada por 0,2 µm para su posterior observación y recuento mediante microscopía de epifluorescencia (Porter y Feig, 1980) como se ha indicado en la sección 1.7.

2.3.2 Fase II, Preparación de los cultivos de agua de mar

Se recogió el agua de mar en la estación de muestreo de Armintza (Bizkaia) (sección 1.1). El agua recogida se filtró (100 µm) para eliminar las partículas de mayor tamaño, y se transportó al laboratorio en bidones de plástico de 20 l, previamente lavados con ácido clorhídrico al 1 % y aclarados con agua ultrapura (Milli Q; Millipore).

Una vez en el laboratorio, el agua de mar se filtró a través de filtros de 3 µm y 0,1 µm de tamaño de poro para eliminar toda partícula y microorganismo que pudiera tener actividad y pudiera interferir en el estudio. El agua filtrada se autoclavó (121 °C durante 15 min) y se distribuyó en matraces de 3 l de capacidad quemados a 450 °C durante 4 h, a razón de 1,5 l por matraz.

Cada bacteria se inoculó en dos matraces, con una densidad inicial de 5 x10⁵ cél ml⁻¹. Los matraces se incubaron a 20 °C y 90 rpm durante un periodo de aclimatación de 15 h. Este periodo se determinó en experimentos previos eligiendo el menor tiempo posible en el que se produjera un crecimiento apreciable. A su término se tomaron alícuotas para desarrollar las estimaciones de producción, respiración y actividades enzimáticas extracelulares LAP y FA.

2.3.3 Fase III, Determinación de las actividades

2.3.3.1 Producción bacteriana

Se tomaron por duplicado muestras de 50 ml de los cultivos de cada bacteria en botellas Pyrex de 100 ml, previamente quemadas a 450 °C durante 4 h, y se incubaron a cada una de las 4 temperaturas de experimentación (12 °C, 16 °C, 20 °C y 24 °C). A las 0 h, 8 h y 24 h de

incubación, de cada una de las botellas se tomaron submuestras duplicadas de 5 ml y se fijaron con formalina tamponada para su posterior recuento mediante microscopía de epifluorescencia (Porter y Feig, 1980, ver sección 1.7).

La tasa de crecimiento de cada bacteria a cada temperatura de incubación, μ (h^{-1}), se estimó como la pendiente de la recta de regresión del logaritmo neperiano de la densidad bacteriana ($\ln \text{cél l}^{-1}$) frente al tiempo (h). La producción bacteriana ($\text{cél l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se estimó multiplicando la tasa de crecimiento (μ) por la densidad bacteriana (cél l^{-1}) al comienzo de la incubación. La transformación de los valores de producción de células a producción de biomasa se realizó mediante un factor de conversión de 20 fg C cél^{-1} adecuado para aguas oligo-mesotróficas (Ducklow, 2000). Además, se calculó la velocidad específica de producción de cada bacteria ($\text{fg C cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$) dividiendo la velocidad de producción entre la densidad bacteriana.

2.3.3.2 Respiración bacteriana

La respiración se calculó cuantificando la velocidad de disminución de la concentración de oxígeno disuelto en las muestras mediante el sistema de optodos Firesting O₂ (PyroScience GmbH, Aachen, Alemania). Este sistema consta de viales de vidrio de 20 ml equipados con una lámina sensora en su pared interna. A esta lámina se acopla la sonda de fibra óptica, que a su vez está conectada con el sistema de compensación automática de temperatura y éste con un ordenador provisto del programa Pyro Oxigen Logger, donde se calculan y almacenan los datos.

El principio de medida se basa en la luminiscencia causada por la colisión entre las moléculas de oxígeno de cada muestra recogida en el vial con el indicador *Redflash*, inmovilizado en la superficie de la lámina sensora que se excita con la luz incidente naranja (610-630 nm de longitud de onda) modulada sinusoidalmente. Dependiendo del nivel de oxígeno de cada muestra, el sensor devuelve una emisión modulada sinusoidalmente con cambio de fase en el infrarrojo cercano (760-790 nm). La emisión es recogida y transformada en unidades de oxígeno, según la teoría Stern-Volmer. Antes de comenzar a hacer las medidas de respiración, los optodos fueron calibrados utilizando soluciones que contenían 100 % de oxígeno (agua destilada saturada con aire) y 0 % de oxígeno (sulfito sódico $0,1 \text{ mg l}^{-1}$).

Para determinar la respiración de las suspensiones bacterianas, para cada temperatura de incubación se utilizó un vial por bacteria y un vial control con agua de mar filtrada y esterilizada, en el cual se midió la variación de la concentración de oxígeno, debida a factores físico-químicos. Los viales fueron cuidadosamente manipulados para evitar la formación de burbujas. Una vez acoplado el transmisor de fibra óptica al exterior de cada vial, los viales se atemperaron a la temperatura de experimentación y se inició el proceso de medición (1 medida por minuto) que se prolongó durante al menos 24 h.

Los datos se exportaron del programa Pyro Oxigen Logger al programa Excel y se calculó la velocidad de respiración de oxígeno ($\mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$) a partir de la pendiente negativa de la ecuación obtenida en la regresión lineal de la concentración de oxígeno ($\mu\text{M O}_2$) en cada vial respecto al tiempo (h). La velocidad de respiración de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se obtuvo transformando con el coeficiente de 1 (del Giorgio *et al.*, 2006). También se calculó la velocidad específica de respiración ($\text{fg C cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$) dividiendo la velocidad de respiración entre la densidad bacteriana.

A partir de los valores de producción y respiración, se estimó la eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) como se ha indicado en la sección 1.10.

2.3.3.3 Medida de actividades enzimáticas extracelulares

Se cuantificaron las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (FA), responsables de la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular ricos en nitrógeno y fósforo, respectivamente (Hoppe *et al.*, 2002; Sinsabaugh y Shah, 2012).

Las velocidades de hidrólisis se determinaron mediante sustratos fluorogénicos análogos de sustratos naturales (Hoppe, 1993). La técnica consiste en añadir el sustrato fluorogénico a la muestra y medir a lo largo de un periodo de incubación el incremento de fluorescencia que se produce debido a la hidrólisis de los sustratos y la liberación del producto fluorescente. El sustrato análogo utilizado para determinar la actividad LAP fue el hidrocloreto de L-Leucina-7-amido-4-metilcumarina, que una vez hidrolizado libera el producto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (MCA). El sustrato análogo utilizado para determinar la actividad FA fue el 4-metilumbeliferilfosfato, que al ser hidrolizado libera el producto fluorescente 4-metilumbeliferona (MUF). Las unidades de fluorescencia fueron transformadas a concentración de producto liberado mediante rectas de calibrado con 11 concentraciones distintas de cada producto, en el rango 1-1000 nM.

Las soluciones concentradas de los reactivos se prepararon disolviéndolos en metanol 40 % y se guardaron congeladas ($-35\text{ }^\circ\text{C}$) en oscuridad hasta su uso. El día anterior al experimento se prepararon soluciones con agua ultrapura (Milli Q; Millipore) con las concentraciones adecuadas de sustratos y de productos y se conservaron a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Con el objetivo de estimar los parámetros cinéticos V_{max} y K_m de las actividades enzimáticas a las diferentes temperaturas, se utilizaron 17 concentraciones de cada sustrato en un rango de 0-400 μM .

Los ensayos se realizaron en microplacas negras de 96 pocillos (Nunc). Se añadieron 10 μl de solución de sustrato o de producto a 240 μl de suspensión de bacterias, y las placas se incubaron en oscuridad a las cuatro temperaturas experimentales. Se realizaron medidas de fluorescencia a lo largo de las siguientes 24 horas de incubación, aunque en la mayoría de los casos fue suficiente un tiempo de incubación de 3 horas para detectar incrementos lineales significativos de fluorescencia. Se utilizaron pocillos en los que no se adicionó sustrato o producto como control 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. Las medidas de fluorescencia se realizaron por triplicado en un espectrofluorímetro Synergy 2 (Biotek) (longitud de onda de excitación 365 nm y de emisión 445 nm), equipado con el programa Gen5™ Data Analysis Software.

Las velocidades de hidrólisis obtenidas se expresaron en nanomoles de producto liberado (MCA o MUF) por litro y hora. A partir de las cinéticas enzimáticas obtenidas se estimó el parámetro V_{max} ($nM h^{-1}$) mediante regresión no lineal utilizando la función *nls* del programa de análisis estadístico RStudio (R Core Team, 2019) y ajustando los datos obtenidos al modelo cinético descrito por Michaelis-Menten mediante la siguiente ecuación:

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

Siendo: V la velocidad de hidrólisis a cada concentración de sustrato ensayado; V_{max} la velocidad máxima de la reacción a concentración saturante del sustrato; S la concentración de sustrato añadida, y K_m la concentración de sustrato necesaria para obtener una velocidad de la mitad del valor de V_{max} .

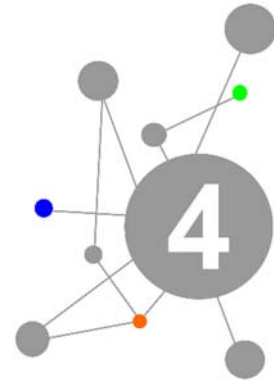
Se consideraron válidas las estimaciones de V_{max} con significación estadística $p < 0,05$. Además, se calcularon las V_{max} específicas ($amol\ cél^{-1} h^{-1}$) dividiendo V_{max} entre la densidad bacteriana al comienzo del experimento.

2.3.4 Fase IV, Sensibilidad a la temperatura de las actividades bacterianas

La sensibilidad a la temperatura de la producción, la respiración y las actividades enzimáticas extracelulares LAP y FA, se cuantificó mediante la energía de activación (E_a (eV)). Este parámetro se determinó como el valor absoluto de la pendiente negativa obtenida por regresión lineal de la gráfica de Arrhenius del logaritmo neperiano de la velocidad del proceso frente al recíproco de $K_B T$, donde K_B es la constante de Boltzmann ($8,62 \times 10^{-5} eV K^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (K).

2.4 Análisis estadístico

Se utilizó el test t-Student para identificar diferencias significativas entre los valores medios de dos grupos de muestras, y t-Student pareado para identificar diferencias significativas entre distintas medidas de una misma muestra. Se utilizó el test U Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre comunidades experimentales y comunidades naturales. Los análisis estadísticos se realizaron con la versión 22 de IBM SPSS Statistics para Windows.



CAPÍTULO 1:

Estudio plurianual de la composición y diversidad de la comunidad bacteriana.

1 Justificación y objetivos

Los océanos son hábitats marcados por una fuerte estacionalidad que puede afectar a la composición de la comunidad bacteriana, debido a las variaciones de diversos parámetros ambientales, biológicos, químicos y físicos (Chow *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015; Fuhrman *et al.*, 2015). A pesar de que el estudio de la estacionalidad de los sistemas acuáticos es relativamente común, resultan mucho menos frecuentes los trabajos que estudien series temporales largas derivados de un muestreo plurianual. Sin embargo, este tipo de series temporales permiten obtener una comprensión integra de la variabilidad de los océanos a largo plazo mediante la evaluación de la dinámica de la composición de las comunidades y los parámetros ambientales para determinar en qué medida dichas dinámicas siguen patrones predecibles y, potencialmente, mostrar qué organismos interactúan y cómo lo hacen (Fuhrman *et al.*, 2015). La mayoría de las series temporales han cubierto sitios de muestreo en mar abierto, pero hay pocos estudios que monitoricen a escala plurianual las comunidades microbianas costeras (Lambert *et al.*, 2019).

Además de la variabilidad estacional, otro de los factores de heterogeneidad en los sistemas marinos más conocidos es la presencia de partículas suspendidas, la mayoría de origen fitoplanctónico, y que pueden ser colonizadas por el bacterioplancton (Meon y Kirchman, 2001; Grossart *et al.*, 2007). Así, las partículas dan lugar al desarrollo de una comunidad bacteriana propia, conocida habitualmente como “adherida a partículas”, mientras que el resto del bacterioplancton de la columna de agua, es conocida como “de vida libre”. Son numerosos los estudios que han comparado ambas comunidades (Turley y Stutt, 2000; Zhang *et al.*, 2007; Fernández-Gómez *et al.*, 2013) y aunque algunos autores indican una especialización de las bacterias en las partículas (Crump *et al.*, 1999; Rösel y Grossart, 2012), otros señalan intercambios entre las fracciones de bacterias de vida libre y adheridas a partículas (Hollibaugh *et al.*, 2000; Ghiglione *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 2013).

Por todo ello, el objetivo de este capítulo ha sido explorar, en un contexto plurianual, la estacionalidad de la composición y diversidad filogenéticas de las comunidades bacterianas de vida libre y adheridas a partículas, relacionar la presencia de miembros específicos con las condiciones ambientales fisicoquímicas y biológicas, y desvelar los principales factores reguladores de la estructura filogenética y la función ecológica de la comunidad bacteriana en aguas costeras superficiales de la estación de Armintza del Mar Cantábrico oriental.

2 Resultados

2.1 Caracterización del ciclo estacional de la estación costera de Armintza

En este trabajo se han analizado, a lo largo de tres años, un grupo de variables abióticas y bióticas con el fin de caracterizar la variabilidad del sistema acuático de la estación costera de Armintza desde un punto de vista estacional. Las variables abióticas son: temperatura de superficie del agua, minutos de luz, concentración de nitrato, fosfato y silicato inorgánico, fracción

proteica y húmica de la materia orgánica fluorescente disuelta y concentración de carbono orgánico disuelto. Dentro de las variables bióticas, están las que se refieren a las variables que indican abundancia microbiana y que denominamos bióticas (I): concentración de clorofila *a*, y densidades de cianobacterias (*Synechococcus* y *Prochlorococcus*), partículas víricas, nanoflagelados heterótrofos y bacterias; y las variables bióticas (II), que hacen referencia a la fisiología bacteriana: producción, respiración, demanda de carbono, y eficiencia de crecimiento.

Las diferentes situaciones por las que transcurre este sistema acuático a lo largo del año se establecieron de modo similar a como se indica en el trabajo previo desarrollado por Baña *et al.* (2020). Así, en la estación costera de Arminza se han observado dos situaciones claramente diferenciadas a lo largo del ciclo estacional: la situación de invierno, desde octubre a abril, y la situación de verano, desde mayo a septiembre.

En la **Figura 3** se presentan los valores medios interanuales de las variables abióticas a lo largo del año (el listado de valores completo se presenta en la **Tabla suplementaria 1**). Se observaron diferencias significativas entre invierno y verano en la temperatura media de superficie del agua (**Figura 3A**) ($p < 0,05$) donde se detectó la temperatura más baja en invierno ($14,1 \pm 0,8$ °C) y la más alta en verano ($18,6 \pm 1,1$ °C). Los valores medios significativamente más bajos ($p < 0,01$) de minutos de luz (**Figura 3A**) se detectaron en invierno ($648,0 \pm 36,6$ minutos) y los más altos en verano ($860,6 \pm 38,3$ minutos).

Dentro de los nutrientes inorgánicos, solo la concentración media de nitrato presentó diferencias significativas entre invierno y verano con un valor de $3,3 \pm 0,7$ μM en invierno frente a $0,8 \pm 0,1$ μM en verano ($p < 0,01$) (**Figura 3B**).

Las dos fracciones de la materia orgánica fluorescente disuelta analizadas, la fracción proteica y la fracción húmica, mostraron tendencias estacionales contrarias: valores medios más altos de la fracción húmica en invierno ($3,3 \pm 0,2$ QSU) que en verano ($2,6 \pm 0,2$ QSU), y valores medios más altos de la fracción proteica en verano ($2,9 \pm 0,4$ QSU) que en invierno ($2,4 \pm 0,3$ QSU). Sin embargo, solo se detectaron diferencias significativas entre los valores medios de invierno respecto a verano en la fracción húmica ($p < 0,05$) (**Figura 3C**). Por otra parte, la concentración de carbono orgánico disuelto no mostró diferencias significativas entre invierno y verano (**Figura 3D**).

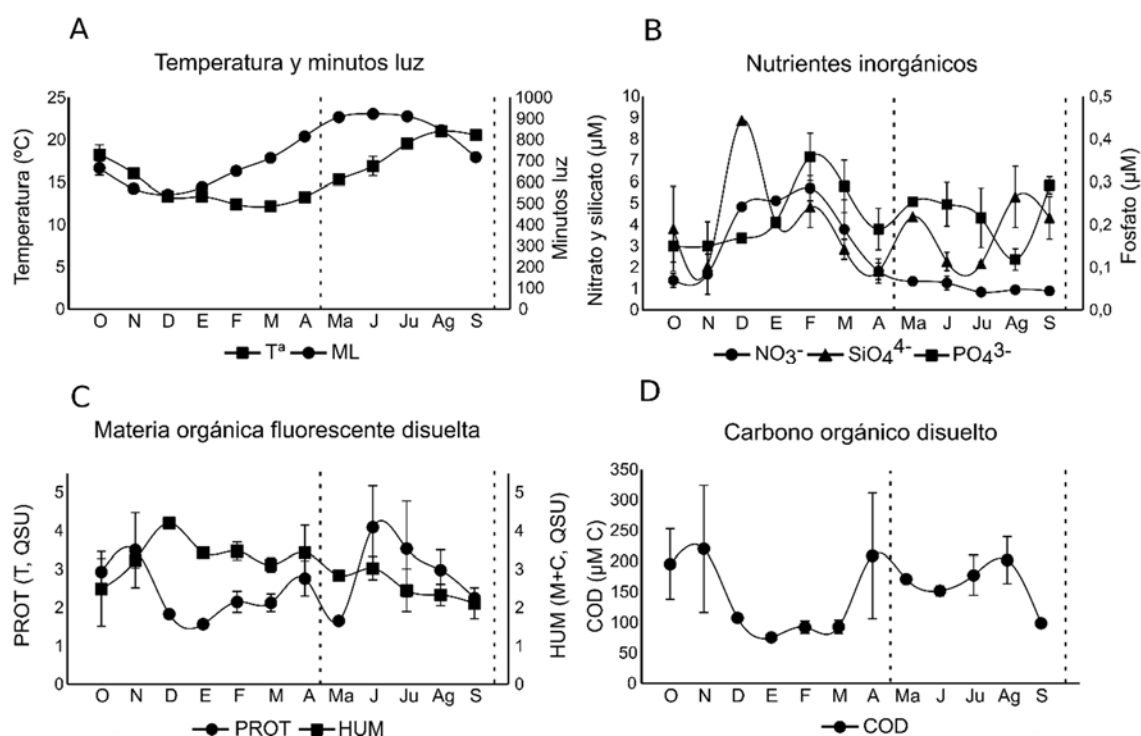


Figura 3. Evolución temporal de A: temperatura de superficie del agua (T^a) y minutos de luz (ML); B: concentración de nitrato (NO_3^-), silicato (SiO_4^{4-}) y fosfato (PO_4^{3-}); C: fracción proteica (PROT) y húmica (HUM) de la materia orgánica fluorescente disuelta; D: concentración de carbono orgánico disuelto (COD). Los puntos representan el valor medio de los tres años y las barras el error estándar. La primera línea discontinua indica la separación de los meses de invierno (octubre a abril) de los meses de verano (mayo a septiembre) y la segunda línea discontinua indica la separación de los meses de verano de los meses de invierno.

La evolución de las variables que indican abundancia microbiana se presenta en la **Figura 4** y en la **Tabla suplementaria 2**. La concentración de clorofila *a* (**Figura 4A**) varió desde $0,14 \mu\text{g l}^{-1}$ (julio 2013) a $2,93 \mu\text{g l}^{-1}$ (febrero 2013), y su concentración máxima se detectó cada año en los meses de febrero a abril ($1,98 \pm 0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ en febrero, $1,34 \pm 0,7 \mu\text{g l}^{-1}$ en marzo y $1,02 \pm 0,6 \mu\text{g l}^{-1}$ en abril), siendo la concentración media de clorofila *a* significativamente superior en invierno ($1,2 \pm 0,2 \mu\text{g l}^{-1}$) que en verano ($0,35 \pm 0,1 \mu\text{g l}^{-1}$) ($p < 0,05$). Durante el invierno, se observó un aumento puntual en la concentración de clorofila *a* en el mes de diciembre seguido de un brusco descenso en el mes de enero.

La evolución de las cianobacterias fue muy distinta a la de la clorofila *a*. La densidad de *Synechococcus* (**Figura 4A**) se mantuvo en niveles muy bajos durante la mayor parte del año, excepto en los meses entre junio y octubre, en los que se observó un pico de abundancia de estas cianobacterias con una densidad media máxima en agosto ($9,87 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ cél l}^{-1}$). Por su parte, *Prochlorococcus* fue prácticamente indetectable desde enero a julio, momento en el que comenzó un pico de abundancia que mostró valores medios máximos en octubre ($5,29 \pm 0,5 \times 10^7 \text{ cél l}^{-1}$) y descenso de este hasta diciembre.

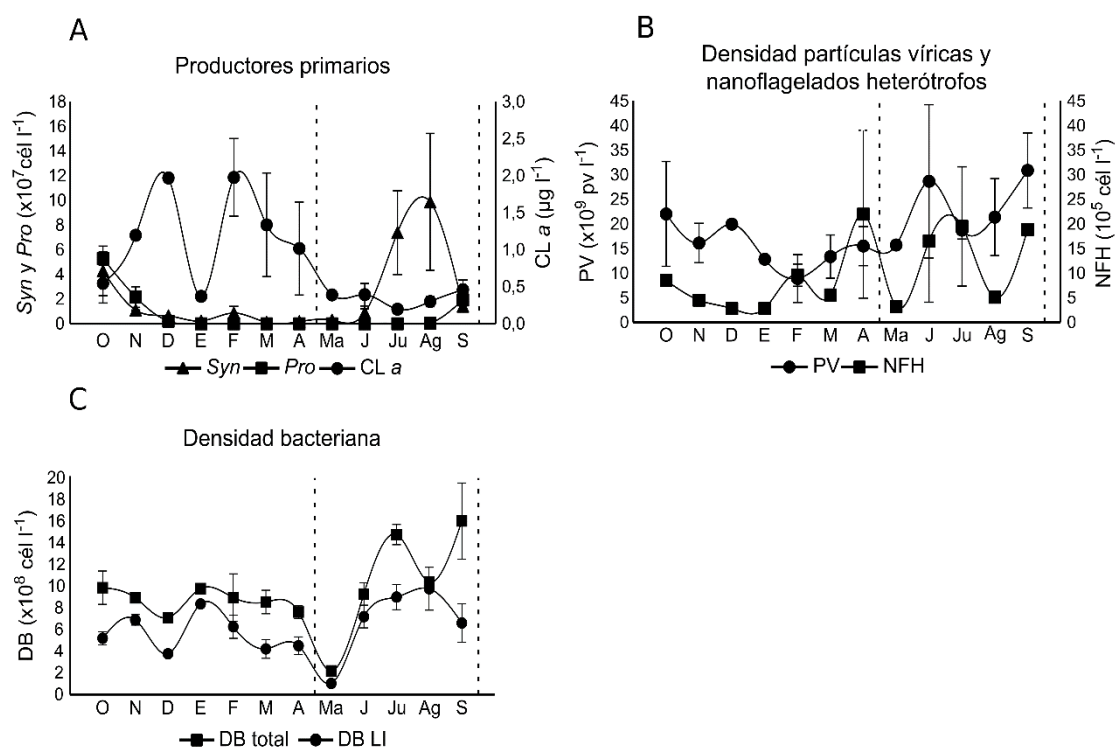


Figura 4. Evolución temporal de A: concentración de la clorofila a (CL a), densidad de *Synechococcus* (Syn) y *Prochlorococcus* (Pro); B: densidad partículas víricas (PV) y densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH); C: densidad bacteriana total (DB total) y de la comunidad de bacterias de vida libre (DB LI). Los puntos representan el valor medio de los tres años y las barras el error estándar. La primera línea discontinua indica la separación de los meses de invierno (octubre a abril) de los meses de verano (mayo a septiembre) y la segunda línea discontinua indica la separación de los meses de verano de los meses de invierno.

La densidad de partículas víricas mostró valores medios significativamente menores en invierno ($15,5 \pm 1,7 \times 10^9$ pv l $^{-1}$) que en verano ($23,1 \pm 2,9 \times 10^9$ pv l $^{-1}$) ($p < 0,05$) (**Figura 4B**).

No se encontraron diferencias significativas entre invierno y verano en la densidad media de nanoflagelados heterótrofos (**Figura 4B**) ni en la densidad media bacteriana (total o libre) (**Figura 4C**).

Las variables bióticas (II), referentes a la fisiología de la comunidad bacteriana se presentan en la **Figura 5** y en la **Tabla suplementaria 3**. La producción y la respiración bacterianas siguieron patrones similares, con valores medios menores en invierno ($24,1 \pm 2,3 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ en producción y $64,5 \pm 6,0 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ en respiración) que en verano ($47,1 \pm 6,7 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ en producción y $89,8 \pm 6,4 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$ en respiración; $p < 0,05$ para ambos) (**Figura 5A** y **5B**), lo que provocó que la demanda bacteriana media de carbono (DBC) fuera 1,6 veces menor en invierno ($82,3 \pm 8,0 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) que en verano ($132 \pm 17,8 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) (**Figura 5C**). Sin embargo, la eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) media (**Figura 5D**) no mostró valores significativamente distintos ($p > 0,05$) entre invierno ($28,9 \pm 2,5 \%$) y verano ($33,3 \pm 5,1 \%$), si bien las eficiencias medias de crecimiento en los meses de abril ($16,3 \pm 1,6 \%$) y de septiembre ($14,8 \pm 2,9 \%$) fueron notablemente inferiores a las del resto de meses. Así, la eficiencia de crecimiento media del mes de abril fue significativamente inferior a la obtenida en el resto de la situación invernal ($p < 0,05$)

y de modo similar, la eficiencia de crecimiento media del mes de septiembre fue inferior a la del resto de meses de verano ($p < 0,05$).

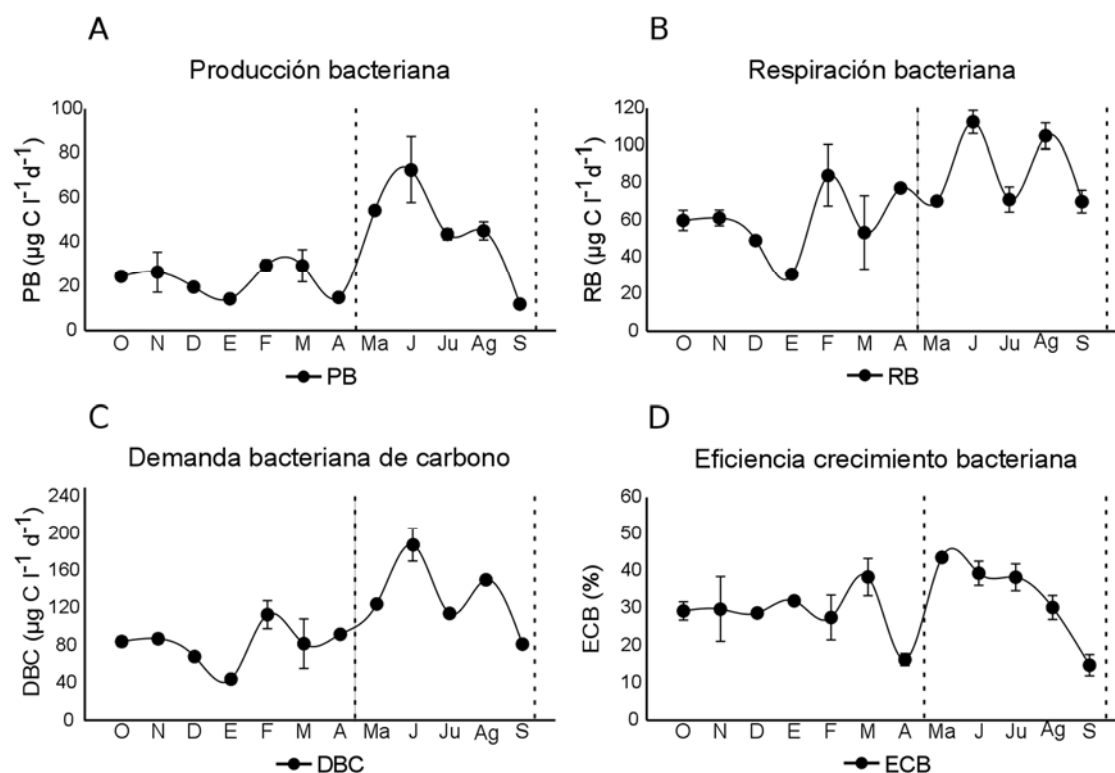


Figura 5. Evolución temporal de A: producción bacteriana (PB); B: respiración bacteriana (RB); demanda bacteriana de carbono (DBC); D: eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB). Los puntos representan el valor medio de los tres años y las barras el error estándar. La primera línea discontinua indica la separación de los meses de invierno (octubre a abril) de los meses de verano (mayo a septiembre) y la segunda línea discontinua indica la separación de los meses de verano de los meses de invierno.

2.2 Composición de la comunidad bacteriana

En este trabajo se ha utilizado la técnica molecular CARD-FISH para la cuantificación de la abundancia de los principales grupos filogenéticos que componen la comunidad bacteriana. Además, se ha utilizado la técnica molecular DGGE que, al conllevar una amplificación previa mediante PCR, proporciona información únicamente de las especies más numerosas y cuantitativamente relevantes para el ecosistema. Esta técnica permite obtener información con una mayor resolución a nivel taxonómico que el CARD-FISH y conocer la composición de las distintas comunidades en base a su situación espaciotemporal en el sistema.

La aplicación de la técnica CARD-FISH permitió cuantificar en la comunidad bacteriana total de la estación costera de Arminza la abundancia relativa de los grandes grupos taxonómicos *Alfaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria*, y analizar su evolución a lo largo del ciclo anual (**Figura 6**). Los grupos *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* representaron conjuntamente entre el $57,3 \pm 3,9 \%$ y el $65,7 \pm 4,6 \%$ del total de *Eubacteria* detectadas mediante esta técnica, por lo que se pueden considerar como los grupos

predominantes en este sistema marino costero. Sin embargo, la evolución estacional de los mismos fue contraria, ya que se observó una alternancia entre ambos grupos. Durante los meses de invierno, el grupo claramente dominante fue *Alfaproteobacteria* ($38 \pm 0,9$ % del total de *Eubacteria* detectadas), mientras que durante el verano lo fue *Bacteroidetes* ($33 \pm 1,5$ % del total de *Eubacteria* detectadas). Los momentos del año en los que se observó la alternancia de dominancia entre estos dos grupos fueron abril, y septiembre-octubre. Durante el verano, en concreto en el mes de julio, se observó también una alternancia puntual, con un aumento de *Alfaproteobacteria* junto con un descenso de *Bacteroidetes*. El tercer grupo más abundante fue *Gammaproteobacteria* ($21,2 \pm 0,9$ % del total de *Eubacteria* detectadas), seguido por *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria*, que no superaron el 10 % del total de *Eubacteria* detectadas en ninguno de los meses. Además, ninguno de estos tres últimos grupos filogenéticos estudiados mostró diferencias significativas entre invierno y verano ($p > 0,05$).

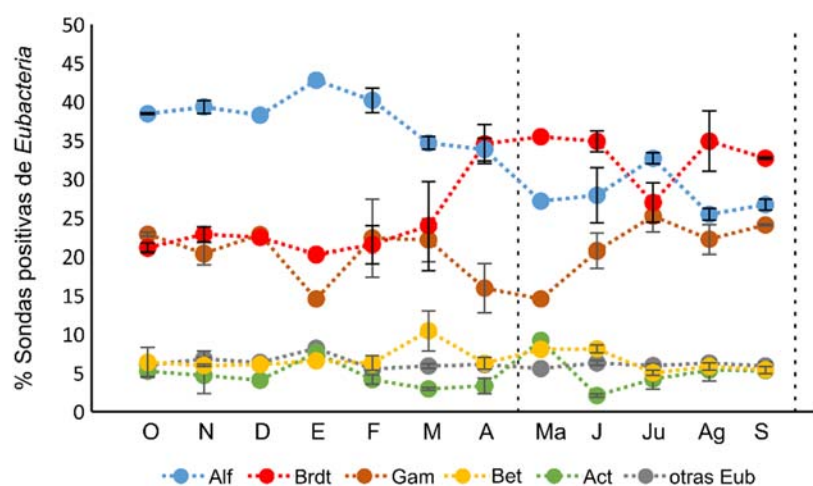


Figura 6. Evolución temporal de la composición de la comunidad bacteriana (% de sondas positivas de *Eubacteria*) analizada mediante CARD-FISH. Los puntos representan el valor medio de los tres años, y las barras el error estándar de: *Alfaproteobacteria* (Alf), *Bacteroidetes* (Brdt), *Gammaproteobacteria* (Gam), *Betaproteobacteria* (Bet), *Actinobacteria* (Act) y otras *Eubacteria* (otras Eub). La primera línea discontinua indica la separación de los meses de invierno (octubre a abril) de los meses de verano (mayo a septiembre) y la segunda línea discontinua indica la separación de los meses de verano de los meses de invierno.

El análisis de DGGE permitió obtener un mayor detalle a nivel taxonómico, y diferenciar los componentes más abundantes de la comunidad bacteriana. Además, la filtración selectiva permitió diferenciar los taxones en función del hábitat colonizado en la columna de agua: fase líquida, partículas o indistintamente en ambos. En la **Figura 7** se presentan las OTUs detectadas mediante esta técnica, ordenadas según su presencia o ausencia cronológica durante el periodo de estudio, y según su hábitat en la columna de agua. Se detectaron un total de 55 OTUs de las cuales 43 pudieron ser identificadas a distintos niveles taxonómicos (**Tabla 3**), siguiendo el criterio de porcentaje de similitud mínimo para cada uno de los niveles taxonómicos (Horner-Devine *et al.*, 2004).

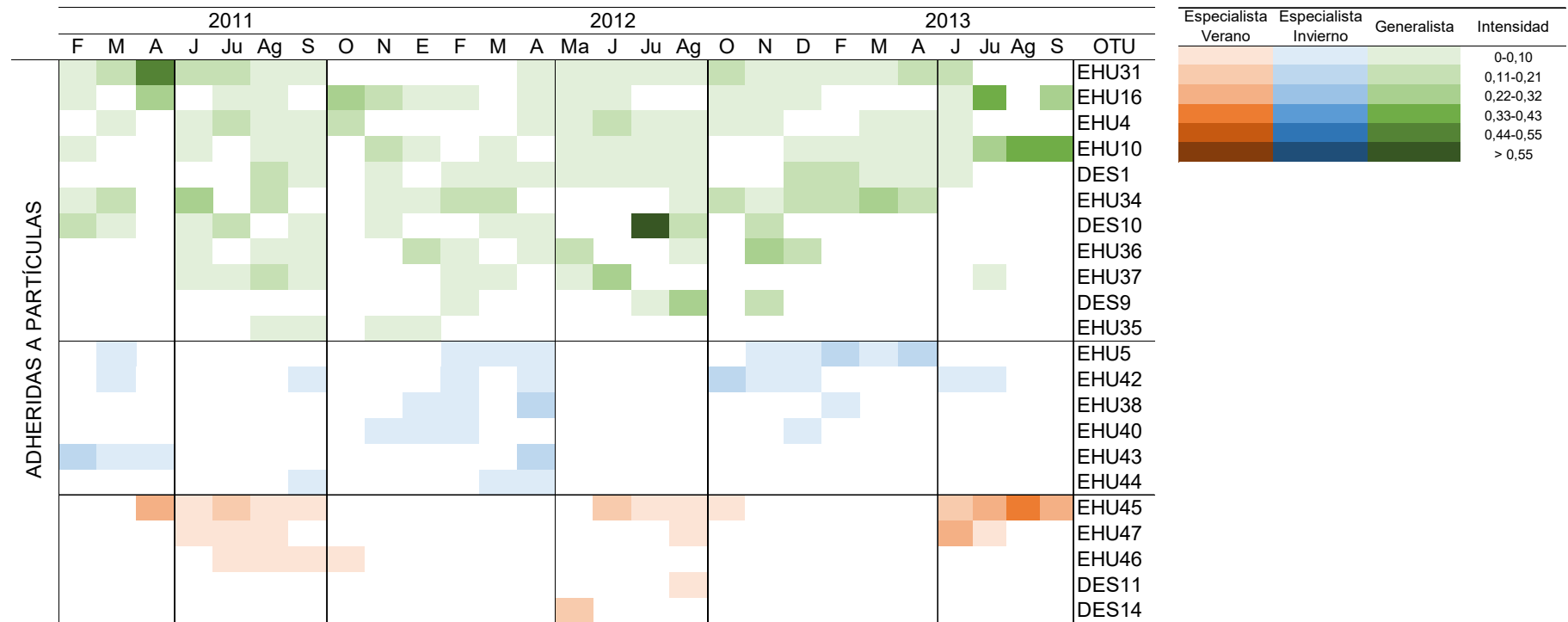


Figura 7. Representación gráfica de la intensidad analizada mediante la técnica molecular DGGE de cada OTU y su detección a lo largo del tiempo dividida en las tres comunidades estudiadas: adheridas a partículas, de vida libre y mixta. La gama de tonalidad verde hace referencia a las OTUs generalistas, la gama azul a las OTUs especialistas de invierno y la gama naranja a las especialistas de verano. DES hace referencia a OTUs no identificadas (desconocidas).

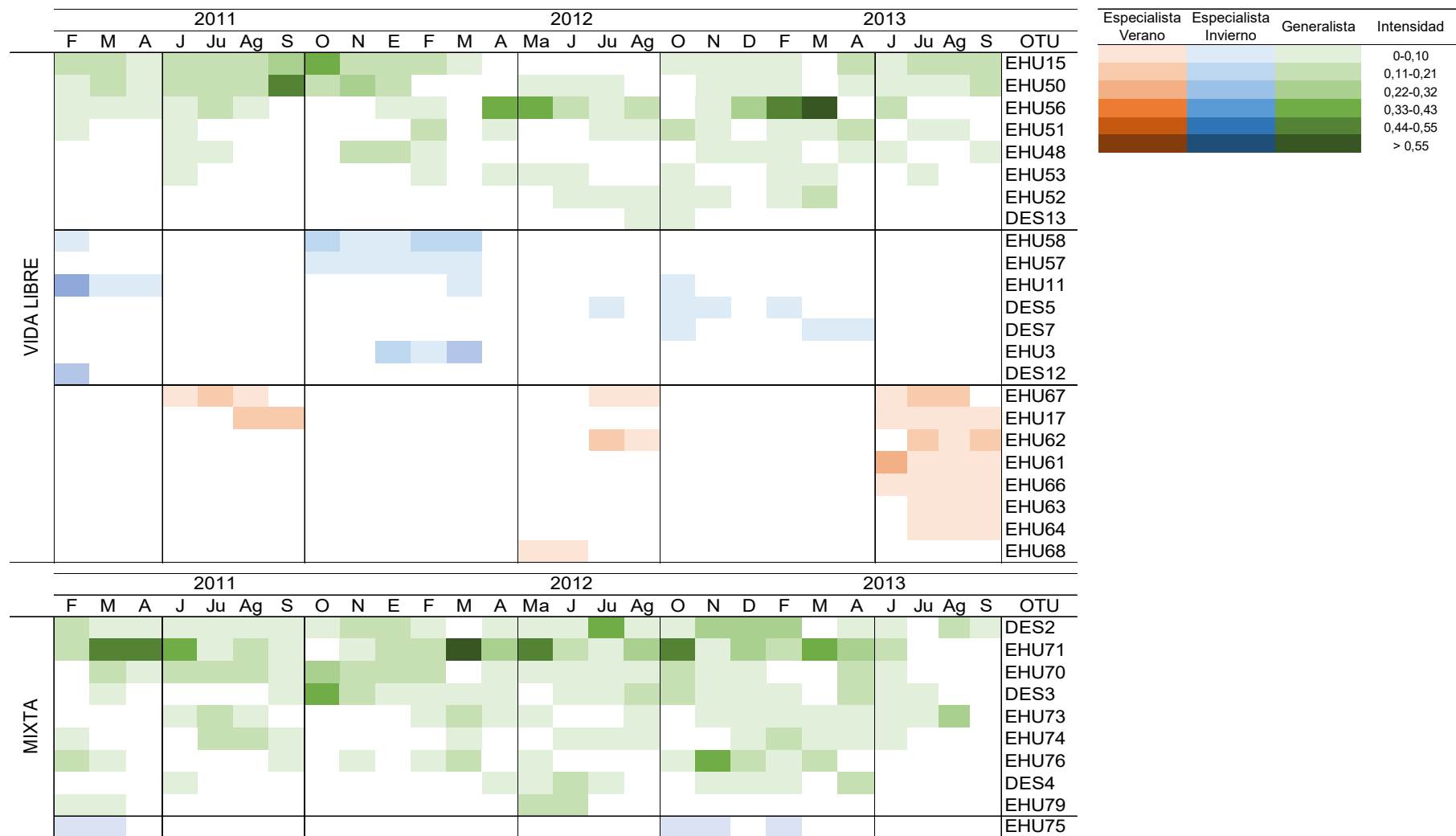


Figura 7. (continuación).

Tabla 3. Resolución taxonómica de cada OTU detectada a lo largo del estudio mediante la técnica molecular DGGE junto con el porcentaje de similitud obtenido con RDP 11, además del número de acceso adjudicado en GenBank, dividido en las tres comunidades estudiadas: adheridas a partículas, de vida libre y mixta. DES hace referencia a OTUs no identificadas (desconocidas).

	OTU	Número de Acceso GenBank	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	% similitud RDP 11
ADHERIDAS A PARTÍCULAS	EHU31	MW672408	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		100
	EHU16	MW672406	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>			91
	EHU4	MW672401	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>			90
	EHU10	MW672403	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Winogradskyella</i>	97
	DES1							
	EHU34	MW672409	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Amylibacter</i>	100
	DES10							
	EHU36	MW672411	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
	EHU37	MW672412	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family II</i>			100
	DES9							
	EHU35	MW672410	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family II</i>			99
	EHU5	MW672402	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>		100
	EHU42	MW672415	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Planktomarina</i>	100
	EHU38	MW672413	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family II</i>			100
	EHU40	MW672414	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
	EHU43	MW672416	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>		95
	EHU44	MW672417	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>			90
	EHU45	MW672418	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		100
	EHU47	MW672420	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
	EHU46	MW672419	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
DES11								
DES14								

Tabla 3. (continuación).

	OTU	Número de Acceso GenBank	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	% similitud RDP 11
VIDA LIBRE	EHU15	MW672405	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		90
	EHU50	MW672422	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pelagibacterales</i>	<i>Pelagibacteraceae</i>	<i>Pelagibacter</i>	100
	EHU56	MW672426	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		99
	EHU51	MW672423	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>		90
	EHU48	MW672421	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		100
	EHU53	MW672425	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pelagibacterales</i>	<i>Pelagibacteraceae</i>	<i>Pelagibacter</i>	100
	EHU52	MW672424	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		100
	DES13							
	EHU58	MW672428	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pelagibacterales</i>	<i>Pelagibacteraceae</i>	<i>Pelagibacter</i>	100
	EHU57	MW672427	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>		100
	EHU11	MW672404	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Jannaschia</i>	99
	DES5							
	DES7							
	EHU3	MW672400	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family IV</i>			90
	DES12							
	EHU67	MW672436	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pelagibacterales</i>	<i>Pelagibacteraceae</i>	<i>Pelagibacter</i>	100
	EHU17	MW672407	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Aliiroseovarius</i>	97
	EHU62	MW672431	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
EHU61	MW672430	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100	
EHU66	MW672435	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family II</i>			100	
EHU63	MW672432	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100	
EHU64	MW672433	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family II</i>			100	
EHU68	MW672437	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100	
	OTU	Número de Acceso GenBank	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	% similitud RDP 11
MIXTA	DES2							
	EHU71	MW672439	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
	EHU70	MW672438	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Family IV</i>			90
	DES3							
	EHU73	MW672440	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		99
	EHU74	MW672441	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		97
	EHU76	MW672443	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Saprospira</i>				90
	DES4							
	EHU79	MW672444	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>		100
	EHU75	MW672442	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>		100

En los diferentes hábitats se detectaron OTUs que aparecían a lo largo de todo el año y que denominamos generalistas (gama de color verde), así como OTUs que aparecían exclusivamente o mayoritariamente en invierno (gama de color azul) o verano (gama de color naranja), los denominados especialistas de invierno y especialistas de verano. Se utilizó la intensidad de cada OTU (una vez normalizado en función de la intensidad total de cada muestra) detectado a lo largo del estudio como indicativo de la abundancia relativa (Brüggemann *et al.*, 2000; McCaig *et al.*, 2001; Flaten *et al.*, 2003).

La mayor parte de las OTUs más abundantes de la comunidad bacteriana de la costa de Arminza se encontró en un nicho espacial específico (**Figura 8**): el 40 % de las OTUs fue detectada únicamente en la comunidad de bacterias adheridas a partículas y el 42 % fue detectada únicamente en la comunidad de bacterias de vida libre, mientras que solo el 18 % fue detectado en ambas comunidades indistintamente, por lo que se englobaron en lo que denominamos comunidad mixta. Es decir, el 82 % de las OTUs detectadas mostró un estilo de vida únicamente adherida a partículas o de vida libre a lo largo del ciclo estacional.

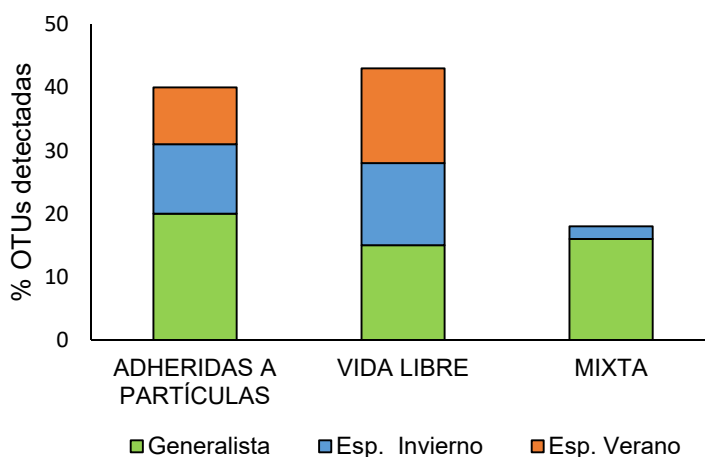


Figura 8. Porcentaje de OTUs detectadas mediante DGGE en cada una de las comunidades analizadas: adheridas a partículas, de vida libre y mixta. Las OTUs detectadas recurrentemente a lo largo del ciclo estacional fueron denominadas generalistas (verde), mientras que las OTUs detectadas exclusivamente o mayoritariamente en los meses de invierno o verano fueron denominadas especialistas de invierno (azul) y especialistas de verano (naranja), respectivamente.

La comunidad de bacterias adheridas a partículas mostró porcentajes similares entre OTUs generalistas y especialistas, ya que el 50% de las OTUs de esta comunidad fue generalista y el 50 % fue especialista, mientras que en la comunidad de bacterias de vida libre, se detectaron más OTUs especialistas que generalistas: el 65 % de las OTUs de esta comunidad fue especialista y solo el 35 % fue generalista. En la comunidad mixta, no se detectó ninguna OTU especialista de verano y la mayoría de las OTUs detectadas fueron generalistas (el 90 % de los OTUs de esta comunidad).

En la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 9**), se detectaron 7 *Bacteroidetes* (todas *Flavobacteriales* y se llegó a identificar hasta el nivel de género la OTU EHU10,

identificada como *Winogradskyella*), 6 OTUs pertenecientes a *Alfaproteobacteria* (todas *Rhodobacterales*; se llegó a identificar hasta el nivel de género las OTUs EHU34 identificada como *Amylibacter* y la OTU EHU42 identificada como *Planktomarina*) y, que se mostraron tanto como generalistas como especialistas, seguido de *Cyanobacteria* (3 OTUs) que mostraron un comportamiento mayoritariamente generalista. Solo se detectó una OTU perteneciente a *Gammaproteobacteria* que presentó un comportamiento generalista.

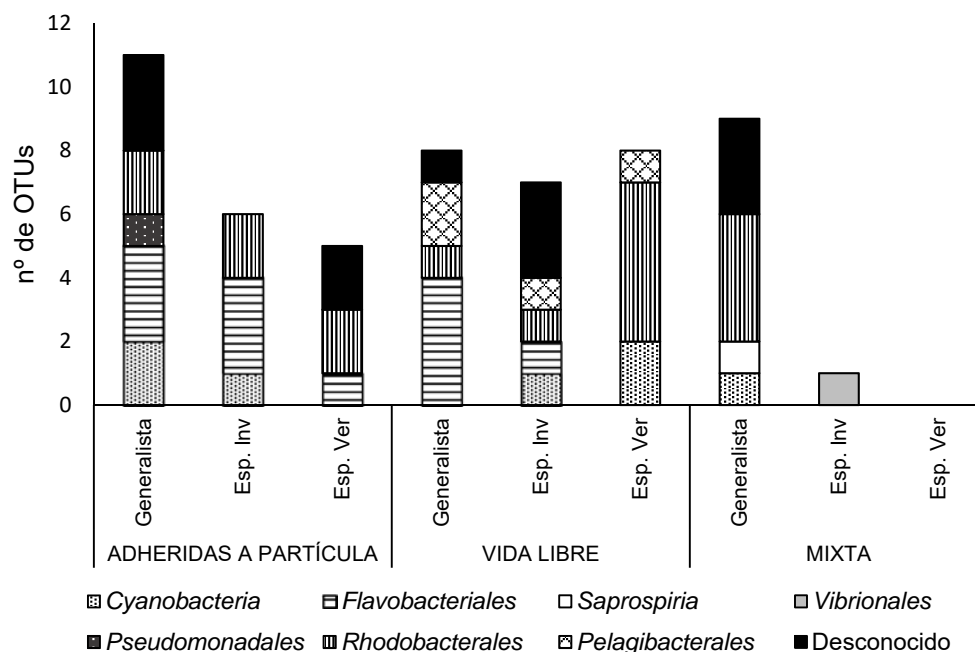


Figura 9. Número de OTUs y su pertenencia filogenética detectados mediante DGGE de cada grupo filogenético pertenecientes a las tres comunidades estudiadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta).

En la comunidad de bacterias de vida libre se observó un dominio de las *Alfaproteobacteria* (11 OTUs) compuesto por 7 *Rhodobacterales* (se llegó a identificar hasta el nivel de género las OTUs EHU11 identificada como *Jannaschia* y EHU17 identificada como *Aliiroseovarius*) y 4 *Pelagibacterales*. Seis de las 7 OTUs del orden *Rhodobacterales* mostraron un comportamiento especialista. El clado SAR11 (todas las OTUs que se identificaron a nivel de género pertenecieron a *Pelagibacter*) solo se detectó en esta comunidad y de las 4 OTUs asignadas a este clado, 2 fueron generalistas y 2 especialistas. Cuatro de los 5 *Bacteroidetes* (orden *Flavobacteriales*) libres detectados fueron generalistas. Por el contrario, las *Cyanobacterias* de esta comunidad presentaron un marcado comportamiento especialista.

En la comunidad mixta fue clara la dominancia de *Alfaproteobacteria* (orden *Rhodobacterales*, con 4 OTUs) que mostró un comportamiento generalista. Se detectó una única OTU de la clase *Saprospira* del filo *Bacteroidetes* que también fue generalista, al igual que la única *Cyanobacteria* que se detectó. Por el contrario, la única OTU de *Gammaproteobacteria* (orden *Vibrionales*) que se detectó mostró un comportamiento especialista.

El número de OTUs pertenecientes a *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* en invierno y verano fue similar en las comunidades adheridas a partículas y mixta sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$), mientras que en la comunidad de bacterias de vida libre se detectó un mayor número de OTUs pertenecientes a *Alfaproteobacteria* en verano ($p < 0,05$). Sin embargo, al analizar los datos basados en la intensidad y no en el número de OTUs, no se detectaron diferencias significativas en la preferencia sobre invierno o verano entre *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes*.

El valor del índice de diversidad de Shannon basado en los datos de intensidad obtenidos mediante DGGE (**Figura 10**) no mostró diferencias significativas entre invierno y verano en ninguna de las 3 comunidades analizadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta). Sin embargo, en la comunidad de bacterias de vida libre se detectó que el valor medio del índice de diversidad de Shannon en abril fue menor que el valor medio del resto de los meses de invierno ($p < 0,05$). Además, en el mes de septiembre se detectó el valor medio más bajo de este índice respecto al valor medio del resto de los meses de verano ($p = 0,05$).

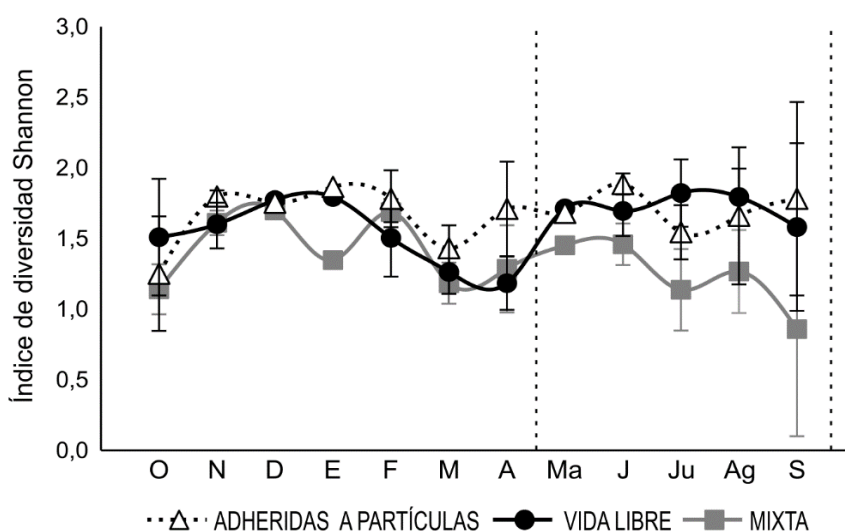


Figura 10. Evolución temporal del índice de diversidad Shannon basado en los datos de DGGE en las tres comunidades estudiadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta). Los puntos representan el valor medio de los tres años y las barras el error estándar. La primera línea discontinua indica la separación de los meses de invierno (octubre a abril) de los meses de verano (mayo a septiembre) y la segunda línea discontinua indica la separación de los meses de verano de los meses de invierno.

2.3 Relación entre la composición de la comunidad bacteriana y las variables estudiadas

Se utilizaron los datos de intensidad de la comunidad bacteriana obtenidos mediante DGGE de cada una de las comunidades para generar redes de asociación basadas en las interacciones potenciales entre unidades taxonómicas operativas (OTU) y entre OTUs y variables abióticas, bióticas (I) y bióticas (II) mediante el Análisis de Similitud Local (LSA, Ruan *et al.*, 2006a). Los resultados detallados de este análisis se presentan en las **Tablas suplementarias 4-15**.

En la **Tabla 4** se presentan las interacciones detectadas mediante LSA en las comunidades de bacterias adheridas a partículas, de vida libre y mixta. Se presentan los números totales, así como el porcentaje de correlaciones significativas respecto de las posibles para cada comunidad de los siguientes grupos de análisis: OTUs detectadas mediante DGGE y las variables abióticas, OTUs con las variables bióticas (I) y (II), y entre las OTUs pertenecientes a la misma comunidad. Se indican además aquellas correlaciones significativas retrasadas 1 mes.

Los porcentajes de correlaciones significativas entre las OTUs y las variables abióticas fueron similares en las comunidades de bacterias adheridas a partículas y de vida libre (24 % en los dos casos) y menor en la comunidad mixta (17 %). Cabe destacar que la comunidad de bacterias adheridas mostró un porcentaje de correlaciones significativas retrasadas (5,8 %) superior que la comunidad mixta (4,3 %) y estas dos a su vez, mostraron valores superiores que la comunidad de bacterias de vida libre (1,2 %).

Al analizar las correlaciones entre las OTUs y las variables bióticas (I), se observaron porcentajes de correlaciones significativas similares en las tres comunidades: 25 %, 23 % y 24 % en las comunidades de bacterias adheridas a partículas, de vida libre y mixta respectivamente. Respecto a las variables bióticas (II), los porcentajes de correlaciones significativas también fueron similares en las tres comunidades (13 %, 12 % y 15 % en las comunidades de bacterias adheridas a partículas, de vida libre y mixta respectivamente) e inferiores a las correlaciones con las variables bióticas (I).

Finalmente, el porcentaje de correlaciones significativas respecto a las interacciones entre OTUs, fue superior en la comunidad de bacterias de vida libre (19 %) en comparación con la comunidad de bacterias adheridas (15%) y mixta (9 %). Además, el porcentaje de correlaciones positivas significativas fue superior al de correlaciones significativas negativas en las tres comunidades: bacterias adheridas a partículas (11 % vs 4 %), de vida libre (14 % vs 5 %) y mixta (9 % vs 0 %).

Los datos obtenidos del Análisis de Similitud Local se utilizaron para generar redes de asociación entre unidades taxonómicas operativas y las variables abióticas, bióticas (I) y bióticas (II) de la comunidad de bacterias adheridas a partículas y comunidad de bacterias de vida libre, así como entre OTUs de las dos comunidades. En las **Figuras 11, 12, 13 y 14** se representan estas redes de asociación simplificadas, de modo que solo se indican aquellas interacciones con un valor $LS \geq 0,2$, $p < 0,05$ y $q < 0,10$. No se muestran las redes de asociación obtenidas de la comunidad mixta por el bajo número de interacciones observadas así como por no poder concretar de qué tipo de hábitat proceden.

Tabla 4. Resumen de las interacciones detectadas mediante LSA en las comunidades adheridas a partículas, de vida libre y mixta. Se presentan los números totales, así como el porcentaje de correlaciones significativas respecto de las posibles para cada comunidad de los análisis de OTUs detectadas mediante DGGE y las variables abióticas, las variables bióticas (I) y (II), y entre las OTUs pertenecientes a la misma comunidad. El número de correlaciones con un mes de retraso (retr) están marcadas en gris.

	Número de correlaciones	Comunidad						Porcentaje correlaciones significativas	Comunidad						
		ADHERIDAS	retr	LIBRE	retr	MIXTA	retr		ADHERIDAS	retr	LIBRE	retr	MIXTA	retr	
	Posibles	154		161		70									
OTU vs variables abióticas	Positivas	20	6	20	1	5	2	Positivas	13	3,9	12	0,6	7	2,9	
	Negativas	17	3	18	1	7	1	Negativas	11	1,9	11	0,6	10	1,4	
	Totales	37	9	38	2	12	3	Totales	24	5,8	24	1,2	17	4,3	
	Posibles	110		115		50									
OTU vs variables bióticas (I)	Positivas	16	5	18	2	8	3	Positivas	15	4,5	16	1,7	16	6,0	
	Negativas	11	0	8	1	4	0	Negativas	10	0,0	7	0,9	8	0,0	
	Totales	27	5	26	3	12	3	Totales	25	4,5	23	2,6	24	6,0	
	Posibles	88		92		40									
OTU vs variables bióticas (II)	Positivas	8	2	9	0	3	1	Positivas	9	2,3	10	0,0	8	2,5	
	Negativas	3	0	2	0	3	0	Negativas	3	0,0	2	0,0	8	0,0	
	Totales	11	2	11	0	6	1	Totales	13	2,3	12	0,0	15	2,5	
	Posibles	231		253		45									
OTU vs OTU	Positivas	25	7	36	5	4	1	Positivas	11	3,0	14	2	9	2,2	
	Negativas	9	1	13	3	0	0	Negativas	4	0,4	5	1,2	0	0,0	
	Totales	34	8	49	8	4	1	Totales	15	3,5	19	3,2	9	2,2	

En las redes de asociación de OTUs con variables abióticas de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 11A**), se observó un cluster complejo en el que las variables no mostraron una relación concreta con la dispersión de las OTUs. En cambio, en la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 11B**), se observaron dos clústeres diferenciados, el primero, un cluster mixto en el que las OTUs se asocian principalmente con la temperatura de superficie del agua y los minutos de luz, y un segundo clúster en el que las OTUs se asocian con la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta.

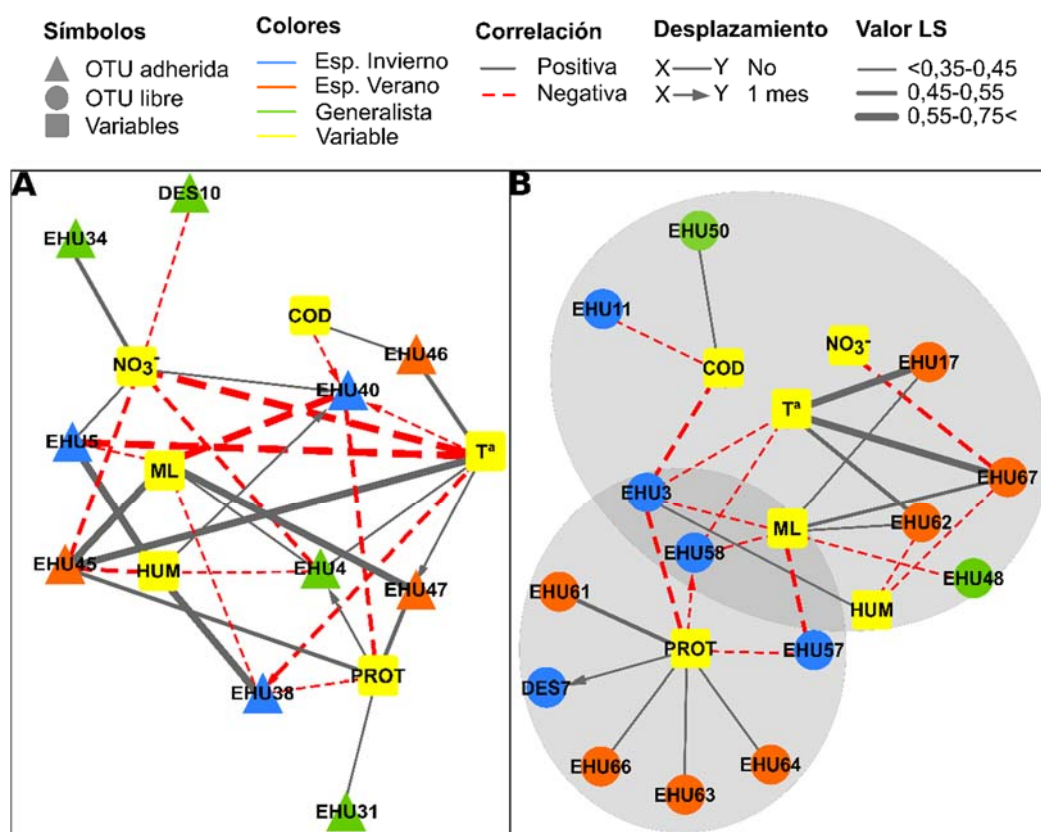


Figura 11. Redes de asociación basadas en LSA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (A) y la comunidad de bacterias de vida libre (B) que indican las interacciones entre OTUs y variables abióticas con un valor $LS \geq 0,2$; $p < 0,05$ y $q < 0,10$. Las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas se representaron mediante triángulos y las OTUs de la comunidad de bacterias de vida libre mediante círculos. Las variables fueron representadas mediante un recuadro amarillo: temperatura de superficie del agua (T^a), minutos de luz (ML), concentración de nitrato (NO_3^-), fracción proteica (PROT) y húmica (HUM) de materia orgánica fluorescente disuelta y concentración de carbono orgánico disuelto (COD). Las OTUs con fondo azul (especialistas de invierno), con fondo naranja (especialistas de verano) y con fondo verde (generalistas). Las líneas continuas grises indican correlaciones positivas sin retraso, las líneas discontinuas rojas indican correlaciones negativas sin retraso, las flechas grises indican correlaciones positivas con un mes de retraso y las flechas discontinuas rojas indican correlaciones negativas con un mes de retraso. Se han sombreado en gris los clústeres observados para una mejor visualización.

En cambio, al analizar las relaciones entre las variables bióticas (I) y las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 12A**), se observaron dos clústeres claramente diferenciados: un primer gran clúster (con 10 OTUs) en el que todas las OTUs se asocian con la concentración de clorofila *a*, y en algunos casos también con la densidad de *Synechococcus*,

nanoflagelados heterótrofos y/o partículas víricas, y un segundo clúster más pequeño (2 OTUs) relacionadas solo con la densidad de *Prochlorococcus*. En la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 12B**), se detectaron menos asociaciones, y no se observó una asociación mayoritaria con la concentración de clorofila *a* como en el caso de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Sin embargo, se observó una asociación positiva entre OTUs especialistas de verano (4 OTUs) con la densidad de *Synechococcus* y en algunos casos también con la densidad de nanoflagelados heterótrofos y/o partículas víricas y un clúster separado (3 OTUs) relacionado con la densidad de *Prochlorococcus*.

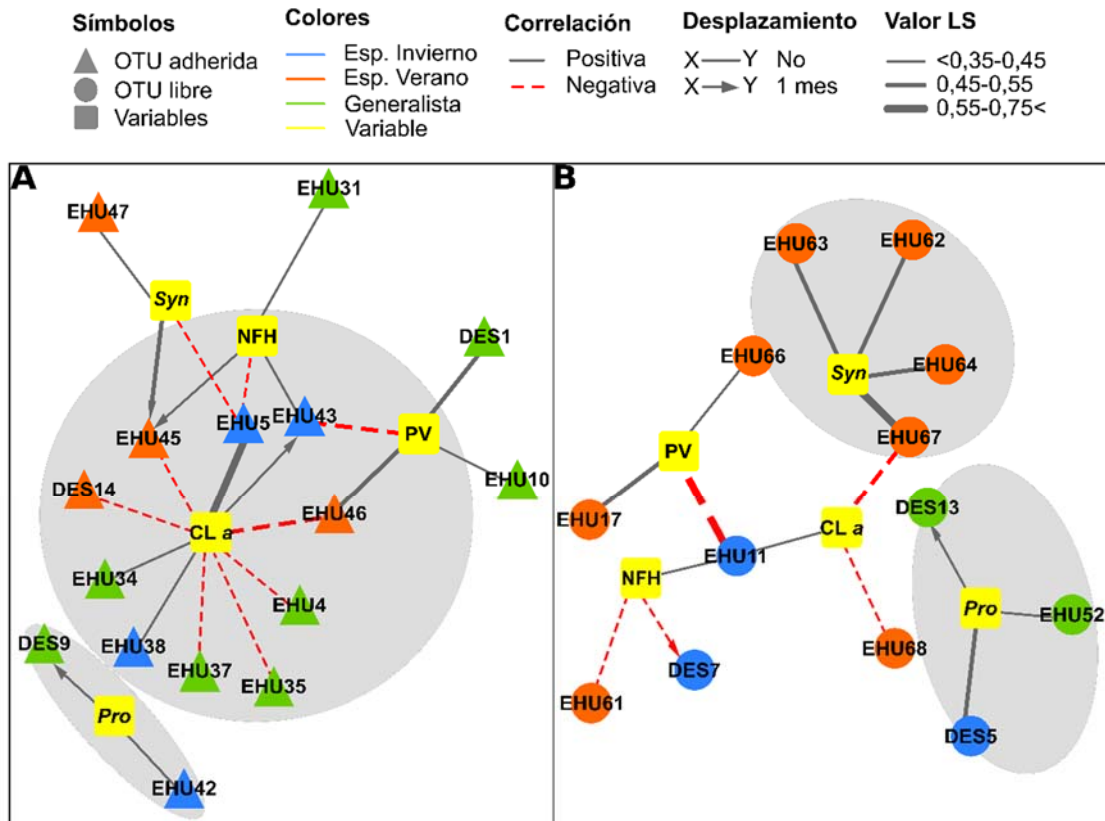


Figura 12. Redes de asociación basadas en LSA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (A) y la comunidad de bacterias de vida libre (B) que indican las interacciones entre OTUs y variables bióticas (I) con un valor $LS \geq 0,2$; $p < 0,05$ y $q < 0,10$. Las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas se representaron mediante triángulos y las OTUs de la comunidad de bacterias de vida libre mediante círculos. Las variables fueron representadas mediante un recuadro amarillo: concentración de clorofila *a* (CL *a*), densidad de *Synechococcus* (*Syn*) y *Prochlorococcus* (*Pro*), densidad de partículas víricas (PV) y densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH). Las OTUs con fondo azul (especialistas de invierno), con fondo naranja (especialistas de verano) y con fondo verde (generalistas). Las líneas continuas grises indican correlaciones positivas sin retraso, las líneas discontinuas rojas indican correlaciones negativas sin retraso, las flechas grises indican correlaciones positivas con un mes de retraso y las flechas discontinuas rojas indican correlaciones negativas con un mes de retraso. Se han sombreado en gris los clústeres observados para una mejor visualización.

Al analizar las relaciones entre las variables bióticas (II) y las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 13A**) se observaron muy pocas asociaciones. Se observaron dos clústeres, el primero compuesto por una única OTU que mostró una relación

positiva con la producción bacteriana y un segundo clúster compuesto por 3 OTUs que mostraron tanto relaciones positivas como negativas con la respiración bacteriana y la demanda bacteriana de carbono. En la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 13B**) la respiración, producción y la demanda bacteriana de carbono solo mostraron correlaciones positivas con 3 OTUs, todas ellas especialistas de verano.

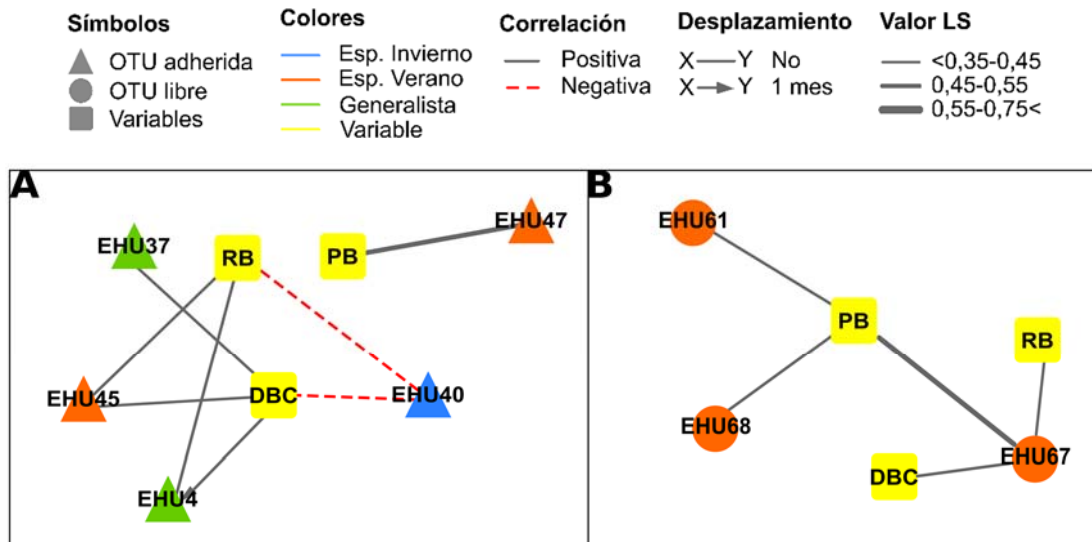


Figura 13. Redes de asociación basadas en LSA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (A) y la comunidad de bacterias de vida libre (B) que indican las interacciones entre OTUs y variables bióticas (II) con un valor $LS \geq 0,2$; $p < 0,05$ y $q < 0,10$. Las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas se representaron mediante triángulos y las OTUS de la comunidad de bacterias de vida libre mediante círculos. Las variables fueron representadas mediante un recuadro amarillo: producción bacteriana (PB), respiración bacteriana (RB) y demanda bacteriana de carbono (DBC). Las OTUs con fondo azul (especialistas de invierno), con fondo naranja (especialistas de verano) y con fondo verde (generalistas). Las líneas continuas grises indican correlaciones positivas sin retraso, las líneas discontinuas rojas indican correlaciones negativas sin retraso.

Al comparar las redes de asociación obtenidas de las interacciones entre OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 14A**) se observó un clúster complejo con relaciones positivas y negativas. En cambio, en la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 14B**), se observaron dos clústeres, el primero compuesto por OTUs especialistas de verano y un segundo clúster compuesto por especialistas de invierno y generalistas.

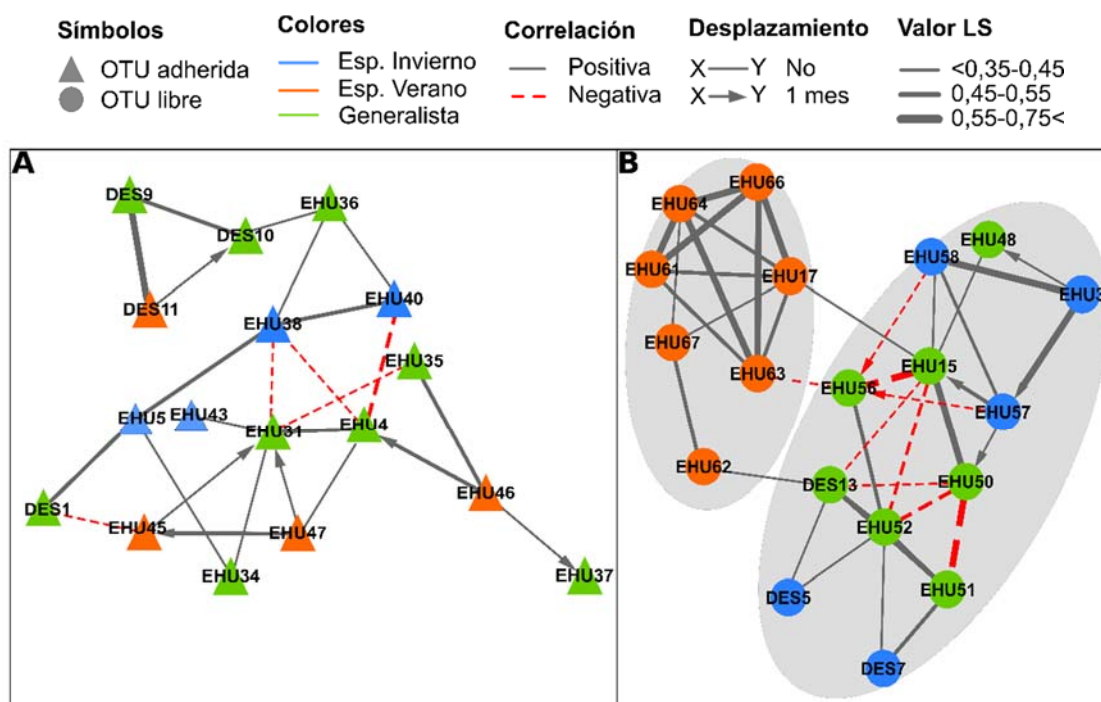


Figura 14. Redes de asociación basadas en LSA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (A) y la comunidad de bacterias de vida libre (B) que indican las interacciones entre OTUs con un valor LS $\geq 0,2$; $p < 0,05$ y $q < 0,10$. Las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas se representaron mediante triángulos y las OTUs de la comunidad de bacterias de vida libre mediante círculos. Las OTUs con fondo azul (especialistas de invierno), con fondo naranja (especialistas de verano) y con fondo verde (generalistas). Las líneas continuas grises indican correlaciones positivas sin retraso, las líneas discontinuas rojas indican correlaciones negativas sin retraso, las flechas grises indican correlaciones positivas con un mes de retraso y las flechas discontinuas rojas indican correlaciones negativas con un mes de retraso. Se han sombreado en gris los clústeres observados para una mejor visualización.

3 Discusión

Este trabajo se ha centrado en conocer la composición de la comunidad bacteriana en aguas superficiales de la estación costera de Armintza (Mar Cantábrico oriental) a lo largo del ciclo estacional en un estudio plurianual de tres años de duración, con la intención de detectar no solo cambios en la composición de la comunidad sino también los factores que desencadenan y regulan estos cambios. Con el fin de conseguir una perspectiva más global, se han combinado dos técnicas moleculares, CARD-FISH y DGGE, que nos han ofrecido información a distinta resolución taxonómica. Mientras que mediante CARD-FISH se ha cuantificado la importancia relativa de los principales grupos filogenéticos, mediante DGGE se han podido conocer los componentes bacterianos principales de la comunidad y su situación espaciotemporal diferenciando distintas comunidades en función de su hábitat (partículas, y/o fase líquida) y de la situación estacional (verano-invierno).

En esta estación se han detectado dos situaciones estables a lo largo del ciclo estacional: invierno (octubre a abril) y verano (mayo a septiembre). El invierno se caracteriza por menor

temperatura del agua y minutos de luz, y mayores concentraciones de clorofila *a*, nitratos y de la fracción húmica de la materia orgánica fluorescente disuelta que en verano. Tal y como indican Serret *et al.* (1999), el Golfo de Vizcaya muestra un marcado ciclo estacional como resultado principalmente de la estratificación que comienza alrededor de marzo-abril, con el calentamiento de las aguas superficiales, provocando una picnoclina de verano estable que se extiende hasta septiembre-octubre, cuando la temperatura de la superficie comienza a caer y se mezcla con aguas más profundas.

En Armintza se han detectado dos momentos a lo largo del año en los que ocurren afloramientos fitoplanctónicos. El primero, eucariótico, se produce a finales del invierno, con el aumento de la clorofila *a* junto con la disminución de la concentración de silicato (**Figuras 4A y 3B; Tablas suplementarias 2 y 1**), que sugiere el desarrollo de un afloramiento de diatomeas. Otros autores también han encontrado valores máximos de la concentración de clorofila *a* a finales de invierno o principios de la primavera en el sur del Golfo de Vizcaya (Estrada, 1982; Calvo-Díaz *et al.*, 2008) y se han detectado afloramientos de diatomeas (Morozov *et al.*, 2013; Smythe-Wright *et al.*, 2014; Baña *et al.*, 2020). El segundo momento de afloramiento fitoplanctónico, sin embargo, es procariótico, y ocurre entre julio y agosto con el aumento de la densidad de cianobacterias (principalmente *Synechococcus*) y bajas concentraciones de clorofila *a* y nutrientes inorgánicos. Este afloramiento fitoplanctónico procariótico también ha sido observado por otros autores en aguas costeras del Mar Cantábrico (Morán, 2007; Calvo-Díaz *et al.*, 2008).

Respecto a la composición de la comunidad bacteriana analizada mediante CARD-FISH, cabe destacar la alternancia entre dos grupos filogenéticos: *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes*. *Alfaproteobacteria* domina en invierno mientras que su importancia relativa decrece en abril. En cambio, *Bacteroidetes* aumenta su abundancia relativa en abril siendo el grupo mayoritario en verano. Entre septiembre y octubre, vuelve a observarse el cambio de la dominancia entre *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* al detectarse una disminución de la abundancia relativa de *Bacteroidetes* y un aumento de *Alfaproteobacteria*. Esta sucesión también fue observada en el trabajo previo realizado en la misma estación costera (Baña *et al.*, 2020) llevado a cabo durante los años 2008-2012. Además, otros autores como Teira *et al.* (2008), en un trabajo realizado en aguas costeras atlánticas, mediante experimentos llevados a cabo durante cuatro periodos del ciclo estacional, observaron la alternancia de *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* asociada a las diferentes fases del crecimiento del fitoplancton, al observar la dominancia de los primeros durante el crecimiento activo del fitoplancton y los segundos durante la fase de descomposición de diatomeas. De la misma manera, Mary *et al.* (2006) en un trabajo llevado a cabo en la parte oeste del Canal de la Mancha también observaron la dominancia de *Bacteroidetes* durante la primavera y principio de verano, mientras que *Alfaproteobacteria* dominó desde finales de verano e invierno.

En las aguas superficiales de la estación costera de Armintza, la materia orgánica disuelta fresca derivada del crecimiento de las diatomeas a finales del invierno pudo favorecer el

crecimiento de *Bacteroidetes* e inducir el primer cambio en la composición de la comunidad bacteriana de abril. *Bacteroidetes* es un filo que se ha asociado con estrategias de crecimiento rápido (estrategas r), y especializado en la degradación inicial de biopolímeros complejos en los ambientes marinos (Kirchman, 2002; Bauer *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008). En este sentido, un análisis del genoma de un representante de *Bacteroidetes* marino de la clase *Flavobacteria* reveló adaptaciones para la degradación de la materia orgánica polimérica (Bauer *et al.*, 2006). Riemann *et al.* (2000) observaron una rápida colonización de la materia particulada por bacterias relacionadas a *Cytophagales* (*Bacteroidetes*) después de un afloramiento de diatomeas que simularon en un mesocosmos. Otros estudios también mostraron que los miembros de la clase *Flavobacteria* (*Bacteroidetes*) responden a los afloramientos inducidos de fitoplancton (Pinhassi *et al.*, 2004) y que están involucrados en la colonización inicial de los detritos de diatomeas (Abell y Bowman, 2005). Sin embargo, a finales del verano, la excreción de materia orgánica altamente lábil por parte de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Biddanda y Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005) y/o la liberación de materia orgánica como resultado de la muerte celular posafloramiento de estos procariontes fitoplanctónicos (Ducklow *et al.*, 1993; Merzouk *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2017), pudo generar el segundo cambio observado entre septiembre y octubre con un aumento en la importancia relativa de *Alfaproteobacteria* que se asocian a la adquisición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Teeling *et al.*, 2012).

La técnica de DGGE, al ser un método molecular que conlleva una amplificación de ADN mediante PCR, proporciona información de la diversidad o fracción de las especies más numerosas y relevantes ecológicamente para el ecosistema (Suzuki y Giovannoni, 1996; Wintzingerode *et al.*, 1997). Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones a la hora de generar datos de abundancia basados en la intensidad al estar sujeta a sesgos propios de la técnica donde se incluyen las posibles eficiencias de amplificación desiguales (Suzuki y Giovannoni, 1996; Suzuki *et al.*, 1998). Algunos autores han observado que la aplicación de la PCR al ADN de comunidades mixtas puede sesgar la proporción de los productos con respecto a su proporción inicial (Suzuki y Giovannoni, 1996; Polz y Cavanaugh, 1998; Suzuki *et al.*, 1998), por lo que una aplicación conservadora como la transformación de los datos obtenidos en presencia/ausencia puede ser otra opción. Sin embargo, estos análisis son insensibles a las diferencias en la dominancia y uniformidad (*evenness*) de especies, lo que puede distorsionar las relaciones ecológicas en el conjunto de datos (Muylaert *et al.*, 2002). Yannarell y Triplett (2005), observaron que, al aplicar transformaciones de presencia/ausencia, los índices de similitud como Bray-Curtis pueden verse desproporcionadamente influenciados por las especies menos abundantes, ya que estas transformaciones ponderan todas las especies de manera idéntica (Clarke y Green, 1988; Clarke, 1993). Por lo tanto, aunque el método DGGE no es en principio cuantitativo, la variación relativa de la intensidad de la banda refleja en cierta medida la abundancia relativa, no absoluta, de diferentes grupos bacterianos (Brüggemann *et al.*, 2000; McCaig *et al.*, 2001; Flaten *et al.*, 2003), por lo que se ha utilizado el dato de intensidad obtenido de los geles de DGGE como indicador de la abundancia relativa de las bacterias.

Combinando la técnica DGGE y la filtración secuencial, en aguas superficiales de la estación costera de Armintza hemos diferenciado dos comunidades bacterianas con diferente hábitat: la comunidad compuesta por bacterias adheridas a partículas y la comunidad compuesta por bacterias de vida libre, que constituyen conjuntamente el 82 % de las OTUs encontradas. Además, hemos detectado una tercera comunidad, denominada mixta, que abarca el restante 18 % de las OTUs totales, y que está compuesta por bacterias que se encuentran indistintamente adheridas a partículas o libres en la columna de agua. Mientras que numerosos trabajos han observado una clara diferencia de composición entre la comunidad de bacterias adheridas a partículas y la comunidad de bacterias de vida libre (Acinas *et al.*, 1999; Rink *et al.*, 2007; Mohit *et al.*, 2014), otros señalan intercambios entre las fracciones de bacterias de vida libre y adheridas a partículas (Hollibaugh *et al.*, 2000; Grossart *et al.*, 2007; Grossart, 2010). Este intercambio puede deberse tanto a factores propiamente biológicos como a factores técnicos derivados de la manipulación de la muestra (Bižić-Ionescu *et al.*, 2014).

No es sorprendente que las comunidades bacterianas adheridas a partículas y de vida libre sean dinámicas, y que la interacción entre los dos grupos de bacterias se acompañe de una adhesión y/o separación activa desde las partículas (Riemann y Winding, 2001; Kjørboe *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015). La interacción entre bacterias y partículas sugiere que diferentes tipos de bacterias han desarrollado un estilo de vida complejo, que comprende etapas de vida libre así como otras asociadas a partículas (Grossart, 2010), lo que ha sido observado tanto en experimentos de laboratorio usando soportes de agar artificiales (Kjørboe *et al.*, 2002) como en muestras naturales (Grossart *et al.*, 2003). González *et al.* (2008) propusieron que algunas bacterias pueden cambiar de estilo de vida a causa de desencadenantes químicos y la disponibilidad de sustratos. Además, Unanue *et al.* (1998) y Ortega-Retuerta *et al.* (2013) sugirieron que la calidad de las partículas puede ser un factor importante que influye en el intercambio de las comunidades bacterianas entre las fracciones adheridas y de vida libre. Sin embargo, en Armintza se han observado dos comunidades claramente diferenciadas y solo una pequeña fracción de la comunidad, la comunidad mixta, pudiera ser la resultante de un intercambio entre los hábitats fase líquida y partícula.

Existen algunas limitaciones potenciales asociadas con la técnica de filtración secuencial, ya que el tamaño de poro de los filtros utilizados puede sesgar los resultados a la hora de establecer las comunidades. En este sentido, las bacterias adheridas pueden desprenderse de las partículas durante la filtración y a su vez, las bacterias de vida libre pueden quedarse atrapadas en los filtros de tamaño de poro mayores bien por tener un tamaño superior a 3 μm , por tener una estructura filamentosa o porque el filtro se obture reteniendo a bacterias libres de menor tamaño (Simon *et al.*, 2014; Mestre *et al.*, 2017; Heins *et al.*, 2021). Si bien tanto la retención como la pérdida celular pueden ocurrir, el método de fraccionado por tamaño de poro de 3 μm usado en este trabajo ha sido utilizado por otros autores para diferenciar las comunidades de bacterias adheridas a partículas y las bacterias de vida libre (Ortega-Retuerta *et al.*, 2013; Alonso-Sáez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Además, las condiciones de filtración de

la muestra mediante bomba peristáltica fueron de muy baja velocidad, para evitar la rotura de partículas y la liberación de bacterias adheridas. Por otra parte, la retención de bacterias libres en el filtro de 3,0 µm de tamaño de poro se evitó filtrando un volumen bajo de muestra (3 litros) y evitando en todo momento la saturación del filtro.

La composición de las comunidades de bacterias adheridas a partículas, de vida libre y mixta presentó ciertas diferencias. Mientras que en la comunidad de bacterias adheridas a partículas el número de OTUs pertenecientes a *Alfaproteobacteria* (orden *Rhodobacterales*) y a *Bacteroidetes* (orden *Flavobacteriales*) fue similar, en la comunidad de bacterias de vida libre se observó un dominio de *Alfaproteobacteria*, compuesto por *Rhodobacterales* y SAR11 (orden *Pelagibacterales*), siendo este último detectado exclusivamente en esta comunidad. Sapp *et al.* (2007), también observaron que las *Alfaproteobacteria* y *Flavobacteria* aparecían en las dos fracciones estudiadas. Sin embargo, mientras que en su estudio detectaron las *Gammaproteobacteria* solamente en la fracción de vida libre, en nuestro caso se han detectado en las comunidades de bacterias adheridas a partículas y mixta. En ese mismo trabajo se detectaron *Betaproteobacteria*, que en nuestro caso no se han observado, y esto puede ser debido a la menor abundancia de este filotipo en nuestro sistema, ya que su abundancia media cuantificada mediante CARD-FISH no superó el 10 %.

Los grupos filogenéticos que son colonizadores dominantes de partículas incluyen *Flavobacteria* (previamente conocidas como *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes*) y *Gammaproteobacteria* (Simon *et al.*, 2002). Las *Flavobacteria*, como colonizadores de partículas, desempeñan un papel especialmente destacado en la degradación de la materia orgánica (Pinhassi *et al.*, 2004; Abell y Bowman, 2005), aunque se han detectado tanto en la fracción asociada a partículas como en la fracción de vida libre (Rink *et al.*, 2007; Jain y Krishnan, 2017). Al igual que en Armintza, también ha sido observada una preferencia de la *Alfaproteobacteria* SAR11 por la fracción de vida libre (Allen *et al.*, 2012; Crespo *et al.*, 2013; Suter *et al.*, 2018). Estas bacterias tienen un genoma pequeño y están genéticamente preparadas para la vida libre gracias al uso eficiente de substratos disueltos (Giovannoni *et al.*, 2005; Giovannoni, 2017).

Los altos porcentajes (15-25 % del total de sondas positivas) de *Gammaproteobacteria* detectados con CARD-FISH contrastan con la detección de únicamente 2 OTUs asociadas a este grupo mediante DGGE. La comparación de los resultados de DGGE y CARD-FISH no es directa debido a los diferentes niveles de resolución filogenética de cada técnica, y existe un consenso sobre las limitaciones de cada metodología (Amann *et al.*, 1995; Wintzingerode *et al.*, 1997). En la DGGE, debido a los problemas para obtener secuencias de bandas débiles o por la cercanía de dos bandas que imposibilitaban su escisión, no todas las bandas pudieron ser secuenciadas, por lo que no se puede descartar que las diferencias entre la composición mediante DGGE y CARD-FISH se deba a una secuenciación insuficiente. Además, los errores de PCR y el número de copias variables de los operones ARNr pueden sobreestimar o subestimar grupos específicos en comparación con la cuantificación directa obtenida mediante

CARD-FISH (Sánchez *et al.*, 2011). La discrepancia entre la escasa detección de OTUs mediante DGGE comparado con CARD-FISH también fue observada por Castle y Kirchman (2004) y Alonso-Sáez *et al.* (2007). En este trabajo y con la intención de obtener una visión más exacta de los cambios que se dan en la composición de la comunidad bacteriana y la detección de distintas comunidades, se ha optado por la combinación de CARD-FISH y DGGE para evaluar la composición de la comunidad bacteriana a distintos niveles de resolución filogenética.

Dentro de cada una de estas comunidades se pudo observar una marcada estacionalidad en algunas de las OTUs que las componen, ya que determinadas OTUs aparecieron mayoritariamente o exclusivamente durante los meses de invierno (especialistas de invierno), o durante los meses de verano, (especialistas de verano). Pero también en las tres comunidades se observaron otras OTUs, que denominamos generalistas, que se detectaron indistintamente en verano e invierno.

La comunidad de bacterias adheridas a partículas mostró porcentajes similares entre OTUs generalistas y especialistas, ya que el 50 % de las OTUs de la comunidad de bacterias adheridas a partículas fueron generalistas y el 50 % fueron especialistas. En la comunidad de bacterias de vida libre se detectaron más OTUs especialistas que generalistas: el 65 % de las OTUs de esta comunidad fueron especialistas frente al 35 % que fueron generalistas. En la comunidad mixta, la mayoría de las OTUs detectadas (90 % de las OTUs de esta comunidad) fueron generalistas. Los muy diferentes nichos ecológicos en los que se desarrollan las distintas comunidades pueden explicar las distintas abundancias relativas de generalistas y especialistas de las mismas. Si bien en las tres comunidades encontramos taxones generalistas y especialistas, la comunidad mixta está compuesta casi íntegramente por generalistas, en la comunidad de bacterias adheridas a partículas ambos tipos están equilibrados y en la comunidad de bacterias de vida libre la proporción de especialistas : generalistas es de 2 : 1. Esto puede ser debido a que las partículas proporcionan un ambiente estable (Grossart *et al.*, 2003) y son ricas en nutrientes (Aldredge y Cohen, 1987; Stocker, 2012; Ganesh *et al.*, 2014), lo que permite el desarrollo de determinados taxones independientemente de las condiciones ambientales, en tanto que las bacterias de vida libre están directamente expuestas al agua circundante por lo que la composición de esta comunidad resulta más variable en función de las características ambientales de la fase líquida en cada momento del ciclo anual. Además, la comunidad mixta, que puede encontrarse indistintamente en estado libre y/o adherido, está compuesta mayoritariamente por bacterias generalistas. Otros autores como Yung *et al.* (2016) han encontrado resultados similares, observando una mayor variabilidad en la comunidad de bacterias de vida libre respecto a la comunidad de bacterias adheridas a partículas frente a los factores ambientales, especialmente la temperatura. Estos autores postularon que las bacterias de vida libre probablemente presentaban una mayor respuesta a las propiedades del agua que las bacterias adheridas a partículas, debido a su exposición y dependencia de los recursos. Bachmann *et al.* (2018) también indicaron una mayor variabilidad de la composición de la

comunidad de bacterias de vida libre, que se podía explicar por una mayor influencia de los parámetros ambientales que en la comunidad de bacterias adheridas a partículas, debido a que las partículas a las que se unen las bacterias pueden actuar como micro islas (Lyons *et al.*, 2010; Yung *et al.*, 2016), mientras que las bacterias de vida libre están directamente expuestas al agua circundante.

Mediante la técnica DGGE no se observó la dominancia de ninguno de los grupos filogenéticos específicos más abundantes en invierno o verano. Esta ausencia de preferencia de los grupos filogenéticos más abundantes por invierno o verano también fue observado por Ward *et al.* (2017) en un estudio de tres años de duración llevado a cabo en la costa de Beaufort y que analizó los patrones temporales que mostraban las OTUs, dividiendo a la comunidad en cuatro grupos: ubicuos (que estaban presentes a lo largo del ciclo estacional), episódicos (asociados a eventos puntuales como tormentas), asociados a verano y asociados a invierno, y en el que observaron que a excepción de ciertos casos puntuales, las OTUs asociadas a una situación concreta intercalaban a lo largo del árbol filogenético del gen ARNr 16S. Además observaron que OTUs pertenecientes a la misma familia mostraban dominancias en situaciones distintas, lo que sugería una partición estacional de recursos dentro de las familias bacterianas (Hunt *et al.*, 2008; Yung *et al.*, 2015).

La homogeneidad del grado de diversidad (índice de Shannon) de las tres comunidades a lo largo del ciclo anual sugiere que, a pesar de que las OTUs que componen las comunidades de verano y de invierno son distintas, la diversidad de cada comunidad es igual a lo largo del ciclo estacional, lo que podría reflejar una redundancia funcional. Si la redundancia funcional entre los taxones microbianos o la flexibilidad fisiológica debido a la diversidad funcional dentro de los taxones microbianos es alta, la diversidad microbiana será más estática frente a la fluctuación ambiental (Zeglin, 2015). Sin embargo, la redundancia funcional es difícil de establecer porque requiere un conocimiento detallado sobre las poblaciones microbianas que realizan un proceso específico (Allison y Martiny, 2008) y este punto no ha sido analizado en el presente estudio.

Si bien no se observaron diferencias en el valor medio del índice de diversidad de Shannon entre invierno y verano, el índice de diversidad de Shannon de la comunidad de bacterias de vida libre fue más bajo en abril que en el resto de meses de invierno, al igual que en septiembre también fue más bajo que en el resto de meses de verano. Nuestros resultados sugieren que la baja diversidad que se detecta en abril se debe a que en ese momento hay algunas especies especialistas de invierno que desaparecen y otras especialistas de verano que comienzan a aparecer, mientras que en el mes de septiembre se daría el caso contrario, con desaparición de especies especialistas de verano y aparición de especies especialistas de invierno. Esto provocaría que las densidades de ambos tipos de OTUs fueran bajas, y que por tanto no pudieran ser detectadas con la técnica DGGE, que detecta solo las especies más abundantes en el sistema. Esta explicación a la menor diversidad de la comunidad de bacterias de vida libre durante abril y septiembre se ve reforzada por la detección, en estos meses, de los valores

medios más bajos de eficiencia de crecimiento bacteriana de todo el estudio ($16,3 \pm 1,6$ % en abril y $14,8 \pm 2,9$ % en septiembre-octubre, frente a un valor medio del resto de los meses de invierno y verano de $28,9 \pm 2,5$ % y $33,3 \pm 5,1$ % respectivamente), lo que refleja una peor adaptación al medio de los componentes de esta comunidad en estos momentos concretos del ciclo anual. Si entendemos la eficiencia de crecimiento bacteriana como una propiedad integradora de la comunidad que tiene en cuenta la producción y la respiración a la vez (Baña *et al.*, 2020), un valor muy bajo de eficiencia de crecimiento bacteriana indica cambios ambientales severos fuera del rango de adaptación de los componentes de la comunidad bacteriana, tras los cuales ésta cambia debido a procesos de adaptación y sucesión ecológica.

Estos valores bajos del índice de diversidad de Shannon coinciden temporalmente con los afloramientos fitoplanctónicos que se dan en la estación de muestreo. A finales de invierno se producen afloramientos fitoplanctónicos de diatomeas, mientras que a finales de verano se detecta un afloramiento fitoplanctónico mayoritariamente de *Synechococcus*. Los cambios en el sistema producidos por la liberación de diferente materia orgánica durante los afloramientos fitoplanctónicos producen alteraciones en las OTUs presentes, ya que las que eran dominantes por estar adaptadas a las condiciones ambientales previas al afloramiento disminuyen su importancia relativa al no estar bien adaptadas a las nuevas condiciones y las que se adaptan mejor a las nuevas condiciones ambientales aumentan su abundancia relativa. Por lo tanto, los bajos valores del índice de Shannon y de la eficiencia de crecimiento bacteriana en abril y septiembre indican que, como consecuencia de los afloramientos fitoplanctónicos, las OTUs presentes están peor adaptadas a los cambios que se producen en las condiciones ambientales. Esto concuerda con Baña *et al.* (2020) quienes en la misma estación de muestreo postularon que un pulso de materia orgánica disuelta fresca originada por un afloramiento de diatomeas podría causar un cambio en la composición de la comunidad (cuantificado mediante CARD-FISH) en el mes de abril y un afloramiento de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* el cambio en la composición de la comunidad (cuantificado mediante CARD-FISH) en septiembre. Diversos autores (Comte y del Giorgio, 2010; Comte y del Giorgio, 2011) han indicado cambios en la composición taxonómica de la comunidad bacteriana cuando los factores ambientales cambian más allá de la adaptabilidad de los diferentes miembros de la comunidad bacteriana, lo que resulta en un acoplamiento más estrecho entre la composición y la función de la comunidad. Schauer *et al.* (2003) también observaron que durante el ciclo estacional, los principales factores que afectan a la composición bacteriana son el cambio en la materia orgánica disuelta proporcionada por diferentes poblaciones de algas. Otros trabajos también han observado cambios en la composición de comunidades bacterianas durante los afloramientos fitoplanctónicos (Fandino *et al.*, 2001; Yager *et al.*, 2001; Needham y Fuhrman, 2016).

Con el objetivo de conocer las posibles interconexiones de la composición taxonómica bacteriana con las fluctuaciones ambientales, se utilizaron los patrones de la densidad relativa bacteriana de las comunidades bacterianas adheridas a partículas, de vida libre y mixta para

analizar la correlación entre las unidades taxonómicas operativas y entre las OTUs y diferentes variables abióticas, bióticas (I) y bióticas (II) mediante el Análisis de Similitud Local (LSA) (Ruan *et al.*, 2006a). Para poder comparar los datos obtenidos en las distintas comunidades, se calculó el porcentaje de correlaciones significativas respecto de las posibles para cada comunidad y cada conjunto de variables estudiadas.

Las comunidades de bacterias adheridas a partículas y de vida libre mostraron un porcentaje similar de correlaciones significativas con las variables abióticas, bióticas (I) y bióticas (II), mientras que la comunidad mixta mostró un menor porcentaje de correlaciones significativas con las variables abióticas e interacciones entre OTUs que las dos comunidades anteriormente mencionadas.

Respecto a las variables abióticas, la comunidad de bacterias adheridas a partículas mostró un porcentaje de correlaciones significativas retrasadas mayor que el de la comunidad mixta, y ésta a su vez mayor que el de la comunidad de bacterias de vida libre. Esta gradación en las correlaciones retrasadas con las variables abióticas y el hecho de que fueran tanto positivas como negativas sugieren un cierto “efecto aislante” de las partículas frente a los cambios ambientales del sistema, ya que las partículas marinas constituyen microhábitats únicos que son físicamente más estables donde está menos condicionado el crecimiento bacteriano por los recursos que en la fase líquida de la columna de agua (Grossart *et al.*, 2003).

Por otro lado, la comunidad de bacterias de vida libre mostró un porcentaje de correlaciones significativas respecto a las interacciones entre OTUs mayor que los de las comunidades de bacterias adheridas a partículas y mixta, lo que indica un mayor grado de dependencia entre OTUs en la comunidad de bacterias de vida libre, que en las otras dos comunidades. Es posible que las bacterias de vida libre tengan una mayor dependencia entre ellas para conseguir ciertos metabolitos para sobrevivir, mientras que las bacterias adheridas a partículas pueden tener una mayor capacidad para producir los nutrientes necesarios (Cui *et al.*, 2019). De hecho, los estudios metagenómicos han revelado que las bacterias adheridas a partículas tienen un tamaño medio de genoma más grande que las de vida libre (Allen *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013), con información para la degradación de polisacáridos y síntesis de vitaminas (Smith *et al.*, 2013; Satinsky *et al.*, 2014; Simon *et al.*, 2014) así como genes relacionados con la competencia (Ganesh *et al.*, 2014). Un mayor número de genes podría representar una ventaja en un entorno rico en nutrientes (Giovannoni *et al.*, 2014), ya que les permitiría adaptarse rápidamente a los nutrientes disponibles sin la necesidad de establecer interacciones con otras bacterias. Además, las bacterias de vida libre a menudo tienen un genoma reducido (Swan *et al.*, 2013), y carecen de vías metabólicas para la síntesis de nutrientes esenciales como las vitaminas (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2014) por lo que presentan una mayor dependencia de otros organismos para sobrevivir.

En las tres comunidades el porcentaje de correlaciones significativas positivas entre OTUs fue mayor que el de las correlaciones negativas, lo que se asocia a una mayor relación de

mutualismo, aparición simultánea o redundancia funcional, y a una relación menor de competencia por recursos (Fuhrman y Steele, 2008; Steele *et al.*, 2011).

Cabe destacar que la comunidad mixta mostró valores de porcentajes de correlaciones significativas respecto con las variables abióticas e interacciones entre OTUs menores, que los de las otras dos comunidades, lo que se podría explicar por la capacidad de cambio que tienen en su estilo de vida (Riemann y Winding, 2001; Kjørboe *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015). Cuando las condiciones ambientales cambian, las bacterias de esta comunidad pueden pasar de la partícula a la fase líquida y viceversa para adaptarse mejor a las nuevas condiciones, por lo que las bacterias de esta comunidad podrían estar menos influenciadas por las variables ambientales y mostrar además una menor interacción con otras bacterias.

Las redes de asociación construidas a partir de las correlaciones significativas obtenidas en las comunidades bacterianas adheridas a partículas y de vida libre muestran que los factores que influyen y regulan la composición taxonómica de estas dos comunidades son muy diferentes. Mientras que la composición taxonómica de la comunidad de bacterias adheridas a partículas está fuertemente influenciada por la concentración de la clorofila *a* (indicador del nivel de fitoplancton eucariótico), y en menor medida por la densidad de nanoflagelados heterotrofos (indicador del nivel de depredación) y/o la densidad de partículas víricas (indicador del nivel de lisis vírica), la comunidad de bacterias de vida libre está más influenciada por la temperatura del sistema y la concentración de materia orgánica disuelta fluorescente de tipo proteico.

En las redes de asociación entre OTUs, cada uno de los nodos y los componentes más próximos que correlacionan positivamente con él, constituyen un grupo de bacterias que tienden a aparecer simultáneamente a lo largo del tiempo (Fuhrman y Steele, 2008). Algunas de estas apariciones simultáneas pueden representar gremios de organismos que realizan funciones ecológicas similares (redundancia funcional) (Eiler *et al.*, 2012; Needham *et al.*, 2013), cooperación como la alimentación cruzada y/o el intercambio de metabolitos (Kazamia *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2012) o pueden ocurrir simultáneamente debido a una similar regulación ambiental (Long y Azam, 2001; Chafee *et al.*, 2018). Por lo tanto, la comparación entre los gráficos de LSA permite establecer relaciones entre OTUs, y de éstas con diversas variables ambientales, y proponer hipótesis sobre la ecología de los distintos miembros de la comunidad bacteriana.

Así, en la comunidad de bacterias adheridas a partículas, podemos destacar las OTUs EHU5 y EHU43, ambas pertenecientes a la familia *Cryomorphaceae* (*Bacteroidetes*), familia que es conocida por su relación con los afloramientos fitoplanctónicos eucarióticos y su participación en la degradación de biopolímeros (Gómez-Pereira *et al.*, 2012; Lucas *et al.*, 2015; Teeling *et al.*, 2016). En Armintza las dos OTUs son especialistas de invierno por lo que concurren en el sistema únicamente durante el invierno, aunque no se ha detectado una asociación directa entre ellas. Estas dos OTUs presentan una asociación positiva con la concentración de clorofila *a* (**Figura 12A**), que es más fuerte en el caso de EHU5 y que se encuentra desplazada un mes

en el caso de EHU43. Todo esto indica que ambas OTUs tienen necesidades similares, probablemente una dependencia de la materia orgánica generada durante el afloramiento de diatomeas, pero que su éxito en el sistema depende de otros factores que les afectan negativamente, como puede ser la presión depredadora de los nanoflagelados heterótrofos en el caso de EHU5 y la lisis vírica en el caso de EHU43 (**Figura 12A**).

Otro ejemplo de relación ecológica entre miembros de la comunidad de bacterias adheridas a partículas es el de las OTUs EHU45 y EHU47, filogenéticamente diferenciadas ya que EHU47 es una *Proteobacteria* de la familia *Rhodobacteraceae*, y EHU45 es un *Bacteroidetes* de la familia *Flavobacteriaceae*. Ambas son especialistas de verano, y presentan notables similitudes respecto a los factores ambientales asociados a su aparición. Así, ambas posiblemente compiten con éxito a altas temperaturas del agua, minutos de luz y concentración de materia orgánica fluorescente disuelta de tipo proteico (**Figura 11A**), pero no parecen ser capaces de obtener ventaja de la liberación de la materia orgánica procedente de diatomeas generada durante su afloramiento, sino que se asocian a las densidades altas de *Synechococcus* durante el afloramiento de esta cianobacteria. En cualquier caso, estas dos OTUs también se suceden en el sistema, ya que EHU47 aparece un mes después que EHU45 (**Figura 14A**).

La OTU EHU45, especialista de verano, también muestra una correlación positiva con la respiración y la demanda de carbono bacteriana (**Figura 13A**). Esto podría indicar que esta OTU es metabólicamente más activa al consumir una mayor cantidad de carbono posiblemente derivado de la materia orgánica fluorescente disuelta de tipo proteico y aumentar la respiración. Por el contrario, la OTU EHU40 (**Figura 13A**), especialista de invierno muestra una correlación negativa con la respiración y la demanda de carbono bacteriana así como con la concentración de carbono orgánico disuelto y materia orgánica fluorescente disuelta de tipo proteico. Esto nos podría estar indicando que esta OTU sería metabólicamente menos activa al disponer de una menor cantidad de carbono y por tanto destinaría una menor cantidad a la respiración bacteriana.

La regulación de la composición taxonómica de la comunidad de bacterias de vida libre está fuertemente influenciada por la temperatura del sistema y/o la concentración de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta (**Figura 11B**). Son numerosos los trabajos (Pinhassi y Hagström, 2000; Fuhrman *et al.*, 2006; Huete-Stauffer *et al.*, 2015) donde se ha indicado el importante papel regulador de la temperatura en la composición taxonómica de las bacterias de vida libre. Respecto a la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta, diversos autores han sugerido la utilización de ésta como indicadora de materia orgánica disuelta fresca y lábil (Yamashita y Tanoue, 2003; Nieto-Cid *et al.*, 2006; Lønborg *et al.*, 2009). En este sentido, en la comunidad de bacterias de vida libre se detectaron correlaciones positivas entre la concentración de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta y las OTUs EHU63 y EHU61, que fueron identificadas como *Proteobacteria* de la familia *Rhodobacteraceae* y especialistas de verano. Ambas OTUs parecen ser competidoras en el uso de este tipo de materia orgánica, y aparecen

sincrónicamente aun cuando existen otros factores que condicionan de modo diferente su presencia en el sistema, como son la capacidad de utilizar la materia orgánica derivada de *Synechococcus* en el caso de EHU63, o la depredación por nanoflagelados heterotrófos en el caso de EHU61 (**Figura 12B**). Tada *et al.* (2017) observaron, en ensayos llevados a cabo con materia orgánica disuelta derivada de distintos tipos de fitoplancton, una disminución de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta derivada de los dinoflagelados tras el crecimiento de *Rhodobacteraceae*, lo que indicaba que este linaje contribuía en la degradación de la materia orgánica derivada de dinoflagelados. Este aumento de *Rhodobacteraceae* con la adición de exudados de dinoflagelados también fue observado por Romera-Castillo *et al.* (2011).

Las tres OTUs de la comunidad de bacterias de vida libre, EHU61, EHU68 y EHU67 identificadas como *Alfaproteobacteria* especialistas de verano, correlacionan positivamente con la producción bacteriana (**Figura 13B**), lo que nos indicaría que son metabólicamente activas al derivar parte del carbono consumido a la producción de biomasa. En verano, la densidad de *Synechococcus* y la concentración de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta son mayores por lo que la excreción de la materia orgánica altamente lábil por parte de esta cianobacteria (Biddanda y Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005) puede tornar en un aumento en la producción de las OTUs mencionadas ya que las *Alfaproteobacterias* se asocian a la adquisición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Teeling *et al.*, 2012).

Finalmente, en la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 14B**) se observaron dos clústeres, el primero compuesto por OTUs especialistas de verano, que mostraron asociaciones únicamente positivas entre sí, y un segundo clúster compuesto por especialistas de invierno y generalistas con asociaciones tanto positivas como negativas. Ambos clústeres están conectados por tres OTUs generalistas, EHU56, EHU15 y DES13. El alto número de asociaciones positivas entre OTUs en el clúster de verano puede ser indicativo de interdependencias entre las mismas o de redundancia funcional en el sistema. Por el contrario, la correlación positiva entre las OTUs EHU57, *Bacteroidetes* de la familia *Flavobacteraceae*, y EHU58, *Proteobacteria* del género *Pelagibacter*, puede ser ejemplo de una aparición sincrónica debido al ambiente compartido: SAR11 (*Pelagibacter*) es conocida por una preferencia por compuestos de bajo peso molecular como glucosa (Alonso y Pernthaler, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2012), aminoácidos disueltos libres o dimetilsulfoniopropionato (Malmstrom *et al.*, 2004), pero los *Flavobacteriales* han sido relacionados con la degradación de los biopolímeros complejos en los ambientes marinos (Fandino *et al.*, 2001; Teira *et al.*, 2008), por lo que a pesar de aparecer y ser abundantes en la misma situación del año (invierno), probablemente no tengan la misma función ecológica.



CAPÍTULO 2:

Variabilidad de la composición de la comunidad bacteriana marina a corto plazo.

1 Justificación y objetivos

En 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 la convierte en un objeto de estudio de gran interés (Hoppe *et al.*, 2002). El Golfo de Vizcaya es un sistema costero templado típico, definido por un máximo anual de biomasa fitoplanctónica y producción a finales de invierno/primavera y valores mínimos en verano. Además, muestra un marcado ciclo estacional, como resultado principalmente de la estratificación y mezcla del agua superficial a lo largo del año (Serret *et al.*, 1999).

Los estudios estacionales basados en muestreos mensuales han establecido que la sucesión estacional en la composición del bacterioplancton ocurre típicamente en las aguas superficiales marinas (Alonso-Sáez *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2012; Ladau *et al.*, 2013). Sin embargo, la escala de tiempo parece ser determinante a la hora de conocer en detalle las asociaciones de organismos, por lo que un muestreo más frecuente podría revelar dinámicas ecológicas de la comunidad que se pierden en el muestreo mensual, lo que ayudaría a contextualizar las investigaciones basadas en muestreos mensuales (Needham *et al.*, 2013). Estos cambios pueden estar inducidos por fuerzas *top-down* (Needham *et al.*, 2013) o responder significativamente a los afloramientos en una rápida sucesión de diferentes taxones bacterianos (Teeling *et al.*, 2012). Los factores ambientales pueden modificar la dinámica de la comunidad bacteriana y potencialmente causar afloramientos de corta duración de especies bacterianas raras y particulares (Revilla *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, 2006) que mediante un muestreo mensual se pueden no detectar. En cualquier momento o espacio en particular, solo unas pocas OTUs abundantes dominan típicamente la comunidad bacteriana, y son acompañadas por una mayoría de OTUs raras (Rappé *et al.*, 2000; Sogin *et al.*, 2006) que al cambiar las condiciones ambientales pueden convertirse en dominantes.

En el capítulo anterior se establecieron en la estación de muestreo de Arminza dos situaciones estacionales estables, invierno y verano, y una situación corta más inestable que transcurre entre ambas y que denominamos situación de transición. Con el fin de: i) determinar si los cambios en la composición de la comunidad bacteriana ocurren de modo distinto entre las tres comunidades detectadas; ii) conocer si la intensidad de esos cambios varía entre las distintas situaciones ambientales; y iii) determinar cómo influyen las variables ambientales en la intensidad de dichos cambios, se analizaron las comunidades bacterianas y las variables físico-químico-biológicas de forma detallada mediante un muestreo de alta frecuencia. Para ello, se realizaron muestreos aproximadamente cada 3 días en cada una de las situaciones por las que transcurre este sistema costero: 4 muestreos en febrero-marzo de 2011 (situación de invierno) y 5 muestreos en abril y junio de 2011 (situaciones de transición y de verano, respectivamente). En estos muestreos se determinaron los valores de las variables físico-químico-biológicas que caracterizan el sistema y la composición de la comunidad bacteriana, y se analizó la variabilidad

de las medidas obtenidas tanto dentro de cada situación (intrasituaciones) como entre situaciones.

2 Resultados

2.1 Caracterización fisicoquímica de la estación costera de Armintza mediante muestreo intensivo

La temperatura de superficie del agua (**Figura 15A; Tabla suplementaria 16**) mostró un valor medio más bajo en invierno ($12,5 \pm 0,3$ °C) que en transición ($13,9 \pm 0,2$ °C) y que en verano ($18,8 \pm 0,2$ °C) ($p < 0,05$) y a su vez transición mostró un valor medio menor que verano ($p < 0,05$). El coeficiente de variación de la temperatura de la superficie del agua en el estudio global (18,6 %) fue mayor que el coeficiente de variación de invierno (4,6 %), transición (3,0 %) y verano (1,8 %).

Las concentraciones medias de nitrato, fosfato y silicato (**Figura 15B, C y D** respectivamente y **Tabla suplementaria 16**) fueron significativamente superiores en invierno ($6,6 \pm 0,5$ μM ; $0,4 \pm 0,1$ μM y $3,6 \pm 0,8$ μM respectivamente) que en verano ($1,8 \pm 0,3$ μM ; $0,2 \pm 0,0$ μM y $1,5 \pm 0,2$ μM respectivamente) y transición ($2,4 \pm 0,6$ μM ; $0,3 \pm 0,1$ μM y $1,6 \pm 0,2$ μM respectivamente) ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de nutrientes inorgánicos entre verano y transición ($p > 0,05$). El coeficiente de variación global del nitrato (66,9 %) fue mayor que el detectado en invierno (15,8 %), transición (52,6 %) y verano (39,1 %). A su vez, el coeficiente de variación global del silicato (58,1 %) fue mayor que el detectado en invierno (42,7 %), transición (28,9 %) y verano (19,7 %). El coeficiente de variación global del fosfato (44,5 %) fue un valor intermedio respecto a los de las diferentes situaciones (22,8 % en invierno, 48,5 % en transición y 33,9 % en verano).

La concentración de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta (**Figura 15E; Tabla suplementaria 16**) mostró el valor medio más alto en verano ($3,7 \pm 0,5$ QSU), que fue significativamente mayor que en invierno ($2,5 \pm 0,3$ QSU) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación global de esta fracción (34,4 %) fue un valor intermedio respecto a los de las diferentes situaciones (25,0 % en invierno, 37,8 % en transición y 28,2 % en verano).

La concentración de la fracción húmica de la materia orgánica fluorescente disuelta (**Figura 15F; Tabla suplementaria 16**) mostró el valor medio más bajo en transición ($2,6 \pm 0,1$ QSU), que fue significativamente menor que en invierno ($3,1 \pm 0,1$ QSU) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación de esta fracción de todo el estudio (11,6 %) fue un valor intermedio respecto a los detectados en las diferentes situaciones (3,0 % en invierno, 9,8 % en transición y 11,7 % en verano).

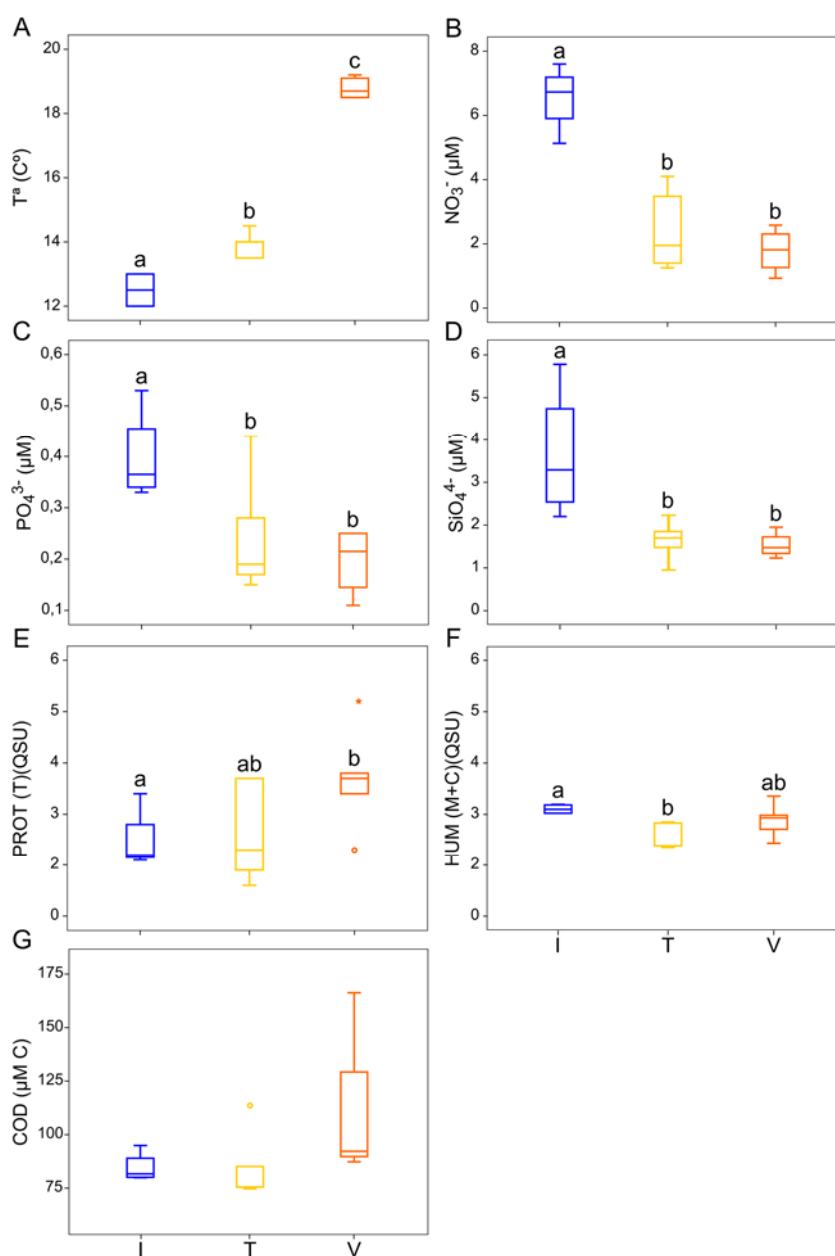


Figura 15. Diagrama de cajas de los valores detectados en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja) de las siguientes variables: A: temperatura de superficie del agua (T^a); B: concentración de nitrato (NO_3^-); C: fosfato (PO_4^{3-}); D: silicato (SiO_4^{4-}); E: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (PROT); F: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (HUM) y G: carbono orgánico disuelto (COD). Los bordes inferiores y superiores de los cuadros representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente. Los bordes de la barra de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. Los puntos fuera de los recuadros representan valores atípicos. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores medios ($p < 0,05$).

La concentración media del carbono orgánico disuelto (COD) (**Figura 15G**; **Tabla suplementaria 16**) no mostró diferencias significativas entre las tres situaciones estudiadas ($p > 0,05$). El coeficiente de variación del COD de todo el estudio (27,8 %) fue un valor intermedio respecto a los de las diferentes situaciones (8,3 % en invierno, 19,6 % en transición y 38,4 % en verano).

2.2 Caracterización biológica de la estación costera de Armintza mediante muestreo intensivo

2.2.1 Organismos fototróficos

La concentración media de clorofila *a* (**Figura 16A; Tabla suplementaria 17**), que se utiliza como indicador de abundancia fitoplanctónica eucariótica, mostró valores medios más altos en invierno y en transición ($0,7 \pm 0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ y $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente), siendo significativamente diferente entre verano ($0,3 \pm 0,1 \mu\text{g l}^{-1}$) y transición ($p < 0,05$). El coeficiente de variación de la concentración de clorofila *a* global (77,2 %) fue un valor intermedio al de las diferentes situaciones (94,3 % en invierno, 40,8 % en transición y 46,8 % en verano) y mostró un valor muy elevado en invierno.

La densidad media de la cianobacteria *Synechococcus* (**Figura 16B; Tabla suplementaria 17**) fue significativamente superior en verano ($8,6 \pm 2,0 \times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$) que en invierno ($1,5 \pm 0,8 \times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$) y en transición ($0,1 \pm 0,0 \times 10^6 \text{ cél l}^{-1}$) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación de la densidad de *Synechococcus* global (132,7 %) fue mayor al de invierno (103,4 %), transición (35,4 %) y verano (51,5 %).

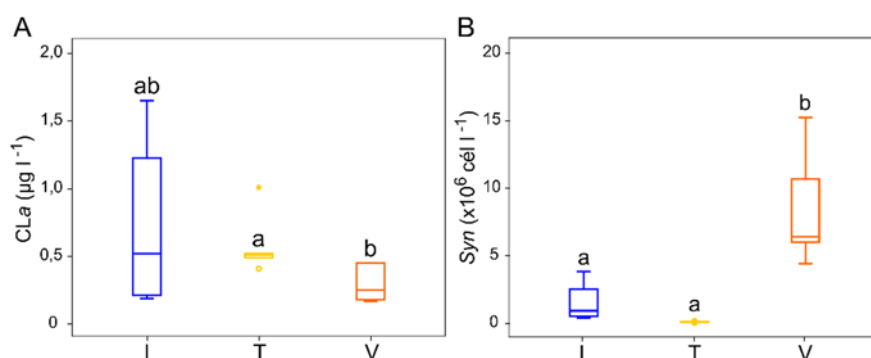


Figura 16. Diagrama de cajas de los valores detectados en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja) de las variables estudiadas: A: concentración de la clorofila *a* (CLa) y B: densidad de *Synechococcus* (Syn). Los bordes inferiores y superiores de los cuadros representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente. Los bordes de la barra de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. Los puntos fuera de los recuadros representan valores atípicos. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores medios ($p < 0,05$).

2.2.2 Partículas víricas

La densidad media de partículas víricas (**Figura 17; Tabla suplementaria 17**) mostró un valor significativamente menor en invierno ($3,5 \pm 1,4 \times 10^9 \text{ pv l}^{-1}$) que en transición ($7,8 \pm 0,9 \times 10^9 \text{ pv l}^{-1}$) y en verano ($8,1 \pm 0,6 \times 10^9 \text{ pv l}^{-1}$) ($p < 0,05$), no observándose diferencias entre verano y transición ($p > 0,05$). El coeficiente de variación de la densidad de partículas víricas global (43,0 %) fue un valor intermedio al de las diferentes situaciones (82,8 % en invierno, 26,0 % en transición y 17,4 % en verano).

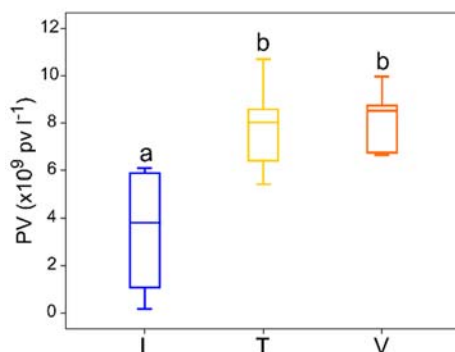


Figura 17. Diagrama de cajas de los valores detectados en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja). Los bordes inferiores y superiores de los cuadros representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente. Los bordes de la barra de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores medios ($p < 0,05$).

2.2.3 Nanoflagelados heterótrofos

La densidad media de nanoflagelados heterótrofos (**Figura 18; Tabla suplementaria 17**) no mostró diferencias significativas entre las tres situaciones estudiadas ($p > 0,05$). El coeficiente de variación de la densidad de nanoflagelados heterótrofos global (48,5 %) fue un valor intermedio al de las diferentes situaciones (86,3 % en invierno, 34,4 % en transición y 34,3 % en verano).

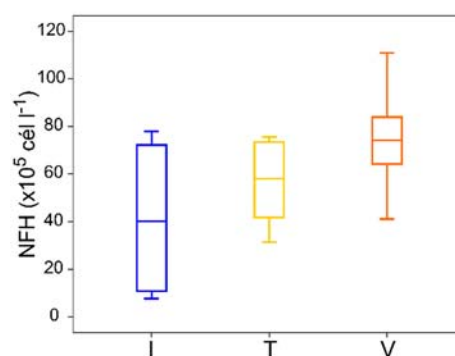


Figura 18. Diagrama de cajas de los valores detectados en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja) de la densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH). Los bordes inferiores y superiores de los cuadros representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente. Los bordes de la barra de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana.

2.2.4 Bacterias

2.2.4.1 Densidad bacteriana

La densidad media bacteriana total (**Figura 19A; Tabla suplementaria 17**) fue menor en invierno ($4,5 \pm 1,1 \times 10^8 \text{ cél l}^{-1}$) que en transición ($9,5 \pm 1,0 \times 10^8 \text{ cél l}^{-1}$) y en verano ($8,2 \pm 0,6$

$\times 10^8$ cél l⁻¹) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación global (36,1 %) fue superior al de transición (22,5 %) y verano (17,0 %) e inferior al de invierno (49,0 %).

La densidad media de bacterias adheridas a partículas (**Figura 19A; Tabla suplementaria 17**) fue mayor en transición ($4,4 \pm 0,7 \times 10^8$ cél l⁻¹) que en invierno ($1,9 \pm 0,7 \times 10^8$ cél l⁻¹) y verano ($1,3 \pm 0,1 \times 10^8$ cél l⁻¹) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación global (70,3 %) fue superior al de transición (36,2 %) y verano (17,5 %) e inferior al de invierno (73,6 %).

La densidad media bacteriana de vida libre (**Figura 19A; Tabla suplementaria 17**) fue menor en invierno ($2,7 \pm 0,6 \times 10^8$ cél l⁻¹) que en transición ($5,1 \pm 0,4 \times 10^8$ cél l⁻¹) y en verano ($6,9 \pm 0,6 \times 10^8$ cél l⁻¹) ($p < 0,05$). El coeficiente de variación global (41,2 %) fue superior al de transición (19,5 %) y verano (20,3 %) e inferior al de invierno (48,0 %).

Además, el porcentaje medio de bacterias adheridas a partículas respecto al total de bacterias (**Figura 19B**) fue menor en verano ($16,5 \pm 1,6$ %) que en invierno ($38,8 \pm 7,0$ %) y en transición ($45,7 \pm 4,9$ %) ($p < 0,05$).

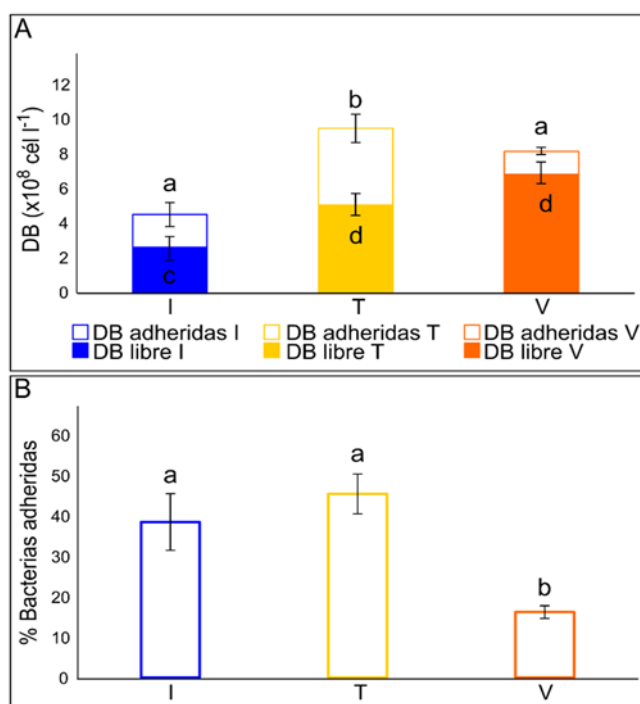


Figura 19. Representación gráfica de la densidad bacteriana (DB) en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja) siendo A: densidad de bacterias adheridas a partículas (DB adheridas) y densidad de bacterias de vida libre (DB libre) y B: porcentaje de las bacterias adheridas. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores medios ($p < 0,05$), donde a y b hacen referencia a las bacterias adheridas a partículas y c y d hacen referencia a las bacterias de vida libre.

2.2.4.2 Composición de la comunidad bacteriana

Para conocer la composición de la comunidad bacteriana se utilizaron las técnicas moleculares CARD-FISH y ARISA. CARD-FISH permitió la cuantificación de la abundancia de los principales

grupos filogenéticos que componen la comunidad bacteriana, y ARISA, al tener una elevada sensibilidad y capacidad para detectar un número alto de OTUs más abundantes, permitió analizar de manera detallada la diversidad de las bacterias más abundantes y su variabilidad entre situaciones y dentro de cada situación ambiental.

Al analizar la composición de la comunidad mediante la técnica CARD-FISH, se observaron diferencias notables en la abundancia relativa de determinados grupos filogenéticos entre las tres situaciones ambientales (**Figura 20** y **Tabla 5**). El análisis conjunto de las tres situaciones confirmó el patrón de alternancia entre los grupos *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* comentado en el capítulo anterior. Así, *Alfaproteobacteria* dominó la comunidad en invierno ($37 \pm 3\%$) frente a *Bacteroidetes* ($18 \pm 1\%$) ($p < 0,05$), mientras que este último filo se convirtió en dominante durante verano ($33 \pm 1\%$) frente a *Alfaproteobacteria* ($25 \pm 1,3\%$) ($p < 0,05$). El momento de alternancia entre estos dos grupos filogenéticos se detectó durante la situación de transición, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el porcentaje medio de *Alfaproteobacteria* ($31 \pm 1,7\%$) y de *Bacteroidetes* ($34 \pm 1,0\%$). El porcentaje medio de *Gammaproteobacteria* (tercer grupo filogenético más abundante) se mantuvo constante (19-26 %) a lo largo de todo este estudio. Por último, *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria* no superaron el 15 % del total de *Eubacteria* detectadas en ninguna de las muestras analizadas. En ninguno de estos tres últimos grupos filogenéticos se detectaron diferencias claras entre las situaciones ambientales ($p > 0,05$).

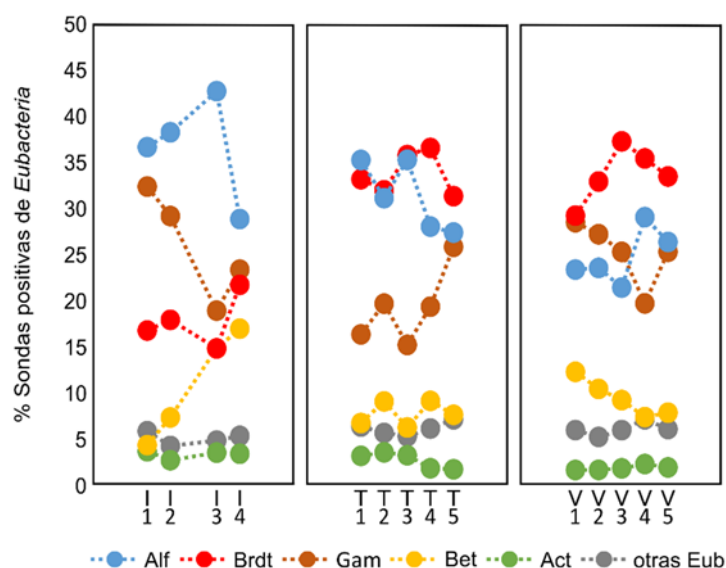


Figura 20. Evolución temporal de la abundancia relativa (porcentaje respecto al total de *Eubacteria* detectadas) de cada uno de los grupos filogenéticos: *Alfaproteobacteria* (Alf), *Bacteroidetes* (Brdt), *Gammaproteobacteria* (Gam), *Betaproteobacteria* (Bet), *Actinobacteria* (Act) y otras *Eubacteria* (otras Eub) analizada mediante CARD-FISH.

Al analizar la variabilidad de los grupos filogenéticos dentro de cada situación (**Tabla 5**), se observó una mayor variabilidad dentro de la situación de invierno en los grupos *Alfaproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Betaproteobacteria*. *Gammaproteobacteria* mostró una alta variabilidad tanto en invierno como en transición, mientras que *Actinobacteria* mostró la mayor

variabilidad en transición. Además, la variabilidad de la abundancia relativa tanto de *Alfaproteobacteria* como de *Bacteroidetes* a nivel global fue superior a la variabilidad detectada dentro de cada situación.

Tabla 5. Variabilidad en la abundancia relativa de los grupos taxonómicos obtenidos mediante CARD-FISH en invierno, transición y verano, y a lo largo de todo el estudio (estudio global). Se muestran el valor medio del porcentaje de aparición, el rango del porcentaje de aparición y el coeficiente de variación (cv).

Grupo taxonómico	Parámetro	Situación			Estudio global
		Invierno	Transición	Verano	
<i>Alfa-proteobacteria</i>	Promedio (%)	37	31	25	30
	Rango (%)	29-43	27-35	21-29	21-43
	cv	15,8	12,1	12,1	20,8
<i>Bacteroidetes</i>	Promedio (%)	18	34	33	29
	Rango (%)	15-22	31-36	29-37	15-37
	cv	16,2	6,9	9,0	26,7
<i>Gamma-proteobacteria</i>	Promedio (%)	26	19	25	23
	Rango (%)	19-32	15-26	20-28	15-32
	cv	23,0	21,6	13,4	22,5
<i>Beta-proteobacteria</i>	Promedio (%)	11	8	9	9
	Rango (%)	4-17	6-9	6-9	4-17
	cv	54,8	17,3	21,4	37,8
<i>Actinobacteria</i>	Promedio (%)	3	3	2	2
	Rango (%)	3-4	2-3	1-2	1-4
	cv	12,7	33,8	15,4	35,3
Otras <i>Eubacteria</i>	Promedio (%)	5	6	6	6
	Rango (%)	4-6	5-7	5-7	4-7
	cv	13,3	11,8	11,5	12,9

En la **Tabla 6** se muestran los valores de las correlaciones rho de Spearman de las variables físico-químico-biológicas con los grupos taxonómicos estudiados mediante CARD-FISH. *Alfaproteobacteria* mostró correlaciones positivas con la concentración de los nutrientes inorgánicos y la concentración de la clorofila *a*, y negativas con la temperatura y la fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta. En cambio, *Bacteroidetes* mostró una correlación positiva con la temperatura, y correlaciones negativas con la concentración de los nutrientes inorgánicos y la fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta. Se

observó una correlación positiva entre el porcentaje de *Betaproteobacteria* y la concentración de la materia orgánica fluorescente disuelta de tipo húmico. *Actinobacteria* mostró una correlación negativa con la densidad de partículas víricas.

Tabla 6. Valores de correlación rho de Spearman estadísticamente significativas entre los grupos taxonómicos detectados mediante CARD-FISH y las variables físico-químico-biológicas: temperatura de superficie del agua (T^a), concentración de nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}), silicato (SiO_4^{4-}), fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (PROT), fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (HUM), concentración de clorofila *a* (CL *a*) y densidad de partículas víricas (PV). Significación de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Grupo taxonómico	Rho de Spearman							
	T^a (°C)	NO_3^- (μM)	PO_4^{3-} (μM)	SiO_4^{4-} (μM)	PROT (T)(QSU)	HUM (M+C)(QSU)	CL <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)	PV (10^9pv l^{-1})
<i>Alfaproteobacteria</i>	-0,81**	0,73**	0,64*	0,69**	-0,64*		0,52*	
<i>Bacteroidetes</i>	0,66*	-0,63*		-0,62*		-0,72**		
<i>Betaproteobacteria</i>						0,54*		
<i>Actinobacteria</i>								-0,68**

El análisis de ARISA permitió detectar aquellas OTUs que fueron más abundantes a lo largo del estudio. Además, la filtración diferencial permitió diferenciarlas en función del hábitat colonizado: partículas, fase líquida, o indistintamente. Se detectaron un total de 75 OTUs, la mayor parte de las cuales (81 %) se encontró en un hábitat específico (**Figura 21**): el 40 % de las OTUs fue detectado únicamente en la comunidad de bacterias adheridas a partículas (AD), y el 41 % únicamente en la comunidad de bacterias de vida libre (LI), mientras que solo el 19 % fue detectado en ambas comunidades indistintamente, es decir en la comunidad mixta. Por lo tanto, el análisis mediante ARISA detectó una distribución por hábitats de los componentes más abundantes de la comunidad bacteriana similar al que se detectó en el **Capítulo 1** mediante el uso de la técnica DGGE.

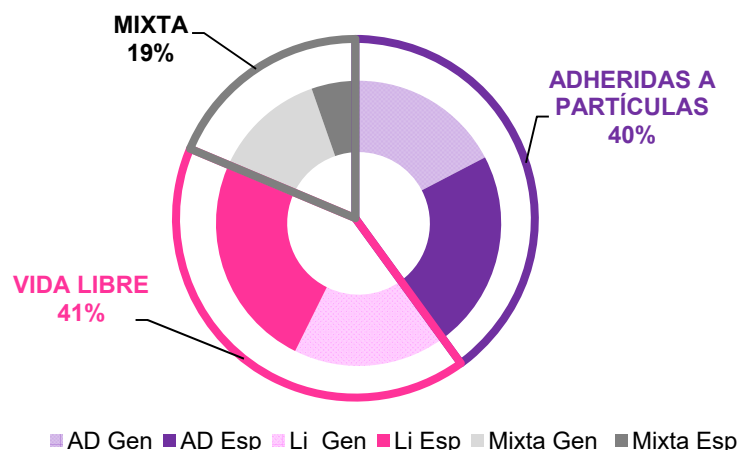


Figura 21. Porcentaje de OTUs generalistas (Gen, aparición en las tres situaciones) y especialistas (Esp, no aparición en las tres situaciones) dentro de cada comunidad: adheridas a partículas (AD) en morado, de vida libre (LI) en rosa y mixta en gris. El color claro indica OTUs generalistas y el color oscuro indica OTUs especialistas.

En cada una de las comunidades (adheridas a partículas, de vida libre, o mixta) se detectaron OTUs generalistas, que aparecieron a lo largo de las tres situaciones estudiadas (**Figura 22**). Además, se detectaron OTUs especialistas exclusivas de invierno o de verano. No se detectaron OTUs exclusivas de la situación de transición, ya que las OTUs detectadas aparecieron también en la situación de invierno o de verano

En la comunidad de bacterias adheridas a partículas se detectaron un total de 30 OTUs, de las cuales 13 fueron generalistas (43 %) y 17 fueron especialistas (57 %); en la comunidad de bacterias de vida libre se detectaron 31 OTUs, de las cuales 13 fueron generalistas (42 %) y 18 especialistas (58 %); y en la comunidad mixta se detectaron 14 OTUs, de las que 10 fueron generalistas (71 %) y 4 especialistas (29 %). Los porcentajes de OTUs generalistas o especialistas en las comunidades bacterianas de vida libre y mixta fueron similares a los observados durante el estudio plurianual (**Capítulo 1**), es decir, en la comunidad de bacterias de vida libre el porcentaje de especialistas fue mayor que el de generalistas, y por el contrario, en la comunidad mixta el porcentaje de generalistas fue mayor que el de especialistas. Sin embargo, en la comunidad de bacterias adheridas a partículas, durante el estudio plurianual se detectó el mismo porcentaje de especialistas y generalistas, mientras que el análisis intensivo mostró un porcentaje algo mayor de especialistas que de generalistas.

No se detectaron diferencias significativas en el número de OTUs detectadas en ninguna de las tres comunidades estudiadas entre las situaciones de invierno, transición y verano.

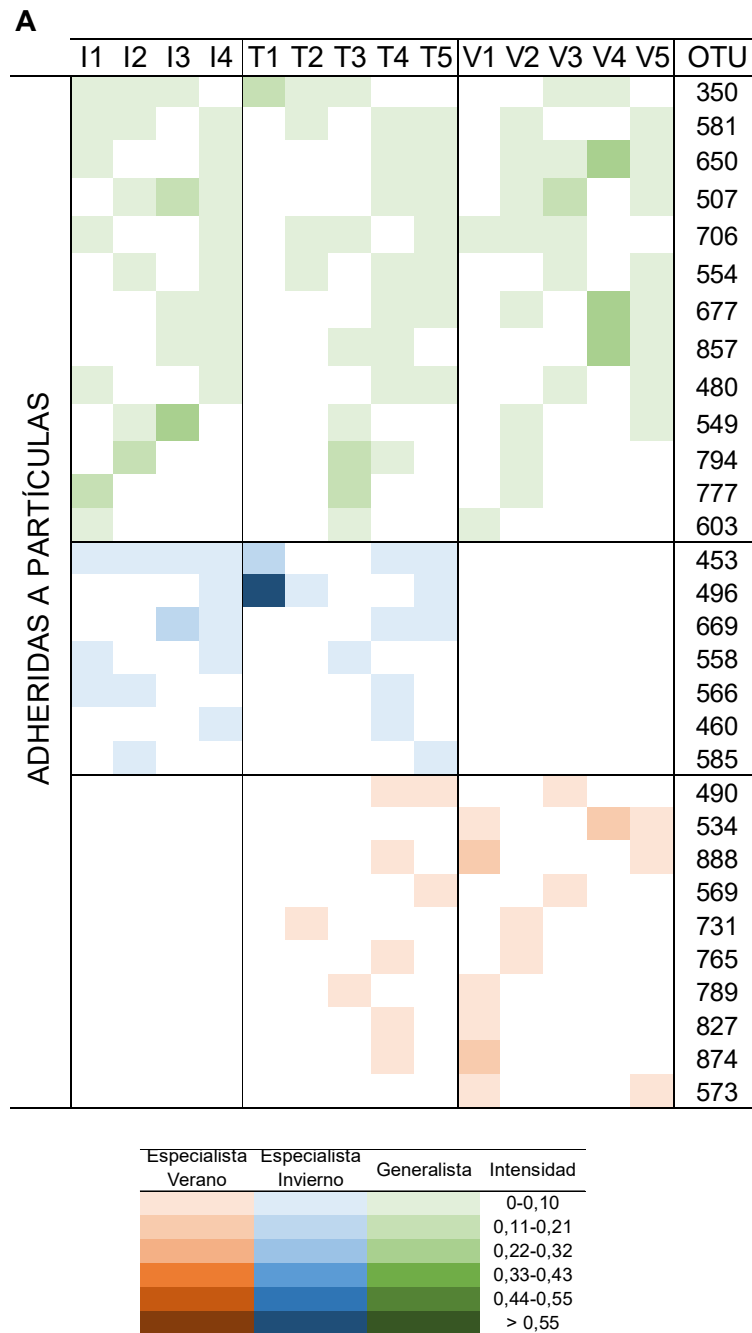


Figura 22. Representación gráfica espaciotemporal de la intensidad de las OTUs detectadas mediante la técnica molecular ARISA en las tres comunidades estudiadas, A: adheridas a partículas; B: de vida libre y C: mixta. La gama de tonalidad verde hace referencia a las OTUs generalistas, la gama azul a las OTUs especialistas de invierno y la gama naranja a las OTUs especialistas de verano.

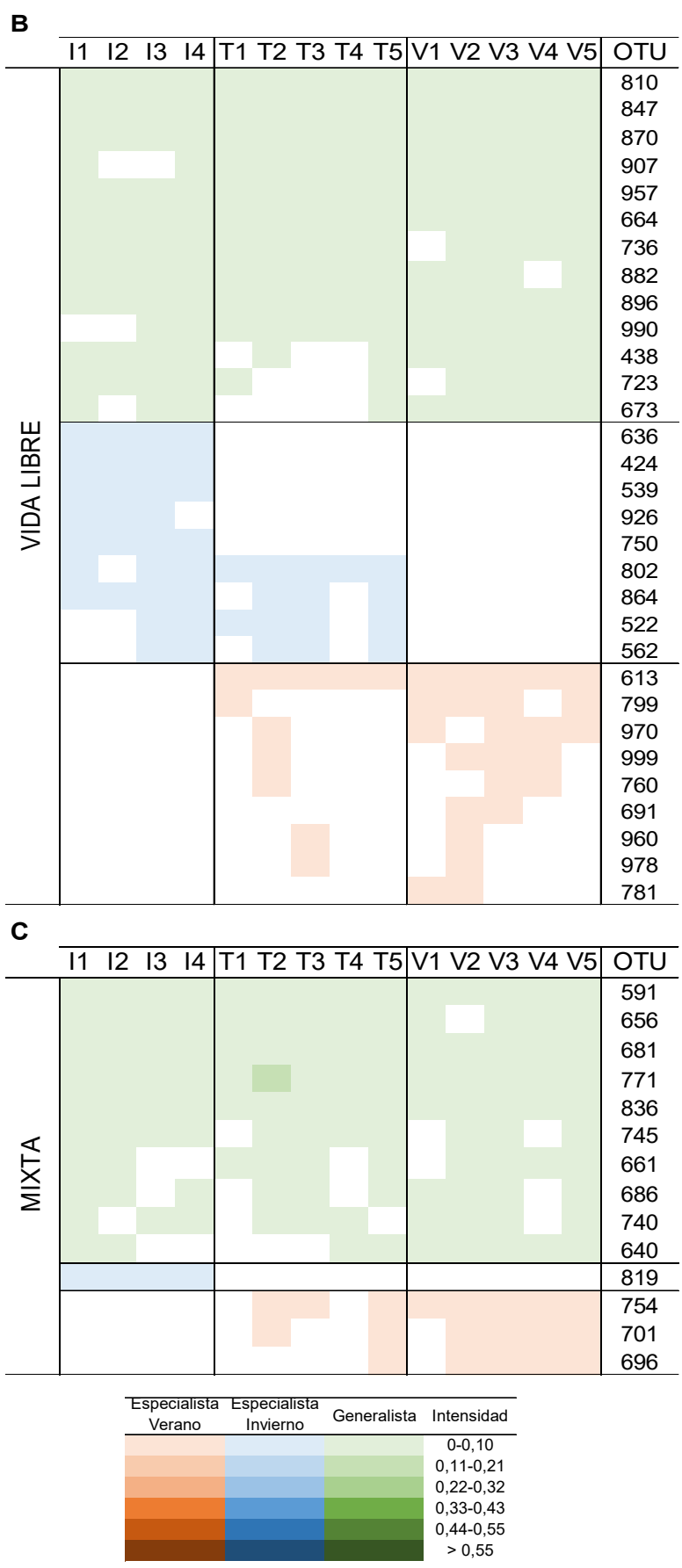


Figura 22. (continuación).

Con el fin de observar las diferencias en la composición de la comunidad dentro de cada situación ambiental y entre situaciones, se aplicó el análisis de escalamiento multidimensional no métrico o NMDS (del inglés Non-Metric Multidimensional Scaling) basado en datos de intensidad relativa de ARISA y distancia de Bray-Curtis (**Figura 23**). El NMDS de la comunidad de bacterias adheridas a partículas (**Figura 23A**), no mostró un patrón claro de agrupación (ANOSIM $R = 0,04$, $p > 0,05$) de las muestras. Por el contrario, la comunidad de bacterias de vida libre (**Figura 23B**) mostró tres grupos diferenciados, el primer grupo compuesto por las cuatro muestras de invierno, un segundo grupo compuesto por la cinco muestras de transición y un tercer grupo compuesto por las cinco muestras de verano. Además, mostraron un patrón temporal claro desde la situación de invierno a la de verano a través de la situación de transición (ANOSIM $R = 0,65$, $p < 0,001$). Por último, el NMDS de la comunidad mixta (**Figura 23C**) dividió las muestras en dos grupos, el primero compuesto por muestras de invierno y un segundo grupo compuesto por muestras de transición y de verano (ANOSIM $R = 0,35$, $p < 0,001$).

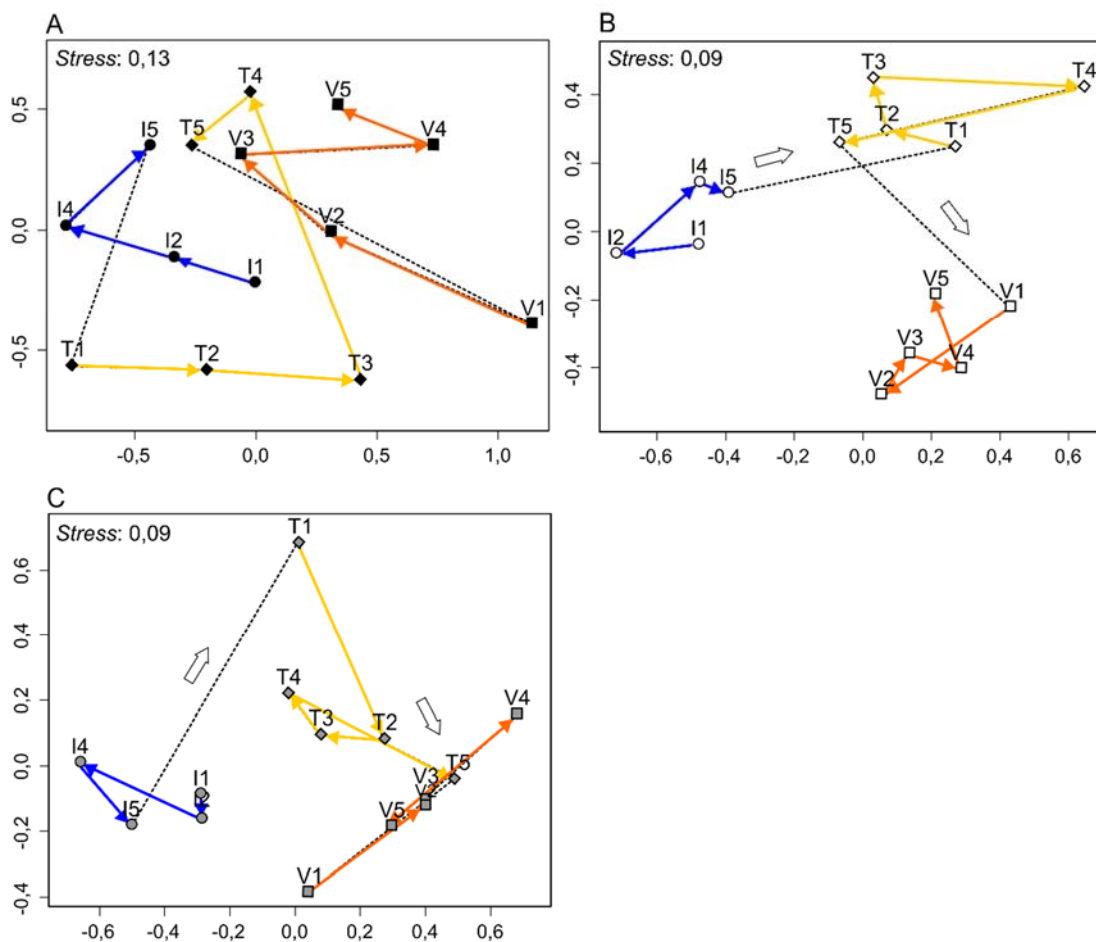


Figura 23. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en datos de intensidad relativa de ARISA y distancia de Bray-Curtis de las comunidades adheridas a partículas (A), de vida libre (B), y mixta (C). En cada uno de los NMDS se muestra el valor de *stress*. Los círculos representan las muestras de invierno, los rombros las muestras de transición y los cuadrados las muestras de verano. Las flechas coloreadas indican el orden cronológico de las muestras, y las flechas blancas indican el cambio de cada situación.

Para evaluar la similitud entre la composición de la comunidad de fechas adyacentes se calculó el cambio diario en la similitud (índice Whittaker d^{-1}) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Valores del cambio diario (índice Whittaker d^{-1}) en las tres comunidades estudiadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta) con la muestra temporal anterior. Se muestra también el valor medio de cada situación y el error estándar ($\pm e.e$).

SITUACIÓN	TIEMPO (días)	Whittaker d^{-1}		
		ADHERIDAS	LIBRE	MIXTA
I1-I2	3	0,166	0,294	0,312
I2-I3	6	0,087	0,276	0,300
I3-I4	3	0,138	0,304	0,312
Promedio		0,130	0,290	0,308
$\pm e.e$		0,023	0,008	0,004
T1-T2	3	0,113	0,256	0,278
T2-T3	3	0,170	0,280	0,301
T3-T4	3	0,121	0,241	0,398
T4-T5	3	0,215	0,250	0,268
Promedio		0,155	0,257	0,286
$\pm e.e$		0,024	0,008	0,008
V1-V2	3	0,150	0,244	0,282
V2-V3	3	0,215	0,280	0,296
V3-V4	3	0,107	0,285	0,285
V4-V5	3	0,144	0,263	0,294
Promedio		0,154	0,268	0,294
$\pm e.e$		0,022	0,009	0,070

El cambio diario promedio en la similitud (índice Whittaker d^{-1}) fue menor para la comunidad de bacterias adheridas a partículas, ($0,148 \pm 0,013 d^{-1}$) que para la comunidad de bacterias de vida libre ($0,270 \pm 0,006 d^{-1}$) o para la comunidad mixta ($0,293 \pm 0,004 d^{-1}$) ($p < 0,001$), lo que significa que la comunidad de bacterias adheridas a partículas es, en general, más estable que las otras dos comunidades.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el valor de este índice entre las tres situaciones ambientales para ninguna de las tres comunidades. Al analizar el cambio diario promedio en la similitud dentro de cada situación, la comunidad de bacterias adheridas a partículas, mostro valores bajos de este índice en invierno, transición y verano, exceptuando dos momentos puntuales, finales de transición (T4-T5) y a mediados de verano (V2-V3), donde el valor fue superior. Esto indica que, en general, la composición de esta comunidad sufrió

pequeños cambios en un plazo de tiempo corto, pero que en momentos puntuales, la composición de esta comunidad sufrió cambios más evidentes. Por lo que respecta a las comunidades bacterianas de vida libre y mixta, los valores de cambio diario fueron altos dentro de cada situación, es decir, los cambios en la composición de estas dos comunidades ocurrieron más rápidamente que en la comunidad de bacterias adheridas a partículas.

La diversidad de cada comunidad se calculó mediante el índice de diversidad de Shannon basado en los datos de intensidad obtenidos mediante ARISA (**Figura 24**). La diversidad media fue mayor en la comunidad de bacterias de vida libre ($2,77 \pm 0,05$) que en la comunidad de bacterias adheridas a partículas ($2,04 \pm 0,13$) ($p < 0,05$), mientras que la diversidad media de la comunidad mixta ($2,18 \pm 0,06$) no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con las otras dos comunidades. El coeficiente de variación de este índice en la comunidad de bacterias adheridas a partículas fue mayor (23,7 %) que los coeficientes de variación de las comunidades bacterianas de vida libre (6,7 %) y mixta (10,3 %).

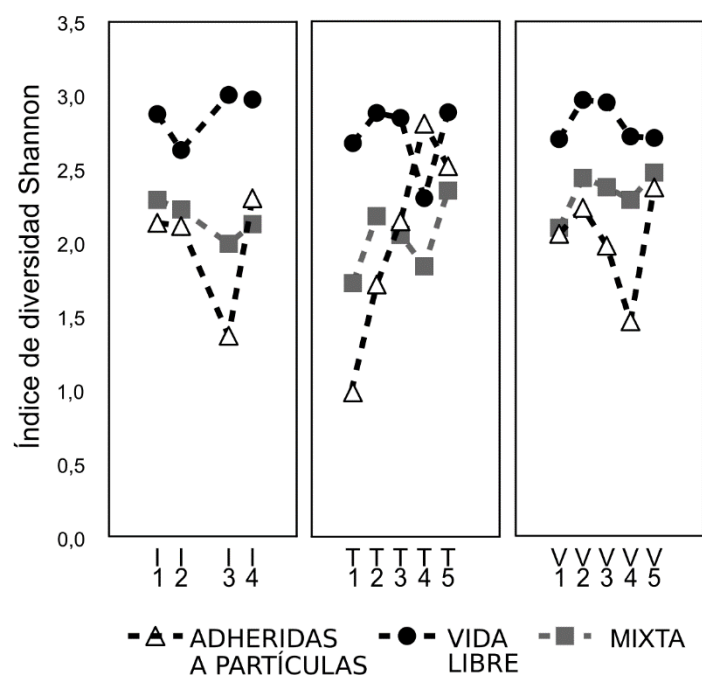


Figura 24. Evolución temporal del índice de diversidad Shannon basado en los datos de de intensidad de ARISA en las tres comunidades (adheridas a partículas, de vida libre y mixta). Los triángulos representan los valores de la comunidad de bacterias adheridas a partículas, los círculos los valores de la comunidad de bacterias de vida libre y los cuadrados los valores de la comunidad mixta.

La diversidad media no fue significativamente diferente entre las tres situaciones del estudio (invierno, transición y verano) para ninguna de las tres comunidades estudiadas ($p > 0,05$). Sin embargo, el coeficiente de variación de la diversidad de la comunidad de bacterias adheridas a partículas fue mayor en transición (33,1 %) que en invierno (23,9 %) y verano (17,1 %). Del mismo modo, el coeficiente de variación de la diversidad de la comunidad de bacterias de vida libre fue mayor en transición (8,6 %) que en invierno (5,9 %) y verano (4,9 %). Finalmente, el

coeficiente de variación de la diversidad de la comunidad mixta también fue mayor en transición (12,5%) que en invierno (6,0 %) y verano (6,4 %).

2.2.4.3 Caracterización de la fisiología heterótrofa bacteriana

La producción bacteriana media en la situación de transición ($17,6 \pm 1,5 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) fue significativamente menor a la de invierno ($29,1 \pm 3,3 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) y verano ($43,8 \pm 6,3 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) ($p < 0,05$) no habiendo diferencias entre estas dos últimas situaciones ($p > 0,05$) (**Figura 25A; Tabla suplementaria 18**). El coeficiente de variación de la producción bacteriana global (47,6 %) fue mayor que los coeficientes de variación de invierno (22,4 %), transición (19,4 %) y verano (32,3 %).

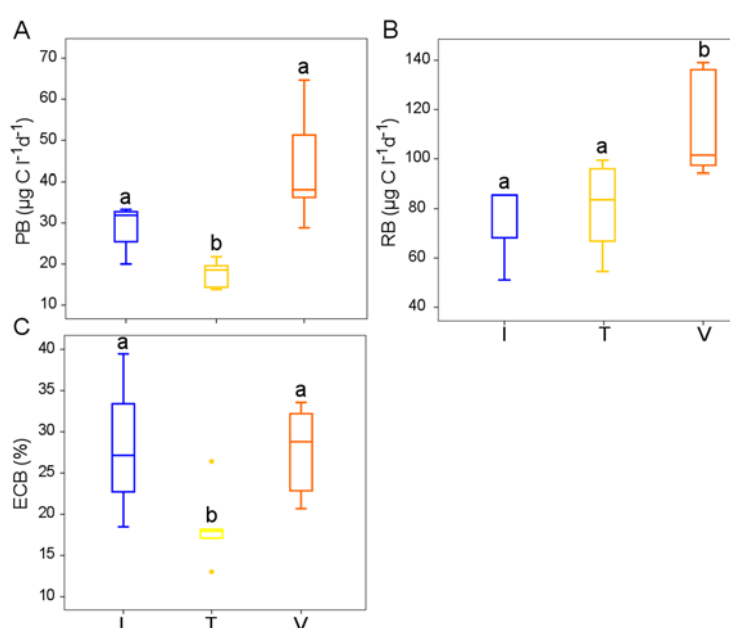


Figura 25. Diagrama de cajas de los valores detectados en invierno (I, azul), transición (T, amarillo) y verano (V, naranja) de las variables estudiadas: A: producción bacteriana (PB); B: respiración bacteriana (RB); C: eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB). Los bordes inferiores y superiores de los cuadros representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente. Los bordes de la barra de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. Los puntos fuera de los recuadros representan valores atípicos. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores medios ($p < 0,05$).

El valor medio de la respiración bacteriana en verano ($113,7 \pm 9,9 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) fue significativamente mayor al de transición ($80,1 \pm 8,6 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) e invierno ($76,9 \pm 8,6 \mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$) ($p < 0,05$), no habiendo diferencias entre estas dos últimas situaciones ($p > 0,05$) (**Figura 25B; Tabla suplementaria 18**). El coeficiente de variación de la respiración bacteriana global (27,7 %) también fue mayor que los coeficientes de variación de invierno (22,4 %), transición (23,9 %) y verano (19,4 %).

La eficiencia media de crecimiento bacteriana en la situación de transición ($18,5 \pm 2,2 \%$), fue inferior a la de invierno ($28,1 \pm 4,3 \%$) y verano ($27,6 \pm 2,5 \%$) ($p < 0,05$), no habiendo diferencias

entre verano e invierno ($p > 0,05$) (**Figura 25C; Tabla suplementaria 18**). En este caso, el coeficiente de variación de la eficiencia de crecimiento bacteriana global (30,5 %) fue similar a los coeficientes de variación de invierno (30,8 %) y de transición (26,3 %), y superior al de verano (20,5 %).

2.3 Relaciones entre la composición y la fisiología heterótrofa bacteriana y variables abióticas y bióticas

2.3.1 Relaciones entre la composición y variables abióticas y bióticas

Para relacionar la composición de la comunidad bacteriana (basada en la intensidad relativa de los datos de ARISA) y las variables, se realizó un Análisis de Correspondencia Canónica (CCA, del inglés Canonical Correspondence Analysis). Hay que mencionar que la intensidad obtenida mediante ARISA en este caso fue muy homogénea por lo que el efecto de las variables físico-químico-biológicas sobre las OTUs probablemente sea similar a un análisis basado en la presencia o ausencia de OTUs.

Mediante este análisis se pueden relacionar las variables que afectan a la comunidad de cada muestra y determinar el porcentaje de variabilidad comunitaria que explican dichas variables (Ter Braak, 1986; Fortunato *et al.*, 2013). Las variables se representan mediante vectores, en los que la longitud indica la importancia de la variable en el modelo, y la posición indica el grado de correlación con el eje. Los ángulos entre los vectores representantes de variables indican su correlación, de modo que cuanto menor sea ese ángulo mayor es la correlación entre ellas. Por último, los puntos representan las muestras, que se ordenan en función de su relación con las variables.

Las variables para el CCA fueron elegidas en base a la prueba de Monte Carlo ($p < 0,05$), por lo que para este análisis se usaron las siguientes: temperatura de superficie del agua (T^a), concentración de nitrato (NO_3^-), concentración de clorofila *a* (CL *a*), densidad de *Synechococcus* (*Syn*), densidad de partículas víricas (PV), y densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH).

En el CCA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas, el primer eje representó el 35,4 % de la varianza en la matriz biológica, mientras que el segundo eje representó el 23,5 % (**Figura 26; Tablas suplementarias 19 y 20**). El primer eje se relacionó positivamente con una combinación de la concentración de nitrato y la concentración de clorofila *a*, mientras que el segundo eje se definió negativamente por la temperatura y la abundancia de *Synechococcus*, partículas víricas y nanoflagelados heterótrofos. Aunque la mayoría de las muestras de bacterias adheridas a partículas no mostraron una relación estrecha con las variables estudiadas, se observó que las comunidades de final de invierno (I3 y I4) mostraron una relación positiva con la concentración de nitrato. Por el contrario, la temperatura y las

densidades de *Synechococcus* y nanoflagelados heterótrofos mostraron ser factores importantes en la composición de la comunidad de verano.

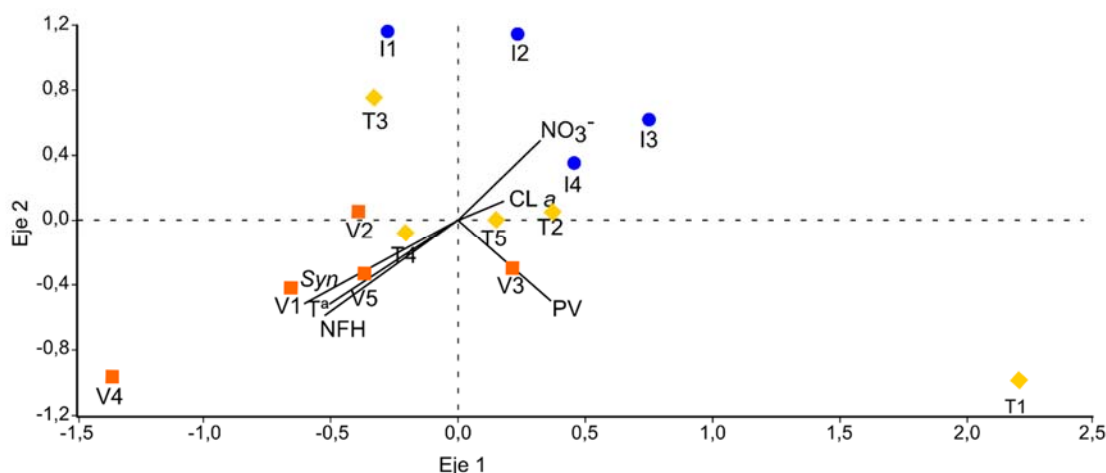


Figura 26. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) entre las variables estudiadas (líneas) y la comunidad de bacterias adheridas a partículas a lo largo del estudio basado en la intensidad de ARISA. Las muestras de invierno están representadas mediante un círculo azul, las muestras de transición mediante un rombo amarillo, y las muestras de verano mediante un cuadrado naranja. Las variables fueron representadas mediante líneas: temperatura de superficie del agua (T^a), concentración de nitrato (NO_3^-), concentración de clorofila a ($\text{CL } a$), densidad de *Synechococcus* (Syn), densidad de partículas víricas (PV) y densidad de nanoflagelados heterótrofos (NFH).

En el caso de la comunidad de bacterias de vida libre, el primer eje representó el 53,9 % de la varianza en la matriz biológica, mientras que el segundo eje representó el 22,5 % (**Figura 27; Tablas suplementarias 21 y 22**). El primer eje se relacionó positivamente con una combinación de la concentración de nitrato y de clorofila a , mientras que el segundo eje se definió negativamente por la temperatura y la abundancia de *Synechococcus*, y positivamente con la densidad de partículas víricas y nanoflagelados heterótrofos. En este caso también se observó una fuerte influencia positiva de la concentración de nitrato en las comunidades de invierno. Al mismo tiempo, la clorofila a correlacionó positivamente, pero con un valor menor, con la composición de las comunidades bacterianas del final de invierno y principio de transición. La densidad de partículas víricas y la densidad de nanoflagelados heterótrofos mostraron ser factores importantes en la separación de las muestras finales de transición e iniciales de verano. Por último, la temperatura y la abundancia de *Synechococcus* influyeron en la composición de las comunidades bacterianas de verano.

Para la comunidad mixta, el primer eje representó el 46,9 % de la varianza en la matriz biológica, mientras que el segundo eje representó el 26,4% (**Figura 28; Tablas suplementarias 23 y 24**). El primer eje se relacionó positivamente con la concentración de nitrato, mientras que el segundo eje se relacionó positivamente con la densidad de partículas víricas y nanoflagelados heterótrofos. La comunidad mixta mostró en invierno una relación mayor con la concentración de nitrato y una menor relación con la concentración de clorofila a que en transición. De modo similar a como ocurrió con la comunidad de bacterias de vida libre, la densidad de partículas víricas y la densidad de nanoflagelados heterótrofos mostraron ser

factores importantes en las comunidades bacterianas mixtas a finales de transición, en tanto que las comunidades en verano mostraron una estrecha relación con la abundancia de *Synechococcus* y la temperatura, sobre todo las muestras iniciales.

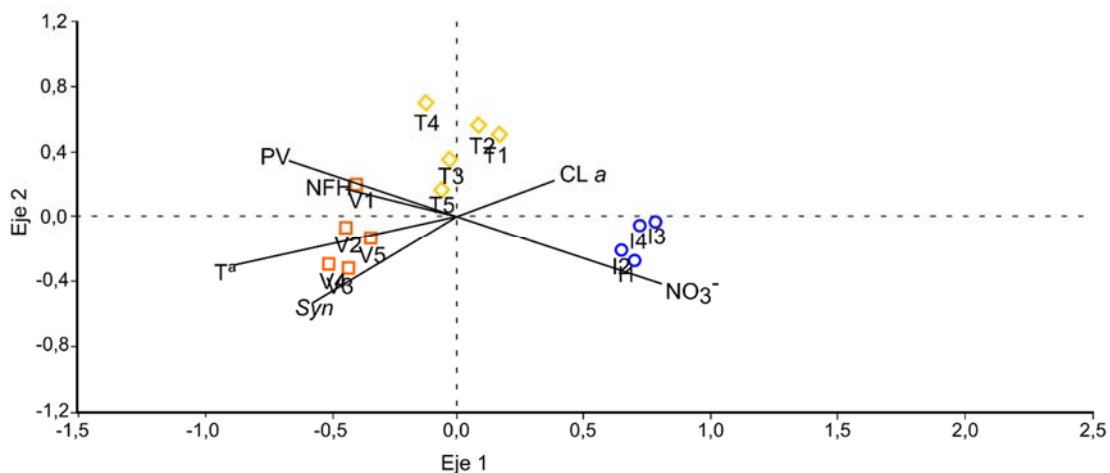


Figura 27. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) entre las variables estudiadas (líneas) y la comunidad de bacterias de vida libre a lo largo del estudio basado en la intensidad de ARISA. Las muestras de invierno están representadas mediante un círculo azul, las muestras de transición mediante un rombo amarillo, y las muestras de verano mediante un cuadrado naranja. Las variables fueron representadas mediante líneas: temperatura de superficie del agua (T^a), concentración de nitrato (NO_3^-), concentración de clorofila *a* (*CL a*), densidad de *Synechococcus* (*Syn*), densidad de partículas víricas (*PV*) y densidad de nanoflagelados heterótrofos (*NFH*).

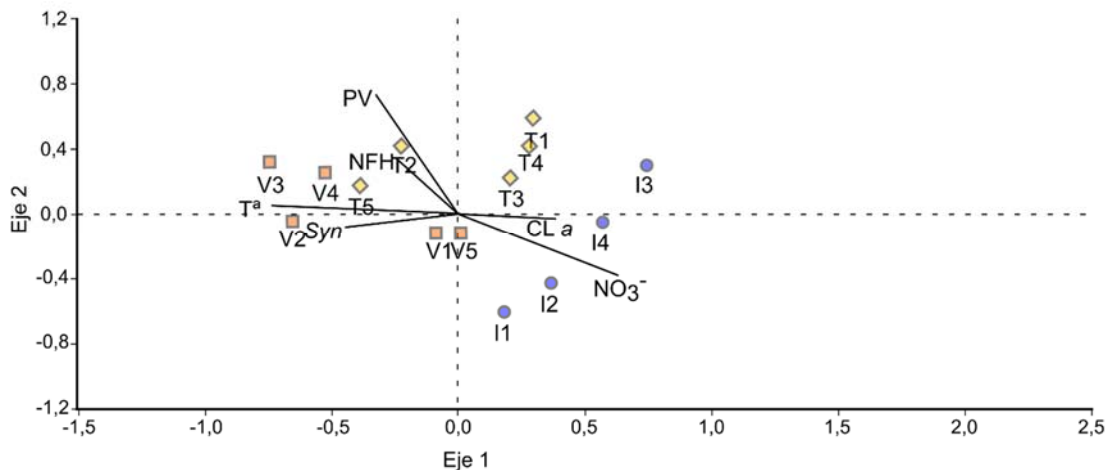


Figura 28. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) entre las variables estudiadas (líneas) y la comunidad mixta a lo largo del estudio basado en la intensidad de ARISA. Las muestras de invierno están representadas mediante un círculo azul, las muestras de transición mediante un rombo amarillo, y las muestras de verano mediante un cuadrado naranja. Las variables fueron representadas mediante líneas: temperatura de superficie del agua (T^a), concentración de nitrato (NO_3^-), concentración de clorofila *a* (*CL a*), densidad de *Synechococcus* (*Syn*), densidad de partículas víricas (*PV*) y densidad de nanoflagelados heterótrofos (*NFH*).

2.3.2 Relaciones entre la fisiología bacteriana y variables abióticas y bióticas

La producción bacteriana correlacionó positivamente con la temperatura, la densidad de *Synechococcus* y la concentración del carbono orgánico disuelto (**Tabla 8**). La respiración

bacteriana correlacionó positivamente con la temperatura, la densidad de *Synechococcus*, la concentración de la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta y la concentración del carbono orgánico disuelto (**Tabla 8**). El resto de las variables abióticas y bióticas no correlacionaron significativamente con la producción y respiración bacteriana.

Tabla 8. Valores rho de Spearman de correlaciones estadísticamente significativas entre la producción bacteriana (PB) y la respiración bacteriana (RB) con las variables: temperatura de superficie del agua (T^a), fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (PROT), carbono orgánico disuelto (COD), y densidad de *Synechococcus* (*Syn*). Significación de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Variables	Rho de Spearman	
	PB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	RB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
T^a ($^{\circ}\text{C}$)	0,53*	0,70**
PROT (T)(QSU)		0,73**
COD ($\mu\text{M C}$)	0,64*	0,77**
<i>Syn</i> ($\times 10^6$ cél l^{-1})	0,82**	0,55*

3 Discusión

Tras observar en el capítulo anterior que en aguas superficiales de la estación costera de Armintza el mes de abril mostraba diferencias en diversidad y eficiencia de crecimiento bacteriana con respecto al resto de las muestras de invierno y jugaba un papel de transición entre los meses de invierno y verano, este trabajo se ha centrado en analizar la variación en la composición de la comunidad bacteriana a corto plazo en función del momento del año y del tipo de comunidad y así completar la información obtenida en el estudio estacional. Con el objetivo de detectar los cambios en la comunidad bacteriana a corto plazo de una forma detallada, se realizó un muestreo de forma intensiva en cada uno de las situaciones detectadas por las que transcurre el sistema: invierno (febrero-marzo), transición (abril) y verano (junio). Para ello, se muestreó en cada una de las situaciones con periodos de muestreos de 3 días de diferencia dentro de cada una. Para conseguir una perspectiva global, se combinaron dos técnicas moleculares, CARD-FISH y ARISA. Mientras que CARD-FISH proporcionó información sobre la contribución porcentual de los grandes grupos taxonómicos a la comunidad bacteriana, ARISA permitió conocer el grado de diversidad y la forma en la que varió la comunidad bacteriana más abundante. Además del análisis del cambio en la composición de la comunidad, también se analizó la capacidad de producción y respiración de la comunidad a corto plazo, así como la eficiencia de crecimiento de la comunidad bacteriana.

El análisis de la fisiología bacteriana mostró que durante transición, los valores de producción fueron los más bajos, mientras que los valores de respiración se mantuvieron altos y similares

a los de invierno, lo que generó una baja eficiencia de crecimiento bacteriana. Tanto la producción como la respiración mostraron además una mayor dispersión entre situaciones que intrasituaciones y esto puede ser debido al efecto del cambio entre situaciones ambientales de ciertas variables sobre estas actividades ya que la producción bacteriana mostró correlaciones positivas con la temperatura, la densidad de *Synechococcus* y la concentración del carbono orgánico disuelto, mientras que la respiración bacteriana además de mostrar correlaciones positivas con las variables mencionadas, también correlacionó positivamente con la fracción proteica de la materia orgánica fluorescente disuelta.

La influencia de la temperatura sobre la producción y respiración bacteriana también ha sido observada en otros trabajos (López-Urrutia y Morán, 2007; Huete-Stauffer *et al.*, 2015; Morán y Scharek, 2015). Por otro lado, aunque tanto la producción como la respiración están esencialmente vinculadas a la heterotrofia, ambos procesos no siempre están estrechamente acoplados (Apple y del Giorgio, 2007). La respiración se mantiene alta durante transición ya que a medida que avanza la degradación de los materiales producidos por el fitoplancton y la materia orgánica se ve alterada cualitativamente por el procesamiento microbiano, la degradación de los materiales restantes requerirá la expresión de mayores niveles de actividad enzimática, lo que a su vez aumentará el costo energético para convertir la materia orgánica disuelta en biomasa microbiana (Middelboe y Sondergaard, 1993). Sin embargo, durante la transición la comunidad bacteriana no logra obtener ventaja de esta alta respiración en forma de alta producción de nueva biomasa ya que los valores de producción durante transición fueron significativamente menores que en invierno.

Además, si entendemos la eficiencia de crecimiento como propiedad integradora de la comunidad (Baña *et al.*, 2020), el bajo valor de eficiencia de crecimiento detectado en transición indica que el cambio ambiental producido por el afloramiento estaría fuera del rango de adaptación de los componentes de la comunidad bacteriana y por lo tanto la comunidad bacteriana de transición no estaría bien adaptada a las condiciones ambientales durante la transición.

La composición de la comunidad bacteriana analizada mediante CARD-FISH confirmó la alternancia entre los grupos filogenéticos *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* que se había detectado en el estudio plurianual desarrollado en el **Capítulo 1**. *Alfaproteobacteria* mostró correlaciones positivas con la concentración de los nutrientes inorgánicos y la concentración de la clorofila *a* y correlaciones negativas con la temperatura y la concentración de la fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta, variables características de la situación de invierno. En cambio, *Bacteroidetes* mostró correlaciones negativas con la concentración de los nutrientes inorgánicos y la concentración de la fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta y una correlación positiva con la temperatura, variables características de la situación de verano. La clara dominancia observada de *Alfaproteobacteria* en la situación de invierno y de *Bacteroidetes* en la situación de verano provocó que estos dos grupos filogenéticos mostrasen una mayor dispersión entre situaciones que intrasituaciones.

La relativa estabilidad en la composición de la comunidad bacteriana que se observó en cada una de las dos situaciones del sistema, invierno y verano, cuando se estudiaron con una frecuencia mensual (**Capítulo 1**), enmascara una elevada variabilidad en el corto espacio de tiempo y que fue desvelada bajo condiciones de muestreo más intensivo. Así, se observó una elevada variabilidad dentro de la situación de invierno en los grupos *Alfaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, y en transición en los grupos *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria*.

Resulta notable la elevada variabilidad de cuatro de los cinco grupos filogenéticos estudiados durante la situación de invierno. Durante este periodo de tiempo, las concentraciones del nitrato, silicato y de clorofila *a* mostraron una alta variabilidad debido al aumento en las concentraciones en la muestra I4 (**Tablas suplementarias 16 y 17**), asociado al inicio del afloramiento fitoplanctónico dominado por diatomeas observado por Baña *et al.* (2020), y recurrente en ese momento del año en la estación costera de Armintza. También en esta muestra de finales de invierno se observó que el grupo *Alfaproteobacteria* empezaba a perder su protagonismo cuantitativo y el de *Bacteroidetes* empezaba a ganarlo. Por ese motivo, las muestras recogidas durante este corto periodo del final del invierno pueden no ser representativas de la composición de la comunidad durante el total de los meses de invierno.

La materia orgánica disuelta fresca derivada del crecimiento de las diatomeas a finales del invierno en aguas superficiales de la estación costera de Armintza (Baña *et al.*, 2020) puede favorecer el crecimiento de *Bacteroidetes*. Los *Bacteroidetes* se han asociado con estrategias de crecimiento rápido, especialización en la degradación inicial de biopolímeros complejos en los ambientes marinos (Kirchman, 2002; Bauer *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008) y colonización inicial de detritos de diatomeas (Riemann *et al.*, 2000; Pinhassi *et al.*, 2004; Abell y Bowman, 2005). Por lo tanto, a pesar de que probablemente otros grupos filogenéticos también puedan utilizar una parte del material orgánico producido por las diatomeas y crecer, es posible que la mayor capacidad de utilización de esa materia orgánica disuelta por parte de *Bacteroidetes*, haga que aumente su contribución relativa a la comunidad total en perjuicio de la contribución relativa a la comunidad de *Alfaproteobacteria*.

Por otra parte, la variabilidad observada en invierno en el grupo *Betaproteobacteria* puede deberse, además de a la relación con el afloramiento fitoplanctónico, a la entrada de origen fluvial de bacterias de este grupo. Esta aseveración se basa en que se observó una correlación positiva entre el porcentaje de *Betaproteobacteria* y la concentración de la materia orgánica fluorescente disuelta de tipo húmico. El bacterioplancton fluvial puede migrar con éxito al agua de mar (Langenheder *et al.*, 2004; Kisand *et al.*, 2005) al igual que las sustancias húmicas, que pueden acumularse en el agua de mar superficial debido a descargas intensas de agua dulce (Chen *et al.*, 2002; Nieto-Cid *et al.*, 2005). Como resultado, se ha descrito la detección en aguas marinas de estos microorganismos de origen alóctono asociados a la materia orgánica fluorescente disuelta de tipo húmico (Teira *et al.*, 2009).

Las *Gammaproteobacteria* mostraron una alta variabilidad tanto en invierno como en transición y a pesar de que este grupo no mostró correlaciones con ninguna de las variables estudiadas, sí que se detectó que su evolución reflejaba la tendencia de la concentración de clorofila *a*: su contribución relativa descendió entre las muestras I2 e I3 tras la caída de la concentración de clorofila *a*, aumentó entre las muestras I3 e I4 siguiendo el aumento en la concentración de clorofila *a*, y durante transición y tras el aumento de la concentración de clorofila *a*, volvió a aumentar su contribución en T5. *Gammaproteobacteria* es un grupo oportunista conocido por tener altas tasas de crecimiento potencialmente favorecidas por pulsos de enriquecimiento de nutrientes (Eilers *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2000) y que muestra una rápida respuesta frente a los afloramientos de fitoplancton (Tada *et al.*, 2011; Sarmento y Gasol, 2012).

Por último, la elevada variabilidad de *Actinobacteria* en la situación de transición puede estar relacionada con su mortalidad por virus, ya que se observó una correlación negativa entre el grupo *Actinobacteria* y la densidad de partículas víricas. En este sentido, Bouvier y del Giorgio (2007), mediante ensayos con agua de mar, observaron que el grupo *Actinobacteria* tenía el potencial de crecer rápidamente en aguas oceánicas, pero que mostraba valores bajos en la composición de la comunidad del medio marino debido a la alta mortalidad viral.

Para poder detectar cambios en la composición de la comunidad bacteriana más abundantes con una mayor profundidad se usó la técnica molecular ARISA. Si bien es cierto que mediante esta técnica molecular perdemos la información taxonómica, el análisis de la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S ofrece una resolución mayor que el análisis basado en la amplificación del ARNr 16S (García-Martínez *et al.*, 1999; Lerner *et al.*, 2006; Okubo y Sugiyama, 2009). Al detectar un mayor número de OTUs por muestra, y por ende una detección más elevada de miembros que componen la comunidad, esta técnica nos permite una mayor sensibilidad a la hora de detectar cambios a corto plazo en la composición de la comunidad bacteriana.

A pesar de analizar la composición de la comunidad con una metodología diferente a la utilizada en el capítulo anterior, el análisis de la composición de la comunidad bacteriana en función de su hábitat en la columna de agua confirmó que la comunidad bacteriana de aguas superficiales costeras de Armintza está compuesta por tres comunidades: la comunidad de bacterias adheridas a partículas, la comunidad de bacterias de vida libre y la comunidad mixta. Se detectaron porcentajes similares a los obtenidos en el estudio plurianual desarrollado en el capítulo anterior, ya que el 81 % de las OTUs detectadas estaban exclusivamente adheridas a partículas o libres en la columna de agua, mientras que solo el 19 % de las OTUs totales estaba compuesta por bacterias que se encuentran indistintamente adheridas a partículas o libres en la columna de agua. Del mismo modo, los porcentajes de aparición de OTUs generalistas y especialistas en la comunidad de bacterias de vida libre y mixta fueron similares a los observados durante el estudio plurianual (**Capítulo 1**), es decir, en la comunidad de bacterias de vida libre el porcentaje de especialistas fue mayor que el porcentaje de generalistas y en la comunidad mixta el porcentaje de generalistas fue mayor que el porcentaje de especialistas.

Sin embargo, durante el estudio estacional se detectó en la comunidad de bacterias adheridas a partículas el mismo porcentaje de especialistas que de generalistas, mientras que el análisis presente mostró un porcentaje mayor de especialistas.

Esta discrepancia en el porcentaje de generalistas *versus* especialistas detectado en la comunidad de bacterias adheridas a partículas puede ser debido a varias causas. Por un lado, al hecho de haber utilizado dos técnicas distintas para determinar la composición de la comunidad bacteriana, ya que el estudio de la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S altamente variable, muestra una alta sensibilidad lo que permite la detección hasta el nivel de subespecie, aumentando la posibilidad de que el análisis detecte pequeños cambios en comunidades bacterianas complejas (Okubo y Sugiyama, 2009) que no fueron detectados mediante la técnica DGGE utilizada en el capítulo anterior. Por otro lado, la discrepancia puede derivar de las distintas frecuencias de muestreo, ya que un muestreo mensual pasaría por alto dinámicas ecológicas de la comunidad que sí podrían detectarse en un muestreo intensivo, y que estarían inducidas por fuerzas relacionadas con la mortalidad (Needham *et al.*, 2013) o responder significativamente a los afloramientos de diatomeas en una rápida sucesión de diferentes taxones bacterianos (Fandino *et al.*, 2001; Yager *et al.*, 2001; Teeling *et al.*, 2012). Así, la medida con alta resolución temporal puede descubrir respuestas de OTUs individuales en aquellos procesos ecológicos impulsados por las condiciones ambientales.

Mediante la técnica molecular ARISA y el muestreo intensivo, se encontraron OTUs especialistas, exclusivas de la situación de invierno o de la situación de verano, así como OTUs generalistas, que aparecieron durante las tres situaciones estudiadas. Dentro de las OTUs especialistas, se detectaron OTUs compartidas entre el invierno y transición así como OTUs compartidas entre transición y verano. Sin embargo, no se encontró ninguna OTU exclusiva de transición. Las OTUs presentes en transición son una mezcla de OTUs que estaban en invierno y desaparecen durante transición, antes del verano, y OTUs que aparecen durante transición y se mantienen en la situación de verano. Por lo tanto, transición es una situación donde se da la aparición y desaparición de OTUs, y en la que la comunidad bacteriana se encuentra en un intenso proceso dinámico de cambio y reemplazo.

A este respecto, Comte y del Giorgio (2011) propusieron dos escenarios que se ajustan a la dinámica de composición de la comunidad bacteriana en las aguas superficiales de la estación de muestreo de Armintza: el escenario de ajuste y el escenario de reemplazo. En el escenario de ajuste, los filotipos dominantes son generalistas con un alto grado de plasticidad, siendo "resistentes" al cambio ambiental. En nuestro caso, el escenario de ajuste estaría definido por las OTUs generalistas que se detectan a lo largo de las tres situaciones estudiadas. Por el contrario, en el escenario de reemplazo los taxones dominantes no pueden adaptarse a los cambios en el medio ambiente debido a un menor nivel de plasticidad, lo que hace que la comunidad sea menos "resistente". Este último escenario haría referencia a las OTUs especialistas de invierno que o bien no se detectan en transición, o si lo hacen no aparecen en verano por no ser capaces de adaptarse a la nueva situación ambiental. Por el contrario, los

miembros menos abundantes de la comunidad de invierno sufren cambios rápidos temporales al cambiar las condiciones ambientales (Jaspers *et al.*, 2001), y pasan a ser detectables (abundantes) durante transición, y a mantenerse durante el verano.

El análisis del NMDS de la comunidad de bacterias adheridas a partículas no mostró un patrón temporal claro. En cambio, el NMDS de la comunidad de bacterias de vida libre mostró un claro patrón temporal que separa esta comunidad bacteriana en tres grupos bien diferenciados: invierno, transición y verano. El grupo de transición, situado entre el grupo de invierno y el grupo de verano, tiene una composición intermedia entre las dos situaciones mencionadas, con OTUs compartidas con la situación de invierno y con la situación de verano. Este análisis agrupó las muestras correspondientes a la misma situación, lo que sugiere que las comunidades pertenecientes a la misma situación son más parecidas entre sí que en comparación con las de las otras dos situaciones. A su vez, la comunidad mixta mostró dos grupos diferenciados, el primero compuesto por comunidades de invierno y un segundo compuesto por comunidades de transición y verano.

La falta de agrupación clara mostrada por la comunidad de bacterias adheridas a partículas junto con una diversidad menor detectada en esta comunidad (medida mediante el índice de Shannon) en comparación con las comunidades bacterianas de vida libre y mixta, indica que las partículas marinas proporcionan un hábitat estable que puede atenuar la influencia de las condiciones medioambientales en la variación en la composición de la comunidad (Alldredge y Cohen, 1987; Stocker, 2012; Ganesh *et al.*, 2014). Distintos autores han observado una mayor influencia de las variables ambientales sobre las bacterias de vida libre en comparación con las bacterias adheridas a partículas. Por ejemplo, Sapp *et al.* (2007), observaron mediante el análisis de CCA que las variables estudiadas (distintas especies de fitoplancton, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes inorgánicos) tenían una mayor influencia en la comunidad de bacterias de vida libre que en la comunidad de bacterias adheridas. Del mismo modo, los resultados de Bachmann *et al.* (2018) también indicaron que una elevada proporción de la variación en la composición de las bacterias de vida libre se podía explicar por parámetros ambientales ya que las bacterias de vida libre están directamente expuestas al agua circundante.

El diferente nivel de diversidad de las comunidades bacterianas adheridas a partículas y de vida libre es un aspecto reconocido en la literatura científica, aunque sujeto a controversia. Si bien algunos autores han detectado mayor diversidad en la comunidad de bacterias adheridas a partículas (Parveen *et al.*, 2011; Crespo *et al.*, 2013), otros autores también han observado valores de diversidad mayores en bacterias de vida libre tanto en aguas superficiales (Hollibaugh *et al.*, 2000; Fandino *et al.*, 2001; Kellogg y Deming, 2009) como en aguas de profundidad (Salazar *et al.*, 2015). En nuestro estudio hemos detectado valores superiores de diversidad en la comunidad de bacterias de vida libre respecto a la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Incluso en transición, que fue el momento en el que el porcentaje de bacterias adheridas a partículas fue el más elevado (45,7 %), no se observó una mayor

diversidad de esa comunidad. Por ejemplo, Fandino *et al.* (2001) en su estudio de la comunidad bacteriana de aguas del sur de California, también detectaron una diversidad mayor en la comunidad de bacterias de vida libre en comparación con la comunidad de bacterias adheridas a partículas y propusieron que esto podía deberse a una colonización de fitodetritos que genera el rápido crecimiento y el dominio de unos pocos colonizadores, dando como resultado una menor diversidad.

Por otra parte, la dispersión del índice de diversidad de Shannon en la comunidad de bacterias adheridas a partículas fue mayor que en las comunidades de bacterias de vida libre y mixta, debido principalmente a la alta variabilidad observada en la situación de transición, donde la diversidad pasó de ser la más baja en la primera muestra a ser la más alta en la penúltima muestra de transición. En la penúltima muestra es donde encontramos un mayor número de OTUs especialistas de verano en la comunidad de bacterias adheridas a partículas sin que los especialistas de invierno de esta comunidad hayan desaparecido, lo que hace que aumente la diversidad de esta comunidad en las muestras finales de transición. Si bien no se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas con ninguna de las variables estudiadas (datos no mostrados), el aumento de esta diversidad puntual indica que hay factores que no se han medido en este trabajo que afectan en gran medida a la diversidad de las bacterias adheridas a partículas. Asimismo, el hecho de que durante transición las tres comunidades analizadas mostrasen una variabilidad mayor en comparación con invierno y verano refuerza la idea de que la transición es una situación inestable con cambios en la composición de la comunidad bacteriana.

El bajo cambio diario promedio en la similitud de la comunidad de bacterias adheridas a partículas indica que, en general, la composición de esta comunidad sufre pequeños cambios en el plazo de tiempo corto. Además, la información explicativa de los dos ejes principales del CCA de esta comunidad fue relativamente baja (35,4 % y 23,5 %), lo que apoya la idea de que las partículas puedan ejercer cierta protección ante los cambios ambientales y así se detecte una menor influencia de las variables estudiadas sobre la composición de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. No obstante, se identificaron momentos puntuales a finales de transición (T4-T5) o a mediados de la situación de verano (V2-V3) en los que la composición de esta comunidad sufrió cambios notablemente más rápidos. Estos casos concretos pudieron estar causados por una mortalidad más elevada debida a la depredación por nanoflagelados heterotrofos (T4-T5) o a la lisis por infección vírica (V2-V3), como se deduce del análisis CCA. Es conocido que varios tipos de partículas presentes en los sistemas marinos pueden contener abundantes protozoos (Caron *et al.*, 1982), concretamente especies de flagelados y ciliados especializados en la depredación de bacterias asociadas a partículas (Caron, 1987; Sibbald y Albright, 1988; Artolozaga *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha observado que los virus pueden colonizar intensamente partículas de distinta naturaleza, como la nieve marina (Riemann y Grossart, 2008) o las TEPs (del inglés Transparent Exopolymeric Particles) (Mari *et al.*, 2007) e

infectar las bacterias que han colonizado este tipo de partículas (Mari *et al.*, 2007; Turner, 2015).

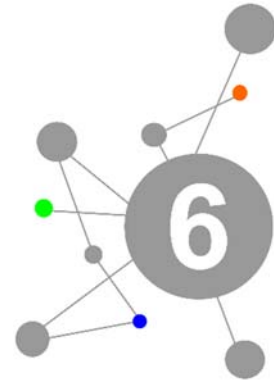
Las comunidades de bacterias de vida libre y mixta mostraron cambios diarios promedios en la similitud ($0,27\text{ d}^{-1}$ y $0,29\text{ d}^{-1}$ respectivamente) mayores que el valor de $0,17\text{ d}^{-1}$ observado por Hewson *et al.* (2006) y que el valor de $0,08\text{ d}^{-1}$ detectado por Sintés *et al.* (2013) en sus estudios sobre comunidades de bacterias de vida libre. Ambas comunidades mostraron valores altos y homogéneos del índice de Whittaker diario, indicativos de cambios relativamente rápidos en la composición de estas dos comunidades incluso dentro de cada situación. Además, las agrupaciones temporales claras mostradas por estas comunidades junto con un elevado porcentaje de información explicativa de los dos ejes principales de los CCA apoyan que las variables ambientales sean inductoras del cambio al ejercer una mayor influencia sobre estas comunidades en comparación con la comunidad de bacterias adheridas a partículas.

En este sentido, los CCAs de las comunidades de bacterias de vida libre y mixta mostraron una clara relación positiva de los nutrientes inorgánicos sobre las comunidades iniciales de invierno. A su vez, las comunidades finales de invierno mostraron una relación positiva con la concentración de clorofila *a*, lo que nos indicaría que las comunidades de finales de invierno estarían relacionadas con el afloramiento fitoplanctónico que se da en Armintza. Sapp *et al.* (2007) y Sintés *et al.* (2013) también observaron que los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de invierno a primavera se regían principalmente por los recursos disponibles, en su caso principalmente los nutrientes inorgánicos.

Por otro lado, la temperatura, y la abundancia de *Synechococcus* fueron factores importantes en la determinación de las comunidades bacterianas de verano. La excreción de sustrato altamente lábil por parte de *Synechococcus* (Biddanda y Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), podría generar un cambio en la composición de la comunidad al favorecer el crecimiento de OTUs asociadas a la adquisición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. También se observó una estrecha relación entre la densidad de nanoflagelados heterótrofos y partículas víricas con la muestra V1 en la comunidad de bacterias de vida libre y en la muestra T2 en la comunidad mixta, lo que evidenció la importancia de la mortalidad por parte de virus y nanoflagelados heterótrofos a la hora de provocar cambios en la composición de las comunidades bacterianas (Šestanović *et al.*, 2004; Suttle, 2007; Bettarel *et al.*, 2016).

En resumen, el muestreo intensivo en aguas superficiales de la estación costera de Armintza permitió observar una elevada variabilidad en el corto plazo de tiempo (días-semanas) en ciertas variables ambientales, que es incluso superior al detectado en periodos largos de tiempo (meses), y que influye en la composición de la comunidad bacteriana. En la situación de invierno la variabilidad fue mayor en ciertos grupos taxonómicos a causa del afloramiento fitoplanctónico que se observó a finales de dicha situación. En transición, la comunidad bacteriana atravesó un intenso proceso dinámico de cambio y reemplazo, sin OTUs exclusivas y con una baja eficiencia de crecimiento, indicativa de que esta comunidad no está bien

adaptada a esas condiciones ambientales. En verano se observó una mayor variabilidad debido al aumento de *Synechococcus* en las muestras finales de esta situación. La composición de la comunidad de bacterias adheridas a partículas varió lentamente y estuvo poco influenciada por las variables físico-químico-biológicas, a excepción de momentos puntuales, mientras que las comunidades de bacterias de vida libre y mixta mostraron velocidades de cambio de su composición más elevadas e influidas por las variables ambientales analizadas. En este sentido, los nutrientes inorgánicos mostraron una clara relación con las comunidades iniciales de invierno mientras que las comunidades finales de invierno se asociaron al afloramiento fitoplanctónico que se da recurrentemente en Armintza en ese momento del ciclo anual. La temperatura, y la abundancia de *Synechococcus* fueron factores importantes en la composición de las comunidades bacterianas de verano. También se observó una estrecha relación entre la densidad de nanoflagelados heterótrofos y partículas víricas con muestras puntuales de las comunidades bacterianas de vida libre y mixta.



CAPÍTULO 3:

Estudio de la sensibilidad térmica en tres bacterias modelo.

1 Justificación y objetivos

En el actual contexto de calentamiento global del planeta (IPCC, 2021), las zonas costeras se han revelado como especialmente sensibles, con valores de incremento de temperatura entre 0,2 °C y 0,3 °C por década para la zona del sur-oeste de Europa (Lima y Wetthey, 2012; Costoya *et al.*, 2015). Estas zonas se caracterizan por una elevada diversidad biológica y productividad, lo que las hace especialmente interesantes para el estudio de las respuestas de los organismos marinos al calentamiento global.

Los procesos ecológicos dependen en gran medida de la temperatura (López-Urrutia *et al.*, 2006), que es un importante regulador de los procesos biológicos, incluida la actividad metabólica de los procariotas (López-Urrutia y Morán, 2007). En los sistemas marinos, estos organismos tienen una función clave en los ciclos biogeoquímicos (Huete-Stauffer *et al.*, 2015) y son los mayores responsables de remineralizar la materia orgánica (Azam *et al.*, 1983). Por lo tanto, para poder entender la estructura y el funcionamiento del océano, es necesario estudiar la respuesta de las bacterias marinas heterótrofas ante los cambios de temperatura (Huete-Stauffer *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayoría de los trabajos que estudian el efecto del aumento de la temperatura sobre los microorganismos marinos se han centrado en la respuesta del fitoplancton (Morán *et al.*, 2010).

La mayoría de los trabajos desarrollados hasta el momento han estudiado comunidades bacterianas amplias y complejas (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007; Sarmiento *et al.*, 2010; Ayo *et al.*, 2017), en tanto que los estudios sobre el efecto de la temperatura sobre bacterias marinas específicas son muy escasos (Cho y Giovannoni, 2004; Arandia-Gorostidi *et al.*, 2017). Como cada especie microbiana marina responde individualmente al cambio de temperatura (Schiel *et al.*, 2004), y muestran una temperatura mínima, máxima y óptima para llevar a cabo los procesos vitales (Pomeroy y Wiebe, 2001), es necesario caracterizar el efecto de la temperatura en la mayor cantidad posible de procesos biológicos y de especies bacterianas con el fin de conocer y predecir no solo los niveles de actividad metabólica procariota, sino también la composición taxonómica de la comunidad bacterioplanctónica (Selje *et al.*, 2004; Sikorski y Nevo, 2007; Yung *et al.*, 2015).

Con el fin de estudiar en detalle la influencia de la temperatura en el bacterioplancton marino, se escogieron como miembros representativos de la comunidad bacteriana tres bacterias que han sido detectadas recurrentemente en la estación costera de Arminza. Se analizaron varias actividades específicas como son la producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), la actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) y la actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina (FA_{esp}) a varias temperaturas, incluyendo las temperaturas medias del sistema marino en la situación fría (12 °C) y cálida (20 °C). Además, se analizó la sensibilidad de estos procesos a la temperatura mediante los valores de energía de activación (E_a), obtenidos a partir de la determinación de dichas actividades a cuatro temperaturas, 12 °C, 16 °C, 20 °C y 24 °C, que cubren el rango de temperaturas que se dan en

este sistema acuático. Este análisis persiguió caracterizar la respuesta de estas tres bacterias frente a un potencial aumento de temperatura del sistema derivado de la actual situación de cambio climático global.

2 Resultados

2.1 Bacterias marinas representativas de la comunidad bacteriana de la estación costera de Arminza

El análisis de DGGE sobre la composición de la comunidad bacteriana en agua de mar superficial de la estación costera de Arminza de la serie plurianual (febrero 2011-septiembre 2013, **Capítulo 1**) mostró la presencia habitual de 3 OTUs que pudieron ser identificadas a nivel de género: *Winogradskyella* (EHU10), *Jannaschia* (EHU11) y *Aliiroseovarius* (EHU17). Estos tres géneros mostraron una clara distribución temporal (**Figura 29**). La OTU identificada como *Winogradskyella* (EHU10) apareció exclusivamente en la comunidad de bacterias adheridas a partículas en todas las muestras del estudio plurianual. Además, esta bacteria fue detectada en las muestras de invierno y verano por lo que podemos considerar a esta bacteria como una bacteria generalista temporal. La OTU *Jannaschia* (EHU11) fue detectada en la comunidad de bacterias de vida libre siempre en muestras de invierno, pero nunca en verano, por lo que se consideró una bacteria especialista de invierno. Por último, la OTU *Aliiroseovarius* (EHU17) fue detectada en la comunidad de bacterias de vida libre siempre en muestras de verano, mientras que no apareció en las muestras de invierno. Por lo tanto, se consideró a esta bacteria como especialista de verano.

OTU	Año	Mes												Género	
		E	F	M	A	Ma	J	Ju	Ag	S	O	N	D		
EHU10	2011		■				■		■	■			■		<i>Winogradskyella</i>
	2012	■		■		■	■	■	■				■		
	2013		■	■	■		■	■	■	■					
EHU11	2011		■	■	■										<i>Jannaschia</i>
	2012			■							■				
	2013														
EHU17	2011								■	■					<i>Aliiroseovarius</i>
	2012														
	2013						■	■	■	■					

Figura 29. Detección de las OTUs identificadas como *Winogradskyella* (EHU10) en color verde, *Jannaschia* (EHU11) en color azul y *Aliiroseovarius* (EHU17) en color naranja a lo largo del estudio.

Basándonos en esta información, se adquirieron las bacterias marinas *Winogradskyella jejuensis* (DSM-25330), *Jannaschia helgolandensis* (DSM-14858) y *Aliiroseovarius halocynthiae* (DSM-27840) de la Colección Alemana de Cultivos Tipo (*Deutsche Sammlung von*

Mikroorganismen und Zellkulturen) como representantes para el estudio del efecto de la temperatura sobre bacterias características del sistema.

W. jejuensis es un *Bacteroidetes* bacilo Gram negativo, con una temperatura óptima de crecimiento de 20-25 °C y que presenta actividad leucina arilamidasa y fosfatasa alcalina (Kim y Oh, 2012). *J. helgolandensis*, es una *Alfaproteobacteria* bacilo Gram negativo con una temperatura óptima de crecimiento de 25-30 °C (Wagner-Döbler *et al.*, 2003). *A. halocynthiae*, es una *Alfaproteobacteria* bacilo Gram negativo, con una temperatura óptima de crecimiento a 30 °C y que presenta también actividades hidrolíticas leucina arilamidasa y fosfatasa alcalina (Kim *et al.*, 2012).

2.2 Actividades bacterianas

2.2.1 Comparación de velocidades específicas de las tres bacterias a 12 °C y 20 °C

Se analizaron las velocidades específicas de producción bacteriana ($P_{B_{esp}}$), respiración bacteriana ($R_{B_{esp}}$), de la actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) y de la actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina (FA_{esp}) a dos temperaturas, 12 °C y 20 °C, similares a las presentadas por el sistema en la situación fría y cálida respectivamente. Adicionalmente, se determinaron también la eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB), como indicador de adaptación al medio, y el cociente entre las actividades LAP_{esp} y FA_{esp} , como indicador del cambio en la proporción de las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina.

En la **Tabla 9** se presentan los valores medios obtenidos cuando la temperatura de incubación fue de 12 °C, y que reflejan la capacidad de las tres bacterias para desarrollarse en el sistema acuático bajo unas condiciones de temperatura típicas de la situación invernal. *J. helgolandensis* mostró mayor respiración específica media ($1,51 \pm 0,19 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $p < 0,05$) que *W. jejuensis* ($0,70 \pm 0,09 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y *A. halocynthiae* ($0,65 \pm 0,24 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Aunque *W. jejuensis* mostró valores superiores medios de eficiencia de crecimiento que *J. helgolandensis*, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Del mismo modo, aunque *W. jejuensis* mostró velocidades específicas medias de actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa mayores que las de *J. helgolandensis* y *A. halocynthiae*, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

De modo similar, en la **Tabla 10** se presentan las actividades específicas medias de las tres bacterias cuando se incubaron a una temperatura de 20 °C, representativa de la temperatura del sistema durante la situación estival. *A. halocynthiae* presentó una mayor velocidad específica media de producción que *J. helgolandensis* ($1,72 \pm 0,46 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,63 \pm 0,06 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente; $p < 0,05$) y que *W. jejuensis* ($0,82 \pm 0,13 \text{ fg C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). A su vez, *W. jejuensis*

Tabla 9. Valores medios (negrita) y error estándar (cursiva) de las velocidades específicas de producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB), actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}), y actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina (FA_{esp}) y del cociente LAP_{esp} / FA_{esp} a 12 °C de las tres bacterias.

Temperatura de estudio	12 °C		
Actividad específica	<i>W. jejuensis</i>	<i>J. helgolandensis</i>	<i>A. halocynthiae</i>
PB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,47 ± 0,08	0,54 ± 0,11	0,52 ± 0,13
RB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,70 ± 0,09	1,51 ± 0,19	0,65 ± 0,24
ECB (%)	42,50 ± 2,09	25,83 ± 8,66	38,65 ± 1,77
LAP_{esp} (amol MCA cél ⁻¹ h ⁻¹)	1645,78 ± 782,82	79,47 ± 30,94	21,33 ± 11,78
FA_{esp} (amol MUF cél ⁻¹ h ⁻¹)	23,86 ± 5,52	20,49 ± 7,03	14,59 ± 5,75
LAP_{esp} / FA_{esp} (amol MCA amol MUF ⁻¹)	141,36 ± 85,37	5,63 ± 2,83	1,69 ± 0,55

Tabla 10. Valores medios (negrita) y error estándar (cursiva) de las velocidades específicas de producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB), actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}), y actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina (FA_{esp}) y el cociente LAP_{esp} / FA_{esp} a 20 °C de las tres bacterias.

Temperatura de estudio	20 °C		
Actividad específica	<i>W. jejuensis</i>	<i>J. helgolandensis</i>	<i>A. halocynthiae</i>
PB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,82 ± 0,13	0,63 ± 0,06	1,72 ± 0,46
RB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	4,61 ± 1,28	4,64 ± 0,94	3,74 ± 0,79
ECB (%)	18,78 ± 3,18	9,84 ± 0,92	30,42 ± 7,60
LAP_{esp} (amol MCA cél ⁻¹ h ⁻¹)	3224,79 ± 1174,70	71,83 ± 18,98	48,42 ± 21,25
FA_{esp} (amol MUF cél ⁻¹ h ⁻¹)	72,78 ± 30,66	31,68 ± 8,20	33,59 ± 12,46
LAP_{esp} / FA_{esp} (amol MCA amol MUF ⁻¹)	83,39 ± 38,01	4,84 ± 2,21	2,30 ± 1,35

presentó mayor velocidad específica media de actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa ($3224,79 \pm 1174,70$ amol MCA cel⁻¹ h⁻¹; $p < 0,05$) que las otras dos bacterias ($71,83 \pm 18,98$ amol MCA cel⁻¹ h⁻¹ para *J. helgolandensis* y $48,42 \pm 21,25$ MCA cel⁻¹ h⁻¹ para *A. halocynthiae*). Además, tanto *W. jejuensis* como *A. halocynthiae* presentaron mayores eficiencias medias de crecimiento ($18,78 \pm 3,18$ % y $30,42 \pm 7,60$ % respectivamente; $p < 0,05$) que *J. helgolandensis* ($9,84 \pm 0,92$ %).

La bacteria generalista temporal *W. jejuensis*, presentó a 20 °C valores medios superiores de velocidades específicas de producción (2 veces mayor; $p < 0,05$) y de respiración (7 veces mayor; $p < 0,05$), y una menor eficiencia media de crecimiento (18,78 % vs 42,50 %; $p < 0,05$) que a 12 °C. Además, ambas actividades enzimáticas extracelulares específicas medias presentaron una tendencia a aumentar con la temperatura, pero solo en el caso de la actividad fosfatasa alcalina se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las actividades medias obtenidas a ambas temperaturas ($p < 0,05$). Por último, y como reflejo del mayor aumento en la actividad fosfatasa alcalina que en la actividad aminopeptidasa en *W. jejuensis*, se observó un menor valor medio del cociente LAP_{esp} / FA_{esp} a 20 °C que a 12 °C, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La bacteria *J. helgolandensis* no presentó diferentes velocidades específicas medias de producción a las dos temperaturas, pero si se observaron velocidades específicas medias de respiración 3 veces mayores ($p < 0,05$) a 20 °C que a 12 °C. Esta diferencia en el comportamiento de la producción y respiración específicas provocó una menor eficiencia media de crecimiento ($p < 0,05$) a 20 °C que a 12 °C (9,84 % y 25,83 % respectivamente). Se observó un ligero aumento en la actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina al pasar de 12 °C a 20 °C, si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Por último, la bacteria *A. halocynthiae* presentó velocidades medias específicas superiores de producción (3 veces mayor; $p < 0,05$) y respiración (6 veces mayor; $p < 0,05$) e inferiores eficiencias medias de crecimiento (30,42 % vs 38,65 %) a 20 °C que a 12 °C ($p < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina medias entre ambas temperaturas.

2.2.2 Comparación con la comunidad natural

Aunque conocemos que las tres bacterias estudiadas son abundantes en diferentes situaciones del ciclo anual, no tenemos información cuantitativa sobre su contribución a los procesos que lleva a cabo la comunidad bacterioplanctónica. Por ello, y con la intención de determinar si las bacterias utilizadas en este estudio son buenos modelos representativos de la actividad fisiológica de la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo estacional, se agruparon las bacterias en función del momento de aparición en el sistema acuático. Así, se utilizaron los resultados de las bacterias presentes en invierno (*W. jejuensis* y *J. helgolandensis*) para calcular unos valores representativos de lo que denominamos la “comunidad experimental de invierno”, y se compararon dichos valores con las actividades de las comunidades naturales de invierno, para lo que se utilizaron los valores correspondientes a los meses de octubre a marzo de los años 2011-2013. Para calcular la PB_{esp} , RB_{esp} y ECB de la comunidad se usaron los datos del **Capítulo 1** de la presente tesis, en tanto que los datos de LAP_{esp} se tomaron de Abad (2020) (**Tabla suplementaria 25**). De modo paralelo, se realizó el mismo ejercicio con las bacterias presentes en verano, *W. jejuensis* y *A. halocynthiae*, para componer las actividades específicas

de una “comunidad experimental de verano” que se comparó con las actividades específicas de las comunidades naturales de verano correspondientes a los meses de mayo a agosto, obtenidas como se ha indicado anteriormente.

Esta comparación se presenta en la **Tabla 11**. Los valores medios de las velocidades específicas de producción bacteriana, respiración bacteriana, eficiencia de crecimiento bacteriana y de actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa de la comunidad experimental de invierno no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los respectivos valores medios de la comunidad natural de invierno ($p > 0,05$). Tampoco los valores medios de las velocidades específicas de producción bacteriana, respiración bacteriana, eficiencia de crecimiento bacteriana y de actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa de la comunidad experimental de verano presentaron diferencias estadísticamente significativas con los valores medios de la comunidad natural de verano ($p > 0,05$). Desafortunadamente, ni en el trabajo de Abad (2020) ni en el estudio plurianual desarrollado en el **Capítulo 1** de esta tesis se cuantificó la actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina de la estación de muestreo de Armintza, por lo que no se pudo realizar la comparación de esta actividad.

Tabla 11. Valores medios (negrita) y error estándar (cursiva) de las velocidades específicas de producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) y la actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) de la comunidad experimental de invierno (W + J) donde W hace referencia a *W. jejuensis* y J a *J. helgolandensis*; de la comunidad experimental de verano (W + A) donde W hace referencia a *W. jejuensis* y A a *A. halocynthiae* y de las comunidades bacterianas naturales de invierno y verano.

Temperatura de estudio	12 °C	12,4-18,3 °C (14,2 °C)	20 °C	15,3-21,0 °C (18,2 °C)
Actividad específica	Comunidad experimental de invierno (W + J)	Comunidad natural de invierno	Comunidad experimental de verano (W + A)	Comunidad natural de verano
PB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	0,51 ± 0,03	1,39 ± 0,26	1,27 ± 0,45	4,27 ± 1,71
RB_{esp} (fg C cél ⁻¹ h ⁻¹)	1,11 ± 0,40	3,04 ± 0,52	4,17 ± 0,44	6,32 ± 2,09
ECB (%)	34,16 ± 8,33	31,04 ± 1,61	24,60 ± 5,82	37,98 ± 2,29
LAP_{esp} (amol MCA cél ⁻¹ h ⁻¹)	862,62 ± 783,15	164,45 ± 18,20	1636,60 ± 1588,18	319,30 ± 83,76

2.3 Sensibilidad de la actividad bacteriana a la temperatura

Se realizaron 7 experimentos con cada bacteria, en los que se determinó la influencia de la temperatura en la producción, respiración y actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina específicas. Ello suma un total de 84 análisis, de los que en 67 casos (80 %) el ajuste al modelo de la Teoría Metabólica de la Ecología (Brown *et al.*, 2004) tuvo una significación de $p < 0,05$ (rho de Spearman), por lo que fueron utilizados para desarrollar el análisis de sensibilidad a la temperatura. Estos resultados de sensibilidad a la temperatura, expresados como energía de activación (E_a), se presentan en la **Tabla 12**. Los 17 casos restantes (20 %) se eliminaron del análisis por no presentar un ajuste adecuado ($p > 0,05$).

Tabla 12. Energías de activación (E_a) de las actividades específicas producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), y actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) y fosfatasa alcalina (FA_{esp}) de las tres bacterias.

Experimento	E_a (eV)											
	<i>W. jejuensis</i>				<i>J. helgolandensis</i>				<i>A. halocynthiae</i>			
	PB_{esp}	RB_{esp}	LAP_{esp}	FA_{esp}	PB_{esp}	RB_{esp}	LAP_{esp}	FA_{esp}	PB_{esp}	RB_{esp}	LAP_{esp}	FA_{esp}
1		1,54	0,28	0,47	0,33	0,62	0,21	0,41				
2		0,95	0,31	0,54	0,20	0,63	0,21	0,35		1,08	0,16	0,60
3	0,72	1,39	0,51	0,33	0,31	0,71	0,17	0,35	1,20		0,36	0,65
4	0,48	1,44	0,67	0,38	0,39	0,99	0,36	0,15	1,16	1,79	0,49	0,41
5	0,68	1,21	0,32		0,30	1,22	0,52	0,29	1,00	1,49	0,58	0,92
6	0,67	1,49	0,50		0,44			0,43	0,79		0,68	
7	0,25	0,91	0,30	0,39	0,46	1,01		0,4	0,77	1,03		

La sensibilidad media a la temperatura de las actividades específicas de cada bacteria se presenta en la **Figura 30**. La actividad que mostró una mayor sensibilidad media a la temperatura fue la respiración, ya que la energía de activación media de la respiración bacteriana fue, en las tres bacterias, superior ($p < 0,05$) a las energías de activación medias de la producción bacteriana (entre 1,5 y 2,5 veces mayor) y de las dos actividades enzimáticas extracelulares (entre 2 y 3 veces mayor).

Se detectó una notable diferencia en la sensibilidad a la temperatura de las dos bacterias especialistas temporales. Así, la sensibilidad a la temperatura fue superior en *A. halocynthiae* que en *J. helgolandensis* ($p < 0,05$) en producción bacteriana (3 veces), respiración bacteriana (2 veces) y actividad hidrolítica fosfatasa alcalina (2 veces). Por otra parte, la bacteria generalista temporal *W. jejuensis* presentó una sensibilidad a la temperatura en sus actividades intermedia respecto a las otras dos bacterias: mayores valores de energía de activación ($p < 0,05$) que *J. helgolandensis* para la producción y respiración bacterianas, y menores valores de

energía de activación que *A. halocynthiae* para la producción bacteriana ($p < 0,05$) y la actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina ($p = 0,05$).

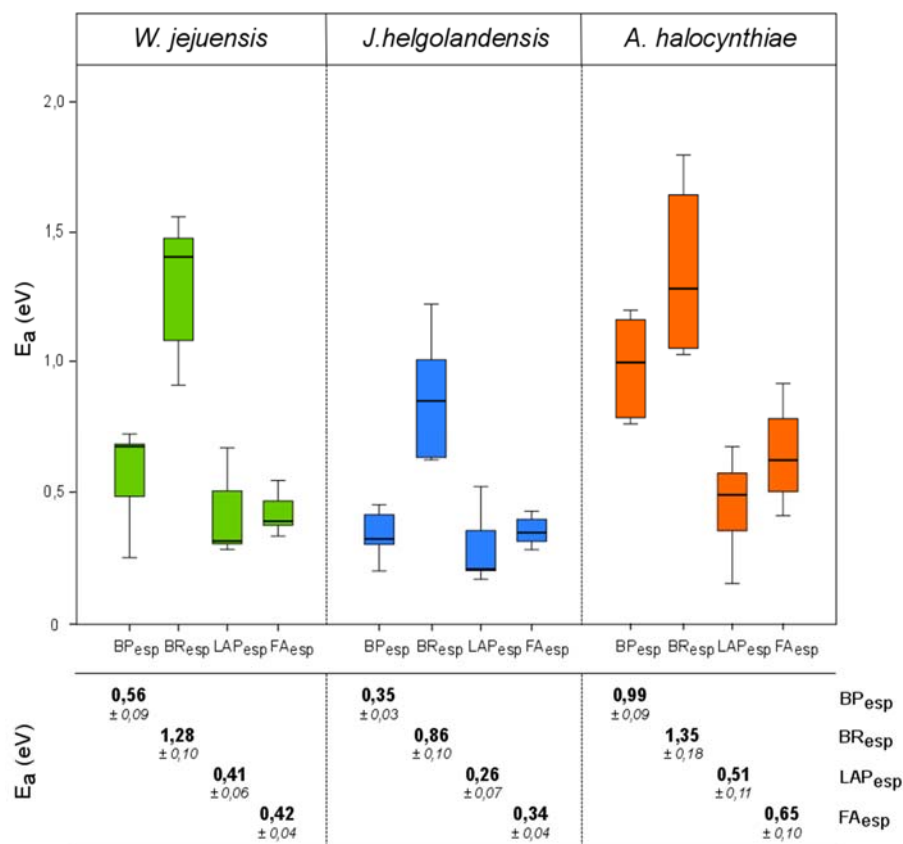


Figura 30. Diagrama de cajas de los valores de energía de activación (E_a) de las actividades específicas producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), y actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) y fosfatasa alcalina (FA_{esp}) de las tres bacterias. *W. jejuensis* está representada en color verde, *J. helgolandensis* en azul y *A. halocynthiae* en naranja. Los bordes inferiores y superiores de las cajas representan el 1^{er} y 3^{er} cuartil respectivamente, y la línea horizontal dentro de la caja indica la mediana. Las barras representan el error estándar, y los bordes de las barras de error vertical inferior y superior indican los valores mínimo y máximo, respectivamente. En la tabla de la parte inferior se muestran los valores medios (negrita) y el error estándar (cursiva) de la sensibilidad a la temperatura de cada actividad para cada bacteria.

3 Discusión

En el **Capítulo 1** se analizó la respuesta microbiana a los cambios ambientales en las aguas superficiales costeras del Cantábrico oriental durante tres años mediante el análisis de un amplio conjunto de variables ambientales junto con la densidad, el metabolismo y la composición de la comunidad bacteriana. Los resultados mostraron un ciclo estacional recurrente que consta de dos situaciones estables: invierno, desde octubre a marzo, caracterizado por temperatura ($14,2 \pm 0,9$ °C) y actividad metabólica baja; y verano, desde mayo a agosto, caracterizado por temperatura ($18,2 \pm 1,3$ °C) y actividad metabólica alta. Además, los análisis tanto a largo plazo (**Capítulo 1**) como a corto plazo (**Capítulo 2**) han demostrado el efecto de la temperatura en la composición de la comunidad bacteriana.

Con el fin de estudiar en detalle la influencia de la temperatura en el bacterioplancton marino, se escogieron como miembros representativos de la comunidad bacteriana tres bacterias que fueron detectadas recurrentemente en la estación de Armintza, y se analizaron sus actividades específicas (producción, respiración, y actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina) a 2 temperaturas, 12 °C y 20 °C, similares a las temperaturas medias del sistema marino en invierno y verano respectivamente. Además, se analizó la sensibilidad a la temperatura de estos procesos mediante los valores de energía de activación (E_a), obtenidos a partir de la determinación de dichas actividades a cuatro temperaturas que cubren el rango de temperaturas que se dan en este sistema acuático, con el fin de caracterizar la respuesta de estas tres bacterias frente a un potencial aumento de temperatura del sistema derivado de la actual situación de calentamiento global.

El análisis de DGGE sobre la composición de la comunidad bacteriana de la estación costera de Armintza de la serie plurianual (febrero 2011-septiembre 2013, **Capítulo 1**) identificó tres bacterias marinas que mostraron una presencia habitual y que pudieron ser identificadas a nivel de género. Así *Winogradskyella* se detectó en las muestras de invierno y verano, *Jannaschia* solo se detectó en las muestras de invierno y *Aliiroseovarius* fue detectada en exclusiva en las muestras de verano. Basándonos en esta información, se adquirieron las bacterias marinas (*Winogradskyella jejuensis*, *Jannaschia helgolandensis* y *Aliiroseovarius halocynthiae*) de la Colección Alemana de Cultivos Tipo, y se utilizaron para el estudio del efecto de la temperatura sobre bacterias características del sistema. Aunque es cierto que son bacterias de colección, se asume que tienen un comportamiento similar a las bacterias detectadas en Armintza, para poder extrapolar los resultados obtenidos en este trabajo al medio natural.

En la estación costera de Armintza, las bacterias *Jannaschia* y *Aliiroseovarius*, ambas pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*, se detectaron en exclusiva en la comunidad de bacterias de vida libre. En cambio, *Winogradskyella*, perteneciente a la familia *Flavobacteriaceae*, se detectó en exclusiva en la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Como en el presente estudio se trabajó con las tres bacterias en microcosmos en los que las bacterias estaban suspendidas en el agua, en el caso concreto de *Winogradskyella*, los resultados obtenidos indican una potencialidad de su respuesta a los cambios de temperatura. Es cierto que lo más adecuado hubiera sido elegir una bacteria generalista temporal de la comunidad de bacterias de vida libre, pero basándonos en la información de las OTUs identificadas, solo se pudo identificar la bacteria *Pelagibacter* a nivel de género y se detectaron OTUs pertenecientes a este género tanto como generalistas como especialistas, por lo que para poder extraer conclusiones sobre el efecto de la temperatura en la aparición temporal de las bacterias se decidió optar por *Winogradskyella*.

Cuando se analizó la actividad de las bacterias a las temperaturas medias habituales en invierno y en verano en la estación costera de Armintza, tanto *W. jejuensis* como *A. halocynthiae* presentaron valores de producción y respiración específicas superiores con la temperatura de verano que con la temperatura similar a la de invierno. Sin embargo, *J.*

helgolandensis no presentó diferentes velocidades específicas de producción en las dos temperaturas estudiadas, aunque presentó valores específicos de respiración mayores con la temperatura de verano que con la de invierno. Otros estudios realizados en el Mar Cantábrico central y oriental (Huete-Stauffer *et al.*, 2015; Morán y Scharek, 2015) destacaron el efecto positivo de la temperatura del agua de mar sobre la actividad microbiana heterotrófica. El calentamiento del agua normalmente incrementa el metabolismo bacteriano, posiblemente debido a la influencia directa de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas que componen el metabolismo bacteriano (Fuhrman y Azam, 1983; Kirchman *et al.*, 2005; López-Urrutia y Morán, 2007). Tanto en estudios *in situ* como en laboratorio, se ha observado que el aumento de la temperatura provoca mayores tasas específicas de crecimiento (White *et al.*, 1991), producción secundaria (Rivkin *et al.*, 1996), velocidades de respiración (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2007), y actividades hidrolíticas de leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina (Ayo *et al.*, 2017).

Comparando las tres bacterias, tanto la bacteria generalista *W. jejuensis* como la bacteria especialista de verano *A. halocynthiae* presentaron mayores eficiencias de crecimiento que la bacteria especialista de invierno *J. helgolandensis* a las dos temperaturas. En especial, resulta destacable la muy baja eficiencia de crecimiento bacteriana que mostró *J. helgolandensis* en verano, inferior al 10 %, frente a los valores de 19 % y 30 % de *W. jejuensis* y *A. halocynthiae* respectivamente. Esta podría ser una de las razones por las cuales no se detecta la bacteria *J. helgolandensis* durante el verano en el medio natural, ya que las otras dos bacterias muestran mayor velocidad de producción y eficiencia de crecimiento bacteriana que las hace relativamente más abundantes, y por tanto, detectables mediante DGGE, que la bacteria especialista de invierno, que no pudo ser detectada en verano mediante esta técnica.

Estos resultados indicarían que ciertas bacterias, como *A. halocynthiae* y *W. jejuensis*, son capaces de obtener una gran ventaja de su mejor respuesta a las altas temperaturas. En el caso de *A. halocynthiae*, la ventaja procede de su elevada velocidad de crecimiento a esa temperatura, ya que presentó velocidades específicas de producción mayores que las otras dos bacterias. En el caso de *W. jejuensis*, la ventaja puede derivar de su muy elevada actividad leucina aminopeptidasa a la temperatura de verano, muy superior a la de las otras dos bacterias, y que indica una gran capacidad de hidrólisis de material proteico y otros compuestos nitrogenados orgánicos de alto peso molecular. *W. jejuensis* pertenece al filo *Bacteroidetes*, un grupo de bacterias conocidas por ser grandes productoras de enzimas extracelulares (Cottrell y Kirchman, 2000) y que ha sido catalogado como estrategia r, es decir, asociado con un rápido crecimiento y con una elevada capacidad de degradación de compuestos de alto peso molecular como pueden ser las proteínas (Arnosti *et al.*, 2012; Teeling *et al.*, 2012).

Bajo condiciones de baja temperatura típicas de la situación invernal, *J. helgolandensis* mostró mayor respiración específica que *W. jejuensis* y *A. halocynthiae*, lo que provocó que su eficiencia de crecimiento fuese, también a bajas temperaturas, menor que la de las otras dos bacterias. Sin embargo, aunque bajo, en invierno este valor llega a 25,83 %, lo que

probablemente le permita a *J. helgolandensis* mantenerse en el sistema en una densidad lo suficientemente alta como para poder ser detectada mediante DGGE. No obstante, resulta destacable que *A. halocynthiae* no fuese detectable en invierno cuando mostró una elevada eficiencia de crecimiento a estas bajas temperaturas, ya que alcanza un valor de 38,65 %, superior al de *J. helgolandensis* y similar al valor medio de 31,04 % mostrado por la comunidad natural en el sistema acuático. En este sentido, es evidente que deben existir en el sistema natural otros factores que provoquen que *A. halocynthiae* no sea abundante en el sistema en la situación invernal.

De hecho, si bien es cierto que en nuestra estación costera de Armintza se ha observado el efecto de la temperatura en el cambio de la composición de la comunidad (**Capítulos 1 y 2**), otras variables además de la temperatura como lo son los afloramientos fitoplanctónicos, el tipo de materia orgánica o la mortalidad por depredación y/o lisis vírica (**Capítulos 1 y 2**), también provocan la aparición y/o desaparición temporal de las bacterias y por tanto un cambio en la composición de la comunidad. Otros trabajos también han observado el efecto en la composición de la comunidad de otras variables como la disponibilidad de materia orgánica (Schauer *et al.*, 2003), los afloramientos fitoplanctónicos (Fandino *et al.*, 2001; Needham y Fuhrman, 2016; Baña *et al.*, 2020) o la mortalidad por lisis vírica o la depredación por nanoflagelados (Šestanović *et al.*, 2004; Suttle, 2007; Bettarel *et al.*, 2016).

Con la intención de determinar si las bacterias utilizadas en este estudio son buenos modelos representativos de la actividad fisiológica de la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo estacional, se agruparon las bacterias en función del momento de aparición en el sistema acuático: *W. jejuensis* y *J. helgolandensis* como representantes de una “comunidad experimental de invierno” y *W. jejuensis* y *A. halocynthiae* como representantes de una “comunidad experimental de verano”. Los valores medios de las velocidades específicas de producción, respiración, eficiencia de crecimiento y actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa de la “comunidad experimental de invierno” no difirieron de los valores específicos de dichas actividades de la comunidad natural de invierno, y tampoco lo hicieron los valores de la “comunidad experimental de verano” frente a los de la comunidad natural de verano, lo que apoya la elección de estas tres bacterias como buenos modelos fisiológicos y representativos de la comunidad bacteriana a lo largo del ciclo estacional.

El análisis de la sensibilidad a la temperatura de los diferentes componentes de la comunidad bacterioplanctónica puede ayudar a entender los cambios de composición que se producen durante el ciclo anual. Hay que señalar que en trabajos previos nunca se ha analizado la sensibilidad a la temperatura de la actividad metabólica de especies bacterianas marinas, y que los escasos estudios publicados hasta ahora se han llevado a cabo con la comunidad bacterioplanctónica natural o con los grandes grupos filogenéticos que la componen (Arandia-Gorostidi *et al.*, 2017; Huete-Stauffer *et al.*, 2018).

Las tres bacterias mostraron diferente grado de sensibilidad a la temperatura en los distintos procesos analizados. La Teoría Metabólica de la Ecología (Brown *et al.*, 2004) predice un aumento de las tasas metabólicas con la temperatura en diferentes organismos (López-Urrutia *et al.*, 2006), aumento definido por un valor medio de energía de activación para el metabolismo heterotrófico de 0,65 eV (Gillooly *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004). Sin embargo, este valor medio de energía de activación, considerado como teórico, interespecífico y global (Dell *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2019), deriva de bases de datos que no recogen sistemáticamente la información referida a las comunidades bacterianas. Por ejemplo, Smith *et al.* (2019) revisaron la energía de activación de la respiración basándose en una base de datos global de curvas de rendimiento térmico de bacterias, y observaron que la sensibilidad térmica media de la respiración bacteriana fue superior a la propuesta por la Teoría Metabólica de la Ecología, por lo que concluyeron que las bacterias operaban bajo diferentes restricciones térmicas que los eucariotas más complejos.

Nuestros resultados muestran valores muy distintos de energía de activación para los distintos procesos estudiados en cada una de las tres bacterias. A pesar de que los valores de energía de activación obtenidos en este trabajo distan del valor teórico de 0,65 eV, sí que concuerdan con los valores encontrados por otros autores para distintas actividades metabólicas bacterianas, tal y como se muestra en la **Tabla 13**. Por ejemplo, la energía de activación media de producción de *W. jejuensis* es similar a la energía de activación media cuantificada para *Bacteroidetes* por Arandia-Gorostidi *et al.* (2017). En el mismo trabajo determinaron valores de energía de activación media para *Rhodobacteracea*, que fueron superiores a los obtenidos aquí para *J. helgolandensis* e inferiores a los observados para *A. halocynthiae*. Sin embargo, las tres bacterias muestran valores de energías de activación para la producción dentro de lo observado por Morán *et al.* (2017). En cuanto a los valores de energía de activación de respiración, las tres bacterias mostraron valores superiores al valor teórico, pero similares a los detectados en el Océano Atlántico por Regaudie-de-Gioux y Duarte (2012) y García-Corral *et al.* (2014). Aunque son pocos los trabajos que han determinado la energía de activación en el medio marino de las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina (Vetter y Deming, 1994; Piontek *et al.*, 2014; Ayo *et al.*, 2017), las tres bacterias estudiadas en este trabajo muestran valores dentro del rango detectado por Ayo *et al.* (2017) para las dos actividades enzimáticas extracelulares en un muestreo extensivo realizado en el océano global. Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de los datos sobre la energía de activación están calculados sobre comunidades, por lo que es difícil comparar nuestros valores calculados en cultivos puros, ya que el dato global comunitario puede enmascarar la sensibilidad a la temperatura propia de cada componente de esa comunidad.

Tabla 13. Recopilación de las estimaciones de energías de activación (E_a (eV)) bacteriana de la literatura para las distintas actividades bacterianas: producción, respiración, actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina. Se han sombreado en gris los valores obtenidos en este estudio.

Proceso	E_a (eV)	Microorganismos	Sistema	Referencia
Producción bacteriana	0,12 - 3,25	Bacterioplancton	Epipelágico Océanos Polares	Kirchman <i>et al.</i> (2009)
	1,24	Bacterioplancton	Epipelágico Mar Báltico	Vaquero-Sunyer <i>et al.</i> (2015)
	0,37	Bacterioplancton	Epipelágico Océano global	Lønborg <i>et al.</i> (2016)
	0,46 - 3,41	Bacterioplancton	Epipelágico Océanos Atlántico, Índico y Pacífico	Morán <i>et al.</i> (2017)
	0,62	<i>Rhodobacteraceae</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Arandia-Gorostidi <i>et al.</i> (2017)
	0,44	<i>Bacteroidetes</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Arandia-Gorostidi <i>et al.</i> (2017)
	0,56	<i>W. jejuensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,35	<i>J. helgolandensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
Respiración bacteriana	0,99	<i>A. halocynthiae</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,59	Bacterioplancton	Epipelágico Entorno marino incluido costa	López-Urrutia y Morán (2007)
	0,57-0,59	Bacterioplancton	Pelágico Océano global	Yvon-Durocher <i>et al.</i> (2012)
	0,92	Bacterioplancton	Eufótico Océano Atlántico	Regaudie-de-Gioux y Duarte (2012)
	1,45	Bacterioplancton	Microcosmos experimentales Océano Atlántico	García-Corral <i>et al.</i> (2014)
	0,88	Bacterioplancton	Compilación datos Océano global	Smith <i>et al.</i> (2019)
	1,28	<i>W. jejuensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,86	<i>J. helgolandensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
1,35	<i>A. halocynthiae</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo	

Tabla 13. (continuación).

Proceso	E _a (eV)	Microorganismos	Sistema	Referencia
Leucina amino-peptidasa	-0,15-1,15	Bacterioplancton	Pelágico Polinia Océano Ártico	Vetter y Deming (1994)
	1,50-15,20	Bacterioplancton	Superficie Océano Ártico	Piontek <i>et al.</i> (2014)
	0,08-0,49	Bacterioplancton	Superficie Océanos Atlántico, Índico y Pacífico	Ayo <i>et al.</i> (2017)
	0,41	<i>W. jejuensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,26	<i>J. helgolandensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,51	<i>A. halocynthiae</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
Fosfatasa alcalina	0,05-0,36	Bacterioplancton	Superficie Océanos Atlántico, Indico y Pacífico	Ayo <i>et al.</i> (2017)
	0,42	<i>W. jejuensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,34	<i>J. helgolandensis</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo
	0,65	<i>A. halocynthiae</i>	Microcosmos experimentales Golfo de Vizcaya	Este trabajo

La sensibilidad a la temperatura de la respiración de las tres bacterias fue mayor que la de la producción o las de las actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina. Los estudios sobre la respiración bacteriana en sistemas costeros templados generalmente muestran una relación temperatura-respiración positiva, que a menudo es más robusta que la observada para la producción bacteriana, y menos susceptible a la influencia de otras condiciones ambientales (Iturriaga y Hoppe, 1977; Sampou y Kemp, 1994; Pomeroy *et al.*, 1995). Por ejemplo, en un estudio estacional llevado a cabo entre 2005 y 2008 en Mallorca (España) en el que la temperatura superficial del agua varió entre 14,4 °C y 28,2 °C, Kritzberg *et al.* (2010) detectaron una relación positiva significativa de la producción y la respiración bacteriana con la temperatura *in situ* y concluyeron que, a pesar de que la temperatura afectaba a los dos parámetros, la respiración bacteriana estaba más influenciada por la temperatura que la producción bacteriana. De modo similar, Vaquer-Sunyer *et al.* (2015) también observaron que el aumento de temperatura en aguas costeras del Mar Báltico potenciaba en mayor medida el proceso de respiración que el de producción. Aun así, hay otros estudios que han observado lo contrario, como Fuentes *et al.* (2012) en aguas costeras del norte de Chile, donde observaron que en el verano de 2007 el aumento de producción de carbono para nueva biomasa ante el aumento de temperatura fue mayor que el de la respiración.

Nuestros resultados indican que la respiración está más fuertemente influenciada por la temperatura que el resto de procesos bacterianos analizados, y sugieren que el calentamiento de la superficie del Mar Cantábrico oriental podría provocar un posible efecto de retroalimentación positiva en el cambio climático al liberar una mayor cantidad de carbono en forma de CO₂ a la atmósfera en vez de incorporar el carbono para la producción de nueva biomasa bacteriana.

El aumento del CO₂ atmosférico se ha asociado a una cascada de consecuencias, algunas de las cuales inciden directamente en la propia actividad microbiana marina. Entre ellas, una acidificación del agua de la superficie del océano (Caldeira y Wickett, 2005; Orr *et al.*, 2005) que afectará a muchos procesos enzimáticos bacterianos involucrados en la utilización de compuestos orgánicos. Así, se conoce que la acidificación aumenta las velocidades de hidrólisis de material de alto peso molecular rico en nitrógeno (Grossart *et al.*, 2006b), de polisacáridos (Piontek *et al.*, 2010) y carbohidratos y lípidos (Maas *et al.*, 2013), lo que conllevará alteraciones en las tasas de regeneración de carbono, nitrógeno y fósforo de los sistemas marinos.

Por otra parte, y siempre en un contexto de aumento de la temperatura superficial del océano, la mayor sensibilidad a la temperatura de la respiración frente a la producción detectada en las tres bacterias tendría como consecuencia la disminución de su eficiencia de crecimiento, un efecto que ya ha sido puesto de manifiesto por varios autores (Rivkin y Legendre, 2001; Apple *et al.*, 2006; Berggren *et al.*, 2010). Rivkin y Legendre (2001) realizaron una revisión exhaustiva sobre la eficiencia de crecimiento de las comunidades bacterioplanctónicas de aguas costeras de océanos polares, templados y tropicales, y detectaron una tendencia de la disminución de la eficiencia de crecimiento con el aumento de la temperatura. Además, si entendemos la eficiencia de crecimiento bacteriana como indicador de adaptación de las bacterias a la situación ambiental (Baña *et al.*, 2020), los resultados del presente estudio indicarían que el aumento de temperatura conduciría a unas comunidades bacterianas menos eficientes y peor adaptadas.

Las tres bacterias mostraron diferente grado de sensibilidad a la temperatura, por lo que su respuesta al aumento de temperatura será diferente. Ante un escenario de calentamiento global la producción de nueva biomasa bacteriana se acelerará en las tres bacterias, pero de forma diferente entre ellas, provocando un mayor crecimiento de unas frente a otras y con ello desajustes en la composición de la comunidad bacteriana con respecto a la situación actual.

La sensibilidad a la temperatura de la producción, respiración y actividad enzimática extracelular fosfatasa alcalina fue superior en la *Alfaproteobacteria A. halocynthiae*, que en la *Alfaproteobacteria J. helgolandensis*, lo que refuerza la idea de una mejor adaptación fisiológica a temperaturas altas de *A. halocynthiae*, predominante de la situación estival del sistema. Su mayor sensibilidad a la temperatura le permitiría proliferar más que otras bacterias y obtener ventaja ante el aumento de temperatura que se produce en el paso de situación fría a situación

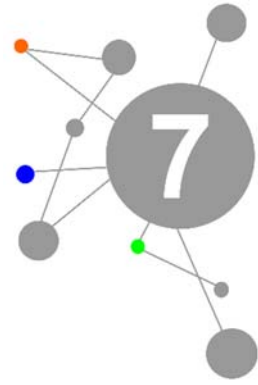
cálida. Por el contrario, *J. helgolandensis* fue la bacteria que mostró la menor sensibilidad a la temperatura, resultado que explica la ausencia de *J. helgolandensis* en la situación cálida. Ante una situación de calentamiento del océano, esta bacteria podría ser superada cuantitativamente por otras bacterias más proclives a desarrollarse fácilmente a temperaturas más elevadas, y entrar a formar parte de la biosfera rara (Pedrós-Alió, 2006, 2012).

Por último, los resultados muestran una respuesta compensatoria parcial conjunta por parte de estas tres bacterias respecto al efecto de la temperatura en la hidrólisis de materia orgánica de alto peso molecular. Se observó una tendencia a disminuir el cociente LAP_{esp} / FA_{esp} con el aumento de la temperatura en *W. jejuensis* y en menor medida en *J. helgolandensis*, mientras que esta tendencia fue inversa en *A. halocynthiae*. Debido al calentamiento del océano, en invierno, cuando *W. jejuensis* y *J. helgolandensis* están presentes, se acelerará la hidrólisis de fosfatos orgánicos en mayor medida que la hidrólisis de carbohidratos y proteínas, mientras que en verano cuando está presente *A. halocynthiae*, ese aumento de la hidrólisis de fosfatos será compensada parcialmente ya que *A. halocynthiae* aumentará la hidrólisis de compuestos nitrogenados. Por lo tanto, se ven tendencias contrapuestas en esta pequeña muestra de análisis en estas tres especies modelo. Esto podría provocar cambios estequiométricos en la composición de la materia orgánica, sobre todo en invierno, ante un escenario de calentamiento global, ya que las velocidades de hidrólisis de las enzimas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina influyen en los ciclos biogeoquímicos marinos del nitrógeno (N) y fósforo (P).

De esta manera, se pone de manifiesto otro posible efecto del calentamiento global sobre las comunidades bacterianas, su funcionamiento y consecuentemente sobre los ciclos biogeoquímicos del océano. La consiguiente alteración de nutrientes puede provocar un efecto cascada en los procesos vitales 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 aumento de la temperatura. Sin embargo, no hay que olvidar la capacidad de las comunidades bacterianas para adaptarse a los posibles desajustes en el ratio C : N : P de la materia orgánica disponible (Mooshammer *et al.*, 2014), mediante mecanismos como el incremento de la producción de fosfatasa alcalina extracelular (Vidal *et al.*, 2003), la reducción de la demanda celular en nitrógeno y fósforo (Bertilsson *et al.*, 2003; Levitan *et al.*, 2010) o la regulación de la eficiencia de uso de los nutrientes (del Giorgio y Cole, 1998).

Nuestros resultados, junto con los obtenidos recientemente por otros autores (Arandia-Gorostidi *et al.*, 2017; Martínez-García y Pinhassi, 2018), revelan la importancia del estudio de la sensibilidad a la temperatura de grupos filogenéticos y especies concretas de la comunidad bacterioplanctónica de los sistemas marinos. Estos estudios pueden ayudar a cumplir el objetivo de cuantificar, con la mayor precisión posible, los efectos del calentamiento global y a predecir futuros cambios en la composición de las comunidades bacterianas y los procesos que

estas llevan a cabo, en la estequiometría de la materia orgánica utilizable y, en definitiva, en el funcionamiento del océano y del planeta.



DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo principal de esta tesis es obtener conocimiento sobre la composición de la comunidad de las bacterias de vida libre y adheridas a partículas de aguas superficiales del Mar Cantábrico oriental, así como comprender los factores que influyen en su variabilidad. Para ello, se exploró la estacionalidad de la composición y diversidad filogenéticas de las comunidades bacterianas de vida libre y adheridas a partículas en un contexto plurianual (**Capítulo 1**). Posteriormente se caracterizó la variabilidad de la composición filogenética de estas dos comunidades en una escala temporal corta (**Capítulo 2**). Por último, y tras observar la importancia de la temperatura como factor regulador de la composición de la comunidad bacteriana, se estudió la sensibilidad a la temperatura de tres bacterias modelo representativas de la comunidad bacteriana natural de este sistema marino (**Capítulo 3**).

Los resultados obtenidos en los **Capítulos 1 y 2** mostraron que las aguas superficiales de la estación costera de Armintza en el Mar Cantábrico oriental presentaron dos situaciones estacionales claramente diferenciadas, invierno (octubre-febrero) y verano (mayo-agosto). El invierno estaba caracterizado por menores temperaturas, minutos de luz y densidad de cianobacterias (*Synechococcus*) y mayores concentraciones de nitratos y clorofila *a* que el verano. Además, cada situación presentó un clado filogenético bacteriano predominante distinto, donde *Alfaproteobacteria* dominó en invierno y *Bacteroidetes* en verano. Estas situaciones estaban separadas por dos momentos de transición, el primero en abril, como consecuencia del afloramiento de diatomeas y el segundo en septiembre, como consecuencia del crecimiento masivo de la cianobacteria *Synechococcus*, en los que ocurrieron importantes descensos de la diversidad taxonómica bacteriana y la eficiencia de crecimiento bacteriana. En el sur del Golfo de Vizcaya han sido detectados afloramientos de diatomeas a finales de invierno o principios de la primavera por otros autores (Morozov *et al.*, 2013; Smythe-Wright *et al.*, 2014; Baña *et al.*, 2020) así como afloramientos fitoplanctónicos procarióticos (Morán, 2007; Calvo-Díaz *et al.*, 2008). Además, durante estos momentos de transición se observó la alternancia entre *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes*. La capacidad de adaptación y grado de especialización en el uso de diferentes tipos de materia orgánica promovió la alternancia entre estos dos grupos filogenéticos. La nueva materia orgánica disuelta compleja liberada principalmente por diatomeas durante el afloramiento fitoplanctónico anterior a la transición de abril favoreció la expansión de *Bacteroidetes*, especializado en la degradación inicial de biopolímeros complejos en los ambientes marinos (Kirchman, 2002; Bauer *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008). Por el contrario, la excreción de sustratos altamente lábiles excretados durante el afloramiento fitoplanctónico procariótico (Biddanda y Benner, 1997; Bertilsson *et al.*, 2005), ocurrido antes de la transición de septiembre, impulsó el aumento de la importancia relativa de la clase *Alfaproteobacteria*, mejor adaptada a asimilar compuestos de bajo peso molecular y fáciles de degradar (Teeling *et al.*, 2012).

El muestreo intensivo analizado en el **Capítulo 2**, mostró que la situación de transición era una situación inestable caracterizada por la desaparición y aparición de ciertas OTUs, y un periodo de alta dispersión en la diversidad de las tres comunidades estudiadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta), por lo que era la situación donde se daba la principal transformación

taxonómica y fisiológica anual de la comunidad bacteriana. Además, esta situación mostró los valores más bajos de eficiencia de crecimiento bacteriana. Si entendemos la eficiencia de crecimiento como propiedad integradora de la comunidad (Baña *et al.*, 2020), estos resultados indican que el cambio ambiental producido por el afloramiento fitoplanctónico estaría fuera del rango de adaptación de los componentes de la comunidad bacteriana, y por lo tanto la comunidad bacteriana de transición no estaría bien adaptada a las condiciones ambientales.

Los resultados de los **Capítulos 1 y 2** mostraron la coexistencia de tres comunidades bacterianas con diferente estilo de vida en aguas superficiales de Arminza: la comunidad de bacterias adheridas a partículas, la comunidad de bacterias de vida libre y la comunidad mixta. Su composición taxonómica fue muy específica del hábitat colonizado, siendo el 81-82 % de las OTUs más abundantes específicas de uno solo de los hábitats. La composición filogenética de cada una de las comunidades mostró una marcada estacionalidad, caracterizada por la presencia de OTUs especialistas de invierno que aparecían mayoritaria o exclusivamente durante invierno, y especialistas de verano que aparecían mayoritaria o exclusivamente en verano. Sin embargo, también se detectaron OTUs generalistas, en distinta proporción en cada comunidad, que fueron abundantes durante todo el año. Además, el mayor porcentaje de correlaciones retrasadas en el tiempo de las bacterias adheridas a partículas con las variables abióticas del sistema mostró que las partículas marinas constituían un hábitat que amortiguaba el efecto de las condiciones ambientales en la variabilidad de la composición filogenética de esta comunidad. Estos resultados pueden ser debido a que las partículas proporcionan un ambiente estable (Grossart *et al.*, 2003) y rico en nutrientes (Aldredge y Cohen, 1987; Stocker, 2012; Ganesh *et al.*, 2014).

Tanto el estudio estacional a largo plazo como el estudio intensivo a corto plazo (**Capítulo 1 y Capítulo 2** respectivamente) mostraron que los factores ambientales bióticos y abióticos que más influyeron en la regulación de la composición taxonómica de la comunidad de bacterias adheridas a partículas fueron la concentración de clorofila *a* (indicador del afloramiento fitoplanctónico eucariótico), la depredación por los nanoflagelados heterótrofos y la lisis vírica. La mayoría de las partículas orgánicas que se encuentran en la zona superficial de la columna de agua son de origen fitoplanctónico (Meon y Kirchman, 2001; Grossart *et al.*, 2007), y son colonizadas por especialistas que son capaces de degradar hasta cierto punto la partícula en base a su potencial enzimático y a la labilidad de la materia orgánica (DeLong *et al.*, 1993; Bižić-Ionescu *et al.*, 2014; Kellogg y Deming, 2014). En este sentido, se ha detectado que las bacterias adheridas a partículas muestran sistemas de transporte de nutrientes orgánicos con baja afinidad, que caracterizan a una comunidad bacteriana adaptada a la alta concentración de sustratos (Ayo *et al.*, 2001). Así, debido a la elevada actividad enzimática de las bacterias que residen en las partículas se pueden liberar compuestos de bajo peso molecular al agua circundante, creando puntos calientes de alta actividad microbiana a su alrededor (Azam y Malfatti, 2007). También se ha observado que varios tipos de partículas presentes en los sistemas marinos pueden contener abundantes protozoos (Caron *et al.*, 1982), concretamente especies de flagelados y ciliados especializados en la depredación de bacterias asociadas a

partículas (Caron, 1987; Sibbald y Albright, 1988; Artolozaga *et al.*, 2002). A su vez, se ha visto que los virus pueden colonizar intensamente partículas de distinta naturaleza, como la nieve marina (Riemann y Grossart, 2008) o las TEPs (Mari *et al.*, 2007) e infectar las bacterias que colonizan este tipo de partículas (Mari *et al.*, 2007; Turner, 2015).

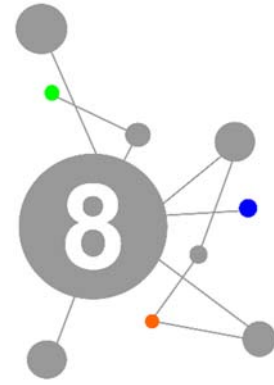
Por otro lado, las bacterias de vida libre presentaron mayores conexiones entre ellas que las bacterias adheridas a partículas, probablemente como consecuencia de una mayor necesidad de interacción entre ellas para conseguir ciertos metabolitos necesarios (Cui *et al.*, 2019). En el análisis a corto plazo, esta comunidad presentó un claro patrón temporal con diferencias en su composición en invierno, transición y verano. Además, los homogéneos y altos valores de cambio diario observados para las comunidades de bacterias de vida libre y mixta dentro de cada situación refuerzan la idea de que las variables ambientales influyen más sobre estas comunidades que sobre la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Otros trabajos también han detectado una mayor variabilidad filogenética en la comunidad de bacterias de vida libre, debido a su exposición y dependencia de los recursos (Yung *et al.*, 2016; Bachmann *et al.*, 2018). Así, la abundante producción de materia orgánica disuelta y el descenso de la concentración de los nutrientes inorgánicos durante el afloramiento fitoplanctónico serían los principales impulsores del cambio de estas comunidades bacterianas de invierno a transición. En este sentido, otros autores también observaron que los cambios en la composición de la comunidad bacteriana de invierno a primavera se regían principalmente por los recursos disponibles (Sapp *et al.*, 2007; Sintés *et al.*, 2013). Por otro lado, los nanoflagelados heterótrofos y las partículas víricas serían los impulsores del cambio desde la situación de transición hacia la situación de verano. Por último, la temperatura, y la abundancia de *Synechococcus* fueron factores importantes en la determinación de las comunidades bacterianas de verano.

Con el fin de estudiar en detalle la influencia de la temperatura en el bacterioplancton marino (**Capítulo 3**), se escogieron como miembros representativos de la comunidad bacteriana tres bacterias que fueron detectadas recurrentemente en la estación de Armintza; *Winogradskyella* detectada en las muestras de invierno y verano, *Jannaschia* solo detectada en las muestras de invierno y *Aliiroseovarius* detectada en exclusiva en las muestras de verano. Se analizaron sus actividades específicas (producción, respiración, y actividades enzimáticas extracelulares leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina) a 2 temperaturas, 12 °C y 20 °C, similares a las temperaturas medias del sistema marino en invierno y verano respectivamente. También se analizó la sensibilidad a la temperatura de estos procesos mediante los valores de energía de activación, con el fin de caracterizar la respuesta de estas tres bacterias frente a un potencial aumento de temperatura del sistema derivado de la actual situación de calentamiento global.

Aunque todas las actividades bacterianas analizadas mostraron un efecto positivo frente al aumento de temperatura, se observó que la respiración bacteriana fue la actividad que mostró la mayor sensibilidad a la temperatura en las tres bacterias modelo. Esto sugiere que el calentamiento de la superficie del Mar Cantábrico oriental provocará un efecto de retroalimentación positiva en el cambio climático al liberar una mayor cantidad de CO₂ a la

atmosfera en vez de incorporar el carbono para la producción de nueva biomasa bacteriana. El aumento del CO₂ se ha asociado a una cascada de consecuencias, algunas de las cuales inciden directamente en la propia actividad microbiana marina. Entre ellas, una acidificación del agua de la superficie del océano (Caldeira y Wickett, 2005; Orr *et al.*, 2005) que afectará a muchos procesos enzimáticos bacterianos involucrados en la utilización de compuestos orgánicos. Así, por ejemplo, se conoce que la acidificación aumenta las velocidades de hidrólisis de material de alto peso molecular rico en nitrógeno (Grossart *et al.*, 2006b), de polisacáridos (Piontek *et al.*, 2010) y carbohidratos y lípidos (Maas *et al.*, 2013), lo que conllevará alteraciones en las tasas de regeneración de carbono, nitrógeno y fósforo de los sistemas marinos.

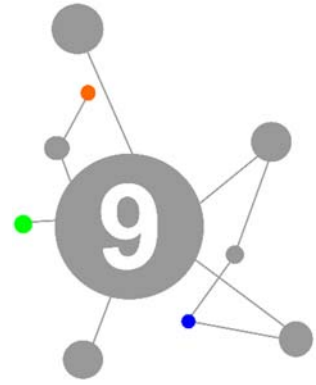
Si bien las actividades de las tres bacterias modelos se verán incrementadas en respuesta a un aumento de la temperatura, dicho incremento será máximo en *A. halocynthiae* y mínimo en *J. helgolandensis*. Teniendo en cuenta que esta última a día de hoy solamente resulta detectable en algunos momentos de la situación invernal, es probable que ante un calentamiento del océano se vea superada cuantitativamente por otras bacterias y su detección sea cada vez más escasa incluso pudiendo llegar a formar parte de la biosfera rara (Pedrós-Alió, 2006, 2012). Así, la diferente sensibilidad a la temperatura que mostraron las tres bacterias modelo, permite predecir que un aumento generalizado de la temperatura superficial del sistema costero generará cambios en la composición de la comunidad de las bacterias presentes. Por lo tanto, nuestros resultados, junto con los obtenidos recientemente por otros autores (Arandia-Gorostidi *et al.*, 2017; Martínez-García y Pinhassi, 2018), revelan la importancia del estudio de la sensibilidad a la temperatura de grupos filogenéticos y especies concretas de la comunidad bacterioplanctónica de los sistemas marinos. Mediante este tipo de estudios, se pueden cuantificar, con la mayor precisión posible, los efectos del calentamiento global y predecir futuros cambios en la composición de las comunidades bacterianas, así como en los procesos que estas llevan a cabo.



CONCLUSIONES

- 1- Las aguas superficiales de la estación costera de Armintza en el Mar Cantábrico oriental presentan dos situaciones estacionales claramente diferenciadas: invierno (octubre-febrero) y verano (mayo-agosto). El invierno está caracterizado por menores temperaturas, minutos de luz y densidad de cianobacterias (*Synechococcus*) y mayores concentraciones de nitratos y clorofila *a* que el verano. Cada situación presenta un clado filogenético bacteriano predominante distinto, *Alfaproteobacteria* en invierno y *Bacteroidetes* en verano. Estas situaciones están separadas por dos momentos de transición, el primero en abril como consecuencia del afloramiento de diatomeas y el segundo en septiembre, como consecuencia del crecimiento masivo de la cianobacteria *Synechococcus*, en los que ocurren importantes descensos de la diversidad taxonómica y la eficiencia de crecimiento bacteriana.
- 2- En este sistema marino coexisten tres comunidades bacterianas con diferente estilo de vida: la comunidad de bacterias adheridas a partículas, la comunidad de bacterias de vida libre y la comunidad mixta. Su composición taxonómica es muy específica del hábitat colonizado, ya que el 81-82 % de las OTUs más abundantes son específicas de uno solo de los hábitats. La composición de cada una de las comunidades muestra una marcada estacionalidad, caracterizada por la presencia de OTUs que aparecen mayoritariamente o exclusivamente durante invierno, los especialistas de invierno, o durante el verano, los especialistas de verano. Sin embargo, también existen OTUs generalistas, en distinta proporción en cada comunidad, que son abundantes durante todo el año.
- 3- El muestreo intensivo ha mostrado que la situación de transición es una situación inestable, caracterizada por la desaparición y aparición de OTUs diferentes y alta dispersión en la diversidad de las tres comunidades estudiadas (adheridas a partículas, de vida libre y mixta), por lo que es la situación donde se da la transformación taxonómica y fisiológica de la comunidad bacteriana. Además, el muestreo intensivo ha mostrado que la variabilidad intrasituaciones de ciertas variables y grupos filogenéticos es incluso superior al detectado en periodos largos de tiempo (entre situaciones).
- 4- En las aguas superficiales de Armintza, las partículas marinas constituyen un hábitat que amortigua el efecto de las condiciones ambientales en la composición de la comunidad de bacterias adheridas a partículas, como lo muestra el mayor porcentaje de correlaciones retrasadas en el tiempo de estas bacterias con las variables abióticas del sistema. Tanto el estudio estacional a largo plazo, como el estudio intensivo, muestran que los factores ambientales bióticos y abióticos que más influyen en la regulación de la composición taxonómica de la comunidad de bacterias adheridas a partículas fueron la concentración de clorofila *a* (indicador del afloramiento fitopláctónico eucariótico), la depredación por los nanoflagelados heterótrofos y la lisis vírica.

- 5- Las bacterias de vida libre presentaron mayores conexiones entre ellas que las bacterias adheridas a partículas, probablemente como consecuencia de una mayor necesidad de interacción entre ellas para conseguir ciertos metabolitos necesarios. En el análisis a corto plazo, esta comunidad presentó un claro patrón temporal con diferencias en su composición en invierno, transición y verano. Además, los homogéneos y altos valores de cambio diario observados para las comunidades bacterianas de vida libre y mixta dentro de cada situación, refuerzan la idea de que las variables ambientales influyen más sobre estas comunidades que sobre la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Así, la abundante producción de materia orgánica disuelta y el descenso de la concentración de los nutrientes inorgánicos durante el afloramiento fitoplanctónico serían los principales impulsores del cambio de estas comunidades bacterianas de invierno a transición. Por otro lado, los nanoflagelados heterótrofos y las partículas víricas serían los impulsores del cambio desde la situación de transición hacia la situación de verano. Por último, la temperatura, y la abundancia de *Synechococcus* son factores importantes en la determinación de las comunidades bacterianas de verano.
- 6- La respiración bacteriana fue la actividad que mostró la mayor sensibilidad a la temperatura en las tres bacterias modelos utilizadas en este estudio, la bacteria generalista *Winogradskyella jejuensis*, la especialista de verano *Alliroseovarius halocynthiae* y la especialista de invierno *Jannaschia helgolandensis*, por lo que se puede considerar una tendencia general aplicable a la comunidad bacteriana natural. Estos resultados sugieren que el calentamiento de la superficie del Mar Cantábrico oriental provocará un efecto de retroalimentación positiva en el cambio climático al liberar una mayor cantidad de CO₂ a la atmósfera en vez de incorporar el carbono para la producción de nueva biomasa bacteriana.
- 7- Si bien las actividades de las tres bacterias modelo se verán incrementadas en respuesta a un aumento de la temperatura, dicho incremento será máximo en *A. halocynthiae* y mínimo en *J. helgolandensis*. Teniendo en cuenta que esta última a día de hoy solamente resulta detectable en algunos momentos de la situación invernal, es probable que ante un calentamiento del océano se vea superada cuantitativamente por otras bacterias y que su detección sea cada vez más escasa. Así, la diferente sensibilidad a la temperatura que mostraron las tres bacterias modelo, permite predecir que un aumento generalizado de la temperatura superficial del sistema costero generará cambios en la composición de la comunidad de bacterias marinas.



BIBLIOGRAFÍA

- Abad, N. (2020). Actividad enzimática extracelular en el océano. Tesis Doctoral. Leioa, España: Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Abell, G. C. J., & Bowman, J. P. (2005). Colonization and community dynamics of class *Flavobacteria* on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 379–391. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.008.
- Acinas, S. G., Antón, J., & Rodríguez-Valera, F. (1999). Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 514–522. doi:10.1128/AEM.65.2.514-522.1999.
- Acinas, S. G., Rodríguez-Valera, F., & Pedrós-Alió, C. (1997). Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 27–40. doi:10.1016/S0168 6496(97)00031-7.
- Aldredge, A. L., & Cohen, Y. (1987). Can microscale chemical patches persist in the sea? Microelectrode study of marine snow, fecal pellets. *Science.* 235, 689–691. doi:10.1126/science.235.4789.689.
- Aldredge, A. L., Cole, J. J., & Caron, D. A. (1986). Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol. Oceanogr.* 31, 68–78. doi:10.4319/lo.1986.31.1.0068.
- Allen, Z. L., Allen, E. E., Badger, J. H., McCrow, J. P., Paulsen, I. T., Elbourne, L. D., *et al.* (2012). Influence of nutrients and currents on the genomic composition of microbes across an upwelling mosaic. *ISME J.* 6, 1403–1414. doi:10.1038/ismej.2011.201.
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. H. (2008). Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 Suppl, 11512–11519. doi:10.1073/pnas.0801925105.
- Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sà, E. L., Sánchez, O., González, J. M., Pinhassi, J., *et al.* (2007). Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: Assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 98–112. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00276.x.
- Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., & Gasol, J. M. (2012). Bacterial uptake of low molecular weight organics in the subtropical Atlantic: Are major phylogenetic groups functionally different? *Limnol. Oceanogr.* 57, 798–808. doi:10.4319/lo.2012.57.3.0798.
- Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., Gasol, J. M., Balagué, V., & Pedrós-Alió, C. (2008). Winter-to-summer changes in the composition and single-cell activity of near-surface Arctic prokaryotes. *Environ. Microbiol.* 10, 2444–2454. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01674.x.
- Alonso-Sáez, L., Zeder, M., Harding, T., Pernthaler, J., Lovejoy, C., Bertilsson, S., *et al.* (2014). Winter bloom of a rare betaproteobacterium in the Arctic Ocean. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00425.
- Alonso, C., & Pernthaler, J. (2006). *Roseobacter* and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environ. Microbiol.* 8, 2022–2030. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01082.x.
- Amann, R. I., Blinder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990a). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925. doi:10.1128/aem.56.6.1919-1925.1990.
- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990b). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770.

doi:10.1128/jb.172.2.762-770.1990.

Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169. doi:10.1016/j.jip.2007.09.009.

Amaral-Zettler, L., Peplies, J., Ramette, A., Fuchs, B., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2008). Proceedings of the international workshop on ribosomal RNA technology, April 7-9, 2008, Bremen, Germany. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 258–268. doi:10.1016/j.syapm.2008.08.004.

Andersson, A. F., Riemann, L., & Bertilsson, S. (2010). Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *ISME J.* 4, 171–181. doi:10.1038/ismej.2009.108.

Apple, J. K., & del Giorgio, P. A. (2007). Organic substrate quality as the link between bacterioplankton carbon demand and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *ISME J.* 1, 729–742. doi:10.1038/ismej.2007.86.

Apple, J. K., del Giorgio, P. A., & Kemp, W. M. (2006). Temperature regulation of bacterial production, respiration, and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* 43, 243–254. doi:10.3354/ame043243.

Arandia-Gorostidi, N., Huete-Stauffer, T. M., Alonso-Sáez, L., & Morán, X. A. G. (2017). Testing the metabolic theory of ecology with marine bacteria: different temperature sensitivity of major phylogenetic groups during the spring phytoplankton bloom. *Environ. Microbiol.* 19, 4493–4505. doi:10.1111/1462-2920.13898.

Arnosti, C., Durkin, S., & Jeffrey, W. H. (2005). Patterns of extracellular enzyme activities among pelagic marine microbial communities: implications for cycling of dissolved organic carbon. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 135–145. doi: 10.3389/fmicb.2013.00318.

Arnosti, C., Fuchs, B. M., Amann, R., & Passow, U. (2012). Contrasting extracellular enzyme activities of particle-associated bacteria from distinct provinces of the North Atlantic Ocean. *Front. Microbiol.* 3, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2012.00425.

Artolozaga, I., Valcárcel, M., Ayo, B., Latatu, A., & Iriberry, J. (2002). Grazing rates of bacterivorous protists inhabiting diverse marine planktonic microenvironments. *Limnol. Oceanogr.* 47, 142–150. doi:10.4319/lo.2002.47.1.0142.

Ayo, B., Abad, N., Artolozaga, I., Azúa, I., Baña, Z., Unanue, M., *et al.* (2017). Imbalanced nutrient recycling in a warmer ocean driven by differential response of extracellular enzymatic activities. *Glob. Chang. Biol.* 23, 4084–4093. doi:10.1111/gcb.13779.

Ayo, B., Unanue, M., Azúa, I., Gorsky, G., Turley, C., & Iriberry, J. (2001). Kinetics of glucose and amino acid uptake by attached and free-living marine bacteria in oligotrophic waters. *Mar. Biol.* 138, 1071–1076. doi:10.1007/s002270000518.

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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. doi:10.3354/meps010257.

Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 782–791. doi:10.1038/nrmicro1747.

Azúa, I., Unanue, M., Ayo, B., Artolozaga, I., Arrieta, J. M., & Iriberry, J. (2003). Influence of organic matter quality in the cleavage of polymers by marine bacterial communities. *J. Plankton Res.* 25, 1451–1460. doi:10.1093/plankt/fbg105.

- Bachmann, J., Heimbach, T., Hassenrück, C., Kopprio, G. A., Iversen, M. H., Grossart, H. P., *et al.* (2018). Environmental drivers of free-living vs. particle-attached bacterial community composition in the Mauritania upwelling system. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2018.02836.
- Baña, Z. (2020). Variabilidad de la eficiencia de crecimiento bacteriana en sistemas marinos costeros. Tesis Doctoral. Leioa, España: Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Baña, Z., Abad, N., Uranga, A., Azúa, I., Artolozaga, I., Unanue, M., *et al.* (2020). Recurrent seasonal changes in bacterial growth efficiency, metabolism and community composition in coastal waters. *Environ. Microbiol.* 22, 369–380. doi:10.1111/1462-2920.14853.
- Bano, N., & Hollibaugh, J. T. (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 505–518. doi:10.1128/AEM.68.2.505-518.2002.
- Bauer, M., Kube, M., Teeling, H., Richter, M., Lombardot, T., Allers, E., *et al.* (2006). Whole genome analysis of the marine *Bacteroidetes* “*Gramella forsetii*” reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environ. Microbiol.* 8, 2201–2213. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01152.x.
- Becquevort, S., Rousseau, V., & Lancelot, C. (1998). Major and comparable roles for free-living and attached bacteria in the degradation of *Phaeocystis*-derived organic matter in Belgian coastal waters of the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 39–48. doi:10.3354/ame014039.
- Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., *et al.* (2000). Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*. 289, 1902–1906. doi:10.1126/science.289.5486.1902.
- Benner, R., & Strom, M. (1993). A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Mar Chem.* 41, 153–160. doi:10.1016/0304-4203(93)90113-3.
- Berggren, M., Laudon, H., Jonsson, A., & Jansson, M. (2010). Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microb. Ecol.* 60, 894–902. doi:10.1007/s00248-010-9751-1.
- Bernardet J. F. (2011). Family I. *Flavobacteriaceae* Reichenbach 1992. In Whitman, W. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (p.p.106–111). Baltimore, USA. The Williams & Wilkins Co.
- 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. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1721–1731. doi:10.4319/lo.2003.48.5.1721.
- Bertilsson, S., Berglund, O., Pullin, M. J., & Chisholm, S. W. (2005). Release of dissolved organic matter by *Prochlorococcus*. *Vie Milieu* 55, 225–231. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0798.
- Bettarel, Y., Motegi, C., Weinbauer, M. G., & Mari, X. (2016). Colonization and release processes of viruses and prokaryotes on artificial marine macroaggregates. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnv216. doi:10.1093/femsle/fnv216.
- Biddanda, B., & Benner, R. (1997). Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Ocean.* 42, 506–518. doi:10.4319/lo.1997.42.3.0506.
- Bidle, K. D., & Fletcher, M. (1995). Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 944–952. doi:10.1128/aem.61.3.944-952.1995.
- Bižić-Ionescu, M., Zeder, M., Ionescu, D., Orlic, S., Fuchs, B. M., Grossart, H. P., *et al.* (2014). Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound

- differences in colonization. *Environ. Microbiol.* 17, 3500–3514. doi:10.1111/1462-2920.12466.
- Boström, K. H., Simu, K., Hagström, Å., & Riemann, L. (2004). Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Ocean. Methods.* 2, 365–373. doi:10.4319/lom.2004.2.365.
- Botas, J. A., Fernández, E., Bode, A., & Anadón, R. (1990). A persistent upwelling off the central Cantabrian coast (Bay of Biscay). *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 30, 195-199. doi:10.1016/0272-7714(90)90063-W.
- Bouvier, T., & del Giorgio, P. A. (2007). Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environ. Microbiol.* 9, 287–297. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01137.x.
- Brewer, P. G., & Riley, J. P. (1966). The automatic determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water. *Anal. Chim. Acta.* 35, 514–519. doi:10.1016/S0003-2670(01)81716-5.
- Briand, E., Pringault, O., Jacquet, S., & Torréton, J. P. (2004). The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 2, 406–416. doi:10.4319/lom.2004.2.406.
- 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. doi:10.1890/03-9000.
- Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: Development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7, 1466–1479. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00835.x.
- Brüggemann, J., Stephen, J. R., Chang, Y. J., Macnaughton, S. J., Kowalchuk, G. A., Kline, E., *et al.* (2000). Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixtures an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *J. Microbiol. Methods* 40, 111–123. doi:10.1016/S0167-7012(99)00126-8.
- Caldeira, K., & Wickett, M. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J. Geophys. Res.* 110, 1–12. doi:10.1029/2004JC002671.
- Calvo-Díaz, A., Morán, X. A. G., & Suárez, L. Á. (2008). Seasonality of picophytoplankton chlorophyll *a* and biomass in the central Cantabrian Sea, southern Bay of Biscay. *J. Mar. Syst.* 72, 271–281. doi:10.1016/j.jmarsys.2007.03.008.
- Campos, J. (2020). Respuesta funcional de las bacterias heterótrofas marinas *Aliiroseovarius halocynthiae* y *Winogradskyella jejuensis* a cambios ambientales asociados al calentamiento global. Trabajo Fin de Grado. Leioa, España: Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Caron, D. A. (1987). Grazing of attached bacteria by heterotrophic microflagellates. *Microb. Ecol.* 13, 203–218. doi:10.1007/BF02024998.
- Caron, D., Davis, P., Madin, L., & Sieburth, J. M. (1982). Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science.* 218, 795–797. doi:10.1126/science.218.4574.795.
- Castle, D., & Kirchman, D. L. (2004). Composition of estuarine bacterial communities assessed by denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Limnol. Ocean. Methods* 2, 303–314. doi:10.4319/lom.2004.2.303.
- Chafee, M., Fernández-Guerra, A., Buttigieg, P. L., Gerds, G., Eren, A. M., Teeling, H., *et al.* (2018). Recurrent patterns of microdiversity in a temperate coastal marine environment. *ISME J.* 12, 237–252. doi:10.1038/ismej.2017.165.

- Chen, R. F., Zhang, Y., Vlahos, P., & Rudnick, S. M. (2002). The fluorescence of dissolved organic matter in the Mid-Atlantic Bight. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49, 4439–4459. doi:10.1016/S0967-0645(02)00165-0.
- Cho, J. C., & Giovannoni, S. J. (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 432–440. doi:10.1128/AEM.70.1.432-440.2004.
- Choi, C. J., Brosnahan, M. L., Sehein, T. R., Anderson, D. M., & Erdner, D. L. (2017). Insights into the loss factors of phytoplankton blooms: The role of cell mortality in the decline of two inshore *Alexandrium* blooms. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1742–1753. doi:10.1002/lno.10530.
- Chow, C. E. T., Sachdeva, R., Cram, J. A., Steele, J. A., Needham, D. M., Patel, A., *et al.* (2013). Temporal variability and coherence of euphotic zone bacterial communities over a decade in the Southern California Bight. *ISME J.* 7, 2259–2273. doi:10.1038/ismej.2013.122.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143. doi:10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x.
- Clarke, K. R., & Green, R. H. (1988). Statistical design and analysis for a 'biological effects' study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 213–226. doi:10.3354/meps046213.
- Cleary, D. F. R., Smalla, K., Mendonça-Hagler, L. C. S., & Gomes, N. C. M. (2012). Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLoS One.* 7, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0029380.
- Cline, M. A., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., *et al.* (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* 2, 2366–2382. doi:10.1038/nprot.2007.324.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325–346. doi:10.1016/0304-4203(95)00062-3.
- Comte, J., & del Giorgio, P. A. (2010). Linking the patterns of change in composition and function in bacterioplankton successions along environmental gradients. *Ecology.* 91, 1466–1476. doi:10.1890/09-0848.1.
- Comte, J., & del Giorgio, P. A. (2011). Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. *PLoS One.* 6, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0025266.
- Comte, J., Jacquet, S., Viboud, S., Fontvieille, D., Millery, A., Paolini, G., *et al.* (2006). Microbial community structure and dynamics in the largest natural french lake (Lake Bourget). *Microb. Ecol.* 52, 72–89. doi:10.1007/s00248-004-0230-4.
- Costoya, X., deCastro, M., Gómez-Gesteira, M., & Santos, F. (2015). Changes in sea surface temperature seasonality in the Bay of Biscay over the last decades (1982-2014). *J. Mar. Syst.* 150, 91–101. doi:10.1016/j.jmarsys.2015.06.002.
- Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high- molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1692–1697. doi:10.1128/AEM.66.4.1692-1697.2000.
- Cram, J. A., Chow, C. E. T., Sachdeva, R., Needham, D. M., Parada, A. E., Steele, J. A., *et al.* (2015). Seasonal and interannual variability of the marine bacterioplankton community throughout the water column over ten years. *ISME J.* 9, 563–580. doi:10.1038/ismej.2014.153.
- Crespo, B. G., Pommier, T., Fernández-Gómez, B., & Pedrós-Alió, C. (2013). Taxonomic composition

of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *Microbiol. Open.* 2, 541–552. doi:10.1002/mbo3.92.

Crump, B. C., Armbrust, V. E., & Baross, J. A. (1999). Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3192–3204. doi:10.1128/AEM.65.7.3192-3204.1999.

Cui, Y., Chun, S. J., Baek, S. H., Lee, M., Kim, Y., Lee, H. G., *et al.* (2019). The water depth-dependent co-occurrence patterns of marine bacteria in shallow and dynamic Southern Coast, Korea. *Sci. Rep.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41598-019-45512-5.

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. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444. doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8.

Degerman, R., Dinasquet, J., Riemann, L., de Luna, S. S., & Andersson, A. (2013). Effect of resource availability on bacterial community responses to increased temperature. *Aquat. Microb. Ecol.* 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.

del Giorgio, P. A., Pace, M. L., & Fischer, D. (2006). Relationship of bacterial growth efficiency to spatial variation in bacterial activity in the Hudson River. *Aquat. Microb. Ecol.* 45, 55–67. doi:10.3354/ame045055.

Dell, A. I., Pawar, S., & Savage, V. M. (2011). Systematic variation in the temperature dependence of physiological and ecological traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10591–10596. doi:10.1073/pnas.1015178108.

DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5685–5689. doi:10.1073/pnas.89.12.5685.

DeLong, E. F., Franks, D. G., & Alldredge, A. L. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 38, 924–934. doi:10.4319/lm.1993.38.5.0924.

DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L., & Preston, C. M. (1999). Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5554–5563. doi:10.1128/AEM.65.12.5554-5563.1999.

DeLong, E. F., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science.* 243, 1360–1363. doi:10.1126/science.2466341.

DeSantis, T. Z., Brodie, E. L., Moberg, J. P., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M., & Andersen, G. L. (2007). High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb. Ecol.* 53, 371–383. doi:10.1007/s00248-006-9134-9.

Díez-Vives, C., Nielsen, S., Sánchez, P., Palenzuela, O., Ferrera, I., Sebastián, M., *et al.* (2019). Delineation of ecologically distinct units of marine Bacteroidetes in the Northwestern Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.* 28, 2846–2859. doi:10.1111/mec.15068.

Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L., & Massana, R. (2001). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2941–2951. doi:10.1128/AEM.67.7.2942.

Dowd, S. E., Sun, Y., Secor, P. R., Rhoads, D. D., Wolcott, B. M., James, G. A., *et al.* (2008). Survey

- of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 8, 1–15. doi:10.1186/1471-2180-8-43.
- Duck, W. M., Steward, C. D., Banerjee, S. N., Mgowan, J. E., & Tenover, F. C. (2003). Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3035–3042. doi:10.1128/JCM.41.7.3035.
- Ducklow, H. (2000). Bacterial production and biomass in the oceans. In Kirchman D. L. (ed.), *Microbial Ecology of the Ocean*. (p.p 85–120). New York, USA.
- Ducklow, H. W., Kirchman, D. L., Quinby, H. L., Carlson, C. A., & Dam, H. G. (1993). Stocks and dynamics of bacterioplankton carbon during the spring bloom in the eastern North Atlantic Ocean. *Deep. Res. Part II.* 40, 245–263. doi:10.1016/0967-0645(93)90016-G.
- Eiler, A., Hayakawa, D. H., & Rappé, M. S. (2011). Non-random assembly of bacterioplankton communities in the subtropical North Pacific Ocean. *Front. Microbiol.* 2, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2011.00140.
- Eiler, A., Heinrich, F., & Bertilsson, S. (2012). Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa. *ISME J.* 6, 330–342. doi:10.1038/ismej.2011.113.
- Eilers, H., Perntehaler, J., & Amann, R. (2000). Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Appl. Environmental Microbiol.* 66, 4634–4640. doi:10.1128/aem.66.11.4634-4640.2000.
- Estrada, M. (1982). Ciclo anual del fitoplancton en la zona costera frente a Punta Endata (golfo de Vizcaya). *Inv. Pesq* 46, 469–491.
- Fandino, L. B., Riemann, L., Steward, G. F., & Long, R. A. (2001). Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom. *Aquat. Microb.* 23, 119–130. doi:10.3354/ame023119.
- Fernández-Gómez, B., Richter, M., Schüller, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M., et al. (2013). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.* 7, 1026–1037. doi:10.1038/ismej.2012.169.
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636. doi:10.1128/AEM.65.10.4630-4636.1999.
- Flaten, G. A. F., Castberg, T., Tanaka, T., & Thingstad, T. F. (2003). Interpretation of nutrient-enrichment bioassays by looking at sub-populations in a marine bacterial community. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 11–18. doi:10.3354/ame033011.
- Fortunato, C. S., Eiler, A., Herfort, L., Needoba, J. A., Peterson, T. D., & Crump, B. C. (2013). Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *ISME J.* 7, 1899–1911. doi:10.1038/ismej.2013.79.
- Fuchs, B. M., Zubkov, M. V., Sahm, K., Burkill, P. H., & Amann, R. (2000). Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environ. Microbiol.* 2, 191–201. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00092.x.
- Fuentes-Lema, A., Sanleón-Bartolomé, H., Lubián, L. M., & Sobrino, C. (2018). Effects of elevated CO₂ and phytoplankton-derived organic matter on the metabolism of bacterial communities from coastal waters. *Biogeosciences.* 15, 6927–6940. doi:10.5194/bg-15-6927-2018.
- Fuentes, M., Escribano, R., & Cuevas, L. A. (2012). Bacterial response to a weak 2006 El Niño condition in an upwelling area of the Humboldt Current System. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom.*

92, 1–12. doi:10.1017/S0025315411001755.

Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 133–146. doi:10.1038/nrmicro3417.

Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Brown, M. V., & Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13104–13109. doi:10.1073/pnas.0602399103.

Fuhrman, J. A., & Steele, J. A. (2008). Community structure of marine bacterioplankton: Patterns, networks, and relationships to function. *Aquat. Microb. Ecol.* 53, 69–81. doi:10.3354/ame01222.

Fuhrman, J. A., Steele, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., Brown, M. V., Green, J. L., *et al.* (2008). A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7774–7778. doi:10.1073/pnas.0803070105.

Fuhrman, J. A., & Azam, F. (1983). Adaptations of bacteria to marine subsurface waters studied by temperature response. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13, 95–98. doi:10.3354/meps013095.

Ganesh, S., Parris, D. J., DeLong, E. F., & Stewart, F. J. (2014). Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *ISME J.* 8, 187–211. doi:10.1038/ismej.2013.144.

García-Corral, L. S., Barber, E., Regaudie-De-Gioux, A., Sal, S., Holding, J. M., Agustí, S., *et al.* (2014). Temperature dependence of planktonic metabolism in the subtropical North Atlantic Ocean. *Biogeosciences* 11, 4529–4540. doi:10.5194/bg-11-4529-2014.

García-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I., & Rodríguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods.* 36, 55–64. doi:10.1016/S0167-7012(99)00011-1.

Gasol, J. M., & del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.* 64, 197–224. doi:10.3989/scimar.2000.64n2197.

Gasol, J. M., & Morán, X. A. G. (1999). Effects of filtration on bacterial activity and picoplankton community structure as assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 251–264. doi:10.3354/ame016251.

Ghiglione, J. F., Larcher, M., & Lebaron, P. (2005). Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 229–240. doi:10.3354/ame040229.

Ghiglione, J. F., Mevel, G., Pujo-Pay, M., Mousseau, L., Lebaron, P., & Goutx, M. (2007). Diel and seasonal variations in abundance, activity, and community structure of particle-attached and free-living bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* 54, 217–231. doi:10.1007/s00248-006-9189-7.

Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., *et al.* (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* 6, 298–308. doi:10.1038/ismej.2011.107.

Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science.* 293, 2248–2251. doi:10.1126/science.1061967.

Giovannoni, S. J. (2017). SAR11 Bacteria: The most abundant plankton in the Oceans. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9, 231–255. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015934.

Giovannoni, S. J., Cameron Thrash, J., & Temperton, B. (2014). Implications of streamlining theory for

microbial ecology. *ISME J.* 8, 1553–1565. doi:10.1038/ismej.2014.60.

Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170, 720–726. doi:10.1128/jb.170.2.720-726.1988.

Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. L., Baptista, D., *et al.* (2005). Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science.* 309, 1242–1245. doi:10.1126/science.1114057.

Gobet, A., Boetius, A., & Ramette, A. (2014). Ecological coherence of diversity patterns derived from classical fingerprinting and Next Generation Sequencing techniques. *Environ. Microbiol.* 16, 2672–2681. doi:10.1111/1462-2920.12308.

Gómez-Pereira, P. R., Schüller, M., Fuchs, B. M., Bennke, C., Teeling, H., Waldmann, J., *et al.* (2012). Genomic content of uncultured *Bacteroidetes* from contrasting oceanic provinces in the North Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 14, 52–66. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02555.x.

González, J. M., Fernández-Gómez, B., Fernández-Guerra, A., Gómez-Consarnau, L., Sánchez, O., Coll-Lladó, M., *et al.* (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 8724–8729. doi:10.1073/pnas.0712027105.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis*. 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim. doi:10.1016/0304-4203(78)90045-2.

Griess, P. (1858) Vorläufige Notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Amidnitrouramid. *Annalen der Chemie und Pharmacie.* 106, 123–125. doi:10.1002/jlac.18581060114.

Grossart, H. P. (2010). Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: Changes in concepts are needed. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 706–714. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00179.x.

Grossart, H. P., Engel, A., Arnosti, C., De La Rocha, C. L., Murray, A. E., & Passow, U. (2007). Microbial dynamics in autotrophic and heterotrophic seawater mesocosms. III. Organic matter fluxes. *Aquat. Microb. Ecol.* 49, 143–156. doi:10.3354/ame01140.

Grossart, H. P., Kjørboe, T., Tang, K., & Ploug, H. (2003). Bacterial colonization of marine snowparticles: Growth and inter-specific interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3500–3509. doi:10.1128/aem.69.6.3500-3509.2003.

Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 7, 860–873. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00759.x.

Grossart, H. P., Tang, K. W., Kjørboe, T., & Ploug, H. (2006a). Comparison of cell-specific activity between free-living and attached bacteria using isolates and natural assemblages. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 194–200. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00520.x.

Grossart, H. P., Fischerhuetten, A., Allgaier, M., & Passow, U. (2006b). Testing the effect of CO₂ concentration on the dynamics of marine heterotrophic bacterioplankton. *Cell.* 51, 1–11. doi:10.4319/lo.2006.51.1.0001.

Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16. doi:10.1099/13500872-142-1-3.

Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., *et al.* (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* 9, 228–241.

doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x.

Hatosy, S. M., Martiny, J. B. H., Sachdeva, R., Steele, J., Fuhrman, J. A., & Martiny, A. C. (2013). Beta diversity of marine bacteria depends on temporal scale. *Ecology* 94, 1898–1904. doi:10.1890/12-2125.1.

Heins, A., Reintjes, G., Amann, R. I., & Harder, J. (2021). Particle collection in Imhoff Sedimentation Cones enriches both motile chemotactic and particle-attached bacteria. *Front. Microbiol.* 12, 1–17. doi:10.3389/fmicb.2021.643730.

Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2006). Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microb. Ecol.* 51, 147–153. doi:10.1007/s00248-005-0144-9.

Hewson, I., Steele, J. A., Capone, D. G., & Fuhrman, J. A. (2006). Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 311, 67–77. doi:10.3354/meps311067.

Hoegh-Guldberg, O., & Bruno, J. F. (2010). The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*. 328, 1523–1528. doi:10.1126/science.1189930.

Høj, L., Olsen, R. A., & Torsvik, V. L. (2005). Archaeal communities in High Arctic wetlands at Spitsbergen, Norway (78°N) as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 89–101. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.004.

Hollibaugh, J. T., Wong, P. S., & Murrell, M. C. (2000). Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California. *Aquat. Microb. Ecol.* 21, 103–114. doi:10.3354/ame021103.

Hoppe, H. G. (1993). Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr E.B., and Cole, J.J. (Ed.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (p.p 423–431). Lewis, Boca raton, Florida, USA.

Hoppe, H. G., Arnosti, C., & Herndl, G.J. (2002). Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment. In Burns, R. G. and Dick, R. P. (ed.), *Enzymes in the environment*. (p.p 73–97). New York: Marcel Dekker. doi:10.1201/9780203904039.CH3.

Hoppe, H. G., Breithaupt, P., Walther, K., Koppe, R., Bleck, S., Sommer, U., *et al.* (2008). Climate warming in winter affects the coupling between phytoplankton and bacteria during the spring bloom: results from a mesocosm study. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 105–115. doi:10.3354/ame01998.

Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., & Bohannon, B. J. M. (2004). A taxa-area relationship for bacteria. *Nature*. 432, 750–753. doi:10.1038/nature03073.

Huete-Stauffer, T. M., Arandia-Gorostidi, N., Díaz-Pérez, L., & Morán, X. A. G. (2015). Temperature dependences of growth rates and carrying capacities of marine bacteria depart from metabolic theoretical predictions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–10. doi:10.1093/femsec/fiv111.

Huete-Stauffer, T. M., Arandia-Gorostidi, N., González-Benítez, N., Díaz-Pérez, L., Calvo-Díaz, A., & Morán, X. A. G. (2018). Large plankton enhance heterotrophy under experimental warming in a temperate coastal ecosystem. *Ecosystems*. 21, 1139–1154. doi:10.1007/s10021-017-0208-y.

Hunt, D. E., David, L. A., Gevers, D., Preheim, S. P., Alm, E. J., & Polz, M. F. (2008). Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science*. 320, 1081–1085. doi:10.1126/science.1157890.

IPCC (2019). IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate. In Pörtner, H.O., Roberts, D.C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Alegría, A., Nicolai, M., Okem, A., Petzold, J., Rama, B. and Weyer N.M. (ed.). Cambridge University Press.

- IPCC (2021). Summary for Policymakers. In Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S. L., Péan, C., Berger, S., Caud, N., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M. I., Huang, M., Leitzell, K., Lonnoy, E., Matthews, J. B. R., Maycock, T. K., Waterfield, T., Yelekçi, O., Yu, R. and Zhou, B. (ed). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Iriberry, J., Unanue, M., Ayo, B., Barcina, I., & Egea, L. (1990). Bacterial production and growth rate estimation from [³H] tritiated thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 483–487.
- Iturriaga, R., & Hoppe, H. G. (1977). Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter. *Mar. Biol.* 40, 101–108. doi:10.1007/BF00396254.
- Jain, A., & Krishnan, K. P. (2017). Differences in free-living and particle-associated bacterial communities and their spatial variation in Kongsfjorden, Arctic. *J. Basic Microbiol.* 57, 827–838. doi:10.1002/jobm.201700216.
- Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H., & Overmann, J. (2001). Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 153–164. doi:10.1016/S0168-6496(01)00129-5.
- Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T. T. Van, Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., *et al.* (2012). Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ. Microbiol.* 14, 1466–1476. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02733.x.
- Kellogg, C. T. E., & Deming, J. W. (2009). Comparison of free-living, suspended particle, and aggregate-associated bacterial and archaeal communities in the Laptev Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 57, 1–18. doi:10.3354/ame01317.
- Kellogg, C. T. E., & Deming, J. W. (2014). Particle-associated extracellular enzyme activity and bacterial community composition across the Canadian Arctic Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 360–375. doi:10.1111/1574-6941.12330.
- Khandeparker, L., Kuchi, N., Kale, D., & Anil, A. C. (2017). Microbial community structure of surface sediments from a tropical estuarine environment using next generation sequencing. *Ecol. Indic.* 74, 172–181. doi:10.1016/j.ecolind.2016.11.023.
- Kilias, E. S., Wolf, C., & Metfies, K. (2015). Characterizing variability in marine protist communities via ARISA fingerprints—a method evaluation. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 13, 74–80. doi:10.1002/lom3.10008.
- Kim, D. J., Lee, D. I., & Keller, J. (2006). Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour. Technol.* 97, 459–468. doi:10.1016/j.biortech.2005.03.032.
- Kim, J. Y., & Oh, D. C. (2012). *Winogradskyella jejuensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from a brown alga *Carpopeltis affinis*. *J. Microbiol.* 50, 888–892. doi:10.1007/s12275-012-2447-0.
- Kim, Y. O., Kong, H. J., Park, S., Kang, S. J., Kim, W. J., Kim, K. K., *et al.* (2012). *Roseovarius halocynthiae* sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 931–936. doi:10.1099/ijs.0.031674-0.
- Kjørboe, T., Grossart, H. P., Ploug, H., & Tang, K. (2002). Mechanisms and rates of bacterial colonization of sinking aggregates. *Appl. Environmental Microbiol.* 68, 3996–4006. doi:10.1128/AEM.68.8.3996.
- Kjørboe, T., Tang, K., Grossart, H. P., & Ploug, H. (2003). Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: Colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3036–3047. doi:10.1128/AEM.69.6.3036-3047.2003.

- Kirchman, D. L. (2002). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100. doi:10.1016/S0168-6496(01)00206-9.
- Kirchman, D. L., K'nees, E., & Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 599–607. doi:10.1128/aem.49.3.599-607.1985.
- Kirchman, D. L., Malmstrom, R. R., & Cottrell, M. T. (2005). Control of bacterial growth by temperature and organic matter in the Western Arctic. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 52, 3386–3395. doi:10.1016/j.dsr2.2005.09.005.
- Kirchman, D. L., Morán, X. A. G., & Ducklow, H. (2009). Microbial growth in the polar oceans-role of temperature and potential impact of climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 451–459. doi:10.1038/nrmicro2115.
- Kisand, V., Andersson, N., & Wikner, J. (2005). Bacterial freshwater species successfully immigrate to the brackish water environment in the northern Baltic. *Limnol. Oceanogr.* 50, 945–956. doi:10.4319/lso.2005.50.3.0945.
- Knefelkamp, B., Carstens, K., & Wiltshire, K. H. (2007). Comparison of different filter types on *chlorophyll-a* retention and nutrient measurements. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 345, 61–70. doi:10.1016/j.jembe.2007.01.008.
- Konstantinidis, K. T., Braff, J., Karl, D. M., & DeLong, E. F. (2009). Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4,000 meters at station ALOHA in the North Pacific subtropical gyre. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5345–5355. doi:10.1128/AEM.00473-09.
- Kovacs, A., Yacoby, K., & Gophna, U. (2010). A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. *Res. Microbiol.* 161, 192–197. doi:10.1016/j.resmic.2010.01.006.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1489–1497. doi:10.1128/AEM.67.10.4880.
- Kritzberg, E. S., Arrieta, J. M., & Duarte, C. M. (2010). Temperature and phosphorus regulating carbon flux through bacteria in a coastal marine system. *Aquat. Microb. Ecol.* 58, 141–151. doi:10.3354/ame01368.
- Labry, C., Herbland, A., Delmas, D., Laborde, P., Lazure, P., Froidefond, J. M., *et al.* (2001). Initiation of winter phytoplankton blooms within the Gironde plume waters in the Bay of Biscay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 212, 117–130. doi:10.3354/meps212117.
- Ladau, J., Sharpton, T. J., Finucane, M. M., Jospin, G., Kembel, S. W., O'Dwyer, J., *et al.* (2013). Global marine bacterial diversity peaks at high latitudes in winter. *ISME J.* 7, 1669–1677. doi:10.1038/ismej.2013.37.
- Lambert, S., Tragin, M., Lozano, J. C., Ghiglione, J. F., Vaultot, D., Bouget, F. Y., *et al.* (2019). Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. *ISME J.* 13, 388–401. doi:10.1038/s41396-018-0281-z.
- Langenheder, S., Kisand, V., Lindström, E. S., Wikner, J., & Tranvik, L. J. (2004). Growth dynamics within bacterial communities in riverine and estuarine batch cultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, 137–148. doi:10.3354/ame037137.
- Lebaron, P., Catala, P., Fajon, C., Joux, F., Baudart, J., & Bernard, L. (1997). A new sensitive, hole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe

- targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3274–3278. doi:10.1128/aem.63.8.3274-3278.1997.
- Lee, S., & Fuhrman, J. A. (1991). Spatial and temporal variation of natural bacterioplankton assemblages studied by total genomic DNA cross-hybridization. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1277–1287. doi:10.4319/lo.1991.36.7.1277.
- Lee, S., Kang, Y. C., & Fuhrman, J. A. (1995). Imperfect retention of natural bacterioplankton cells by glass fiber filters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119, 285–290. doi:10.3354/meps119285.
- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Loccoz, Y., Okon, Y., *et al.* (2006). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1212–1218. doi:10.1016/j.soilbio.2005.10.007.
- 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. *Environ. Microbiol.* 12, 1899–1912. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02195.x.
- Li, J., Wei, B., Wang, J., Liu, Y., Dasgupta, S., Zhang, L., *et al.* (2015). Variation in abundance and community structure of particle-attached and free-living bacteria in the South China Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 122, 64–73. doi:10.1016/j.dsr2.2015.07.006.
- Lima, F. P., & Wethey, D. S. (2012). Three decades of high-resolution coastal sea surface temperatures reveal more than warming. *Nat. Commun.* 3, 1–13. doi:10.1038/ncomms1713.
- Liu, M., Liu, L., Chen, H., Yu, Z., Yang, J. R., Xue, Y., *et al.* (2019). Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria following a reservoir *Microcystis* bloom. *Sci. Total Environ.* 660, 501–511. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.414.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522. doi:0099-2240/97/\$04.00?0.
- Lønborg, C., Álvarez-Salgado, X. A., Davidson, K., & Miller, A. E. J. (2009). Production of bioavailable and refractory dissolved organic matter by coastal heterotrophic microbial populations. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 82, 682–688. doi:10.1016/j.ecss.2009.02.026.
- Lønborg, C., Cuevas, L. A., Reinthaler, T., Herndl, G. J., Gasol, J. M., Morán, X. A. G., *et al.* (2016). Depth dependent relationships between temperature and ocean heterotrophic prokaryotic production. *Front. Mar. Sci.* 3, 1–9. doi:10.3389/fmars.2016.00090.
- Long, R. A., & Azam, F. (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4975–4983. doi:10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001.
- Longhurst, A. (1995). Seasonal cycles of pelagic production and consumption. *Prog. Oceanogr.* 36, 77–167. doi:10.1016/0079-6611(95)00015-1.
- López-Urrutia, Á., & Morán, X. A. G. (2007). Resource limitation of bacterial production distorts the temperature dependence of oceanic carbon cycling. *Ecology.* 88, 817–822. doi:10.1890/06-1641.
- López-Urrutia, Á., San Martín, E., Harris, R. P., & Irigoien, X. (2006). Scaling the metabolic balance of the oceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8739–8744. doi:10.1073/pnas.0601137103.
- Lovejoy, C., Massana, R., & Pedros-Alio, C. (2006). Diversity and distribution of marine microbial

eukaryotes in the Arctic Ocean and adjacent seas. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3085–3095. doi:10.1128/AEM.72.5.3085.

Lucas, J., Wichels, A., Teeling, H., Chafee, M., Scharfe, M., & Gerds, G. (2015). Annual dynamics of North Sea bacterioplankton: Seasonal variability superimposes short-term variation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–11. doi:10.1093/femsec/fiv099.

Lyons, M. M., Ward, J. E., Gaff, H., Hicks, R. E., Drake, J. M., & Dobbs, F. C. (2010). Theory of island biogeography on a microscopic scale: Organic aggregates as islands for aquatic pathogens. *Aquat. Microb. Ecol.* 60, 1–13. doi:10.3354/ame01417.

Maas, E. W., Law, C. S., Hall, J. A., Pickmere, S., Currie, K. I., Chang, F. H., *et al.* (2013). Effect of ocean acidification on bacterial abundance, activity and diversity in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.* 70, 1–15. doi:10.3354/ame01633.

Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2004). Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4129–4135. doi:10.1128/AEM.70.7.4129.

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. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600. doi:10.1016/S0723-2020(11)80121-9.

Margalef, R. (1994). Diversity and biodiversity-their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. *An Acad. Bras. Cienc.* 66, 3–14.

Mari, X., Kerros, M. E., & Weinbauer, M. G. (2007). Virus attachment to transparent exopolymeric particles along trophic gradients in the southwestern lagoon of New Caledonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5245–5252. doi:10.1128/AEM.00762-07.

Marie, D., Brussaard, C. P. D., Partensky, F., & Vaulot, D. (1999). Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In Robinson, J. P. (ed), *Current protocols in cytometry*, Vol 10. (p.p 11.11.1-11.11.15). New York: John Wiley and Sons. doi:10.1002/0471142956.CY11111\$10.

Martinez, J., Smith, D. C., Steward, G. F., & Azam, F. (1996). Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 10, 223–230. doi:10.3354/ame010223.

Martínez-García, S., & Pinhassi, J. (2018). Advances in microbial ecology from model marine bacteria: beyond the *Escherichia coli* paradigm. In Gasol, J. M and Kirchman, D. L (ed.), *Microbial Ecology of the oceans.* (p.p 243–298). New York, USA: Wiley Blackwell. doi:10.1093/plankt/fby022.

Mary, I., Cummings, D. G., Biegala, I. C., Burkill, P. H., Archer, S. D., & Zubkov, M. V. (2006). Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure at a coastal station in the western English Channel. *Aquat. Microb. Ecol.* 42, 119–126. doi:10.3354/ame042119.

McCaig, A. E., Glover, L. A., & Prosser, J. I. (2001). Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4554–4559. doi:10.1128/AEM.67.10.4554.

McOrist, A. L., Abell, G. C. J., Cooke, C., & Nyland, K. (2008). Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans. *Br. J. Nutr.* 100, 138–146.

doi:10.1017/S0007114507886351.

Meon, B., & Kirchman, D. L. (2001). Dynamics and molecular composition of dissolved organic material during experimental phytoplankton blooms. *Mar. Chem.* 75, 185–199. doi:10.1016/S0304-4203(01)00036-6.

Merzouk, A., Levasseur, M., Scarratt, M., Michaud, S., Lizotte, M., Rivkin, R. B., *et al.* (2008). Bacterial DMSP metabolism during the senescence of the spring diatom bloom in the Northwest Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 369, 1–11. doi:10.3354/meps07664.

Mestre, M., Borrull, E., Sala, M. M., & Gasol, J. M. (2017). Patterns of bacterial diversity in the marine planktonic particulate matter continuum. *ISME J.* 11, 1–12. doi:10.1038/ismej.2016.166.

Metfies, K., Schroeder, F., Hessel, J., Wollschläger, J., Micheller, S., Wolf, C., *et al.* (2016). High-resolution monitoring of marine protists based on an observation strategy integrating automated on-board filtration and molecular analyses. *Ocean Sci.* 12, 1237–1247. doi:10.5194/os-12-1237-2016.

Michna, P., & Woods, M. (2013). RNetCDF- A package for reading and writing NetCDF datasets. *R. J.* 5, 29–36. doi:10.32614/rj-2013-023.

Middelboe, M., & Sondergaard, M. (1993). Bacterioplankton growth yield: Seasonal variations and coupling to substrate lability and β -glucosidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3916–3921. doi:10.1128/aem.59.11.3916-3921.1993.

Milici, M., Vital, M., Tomasch, J., Badewien, T. H., Giebel, H. A., Plumeier, I., *et al.* (2017). Diversity and community composition of particle-associated and free-living bacteria in mesopelagic and bathypelagic Southern Ocean water masses: Evidence of dispersal limitation in the Bransfield Strait. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1080–1095. doi:10.1002/lno.10487.

Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., & Herndl, G. J. (1999). Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518–3525. doi:10.1128/AEM.65.8.3518-3525.1999.

Mohit, V., Archambault, P., Toupoint, N., & Lovejoy, C. (2014). Phylogenetic differences in attached and free-living bacterial communities in a temperate coastal lagoon during summer, revealed via high-throughput 16S rRNA gene sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2071–2083. doi:10.1128/AEM.02916-13.

Mooshammer, M., Wanek, 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. *Front. Microbiol.* 5, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00022.

Morán, X. A. G. (2007). Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: A major contribution to carbon fluxes. *Aquat. Microb. Ecol.* 49, 267–279. doi:10.3354/ame01151.

Morán, X. A. G., Gasol, J. M., Pernice, M. C., Mangot, J. F., Massana, R., Lara, E., *et al.* (2017). Temperature regulation of marine heterotrophic prokaryotes increases latitudinally as a breach between bottom-up and top-down controls. *Glob. Chang. Biol.* 23, 3956–3964. doi:10.1111/gcb.13730.

Morán, X. A. G., López-Urrutia, Á., Calvo-Díaz, A., & Li, W. K. W. (2010). Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Glob. Chang. Biol.* 16, 1137–1144. doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01960.x.

Morán, X. A. G., & Scharek, R. (2015). Photosynthetic parameters and primary production, with focus on large phytoplankton, in a temperate mid-shelf ecosystem. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154, 255–263.

doi:10.1016/j.ecss.2014.12.047.

Morozov, E., Dmitry, P., Smyth, T., Sychev, V., & Grassl, H. (2013). Space-borne study of seasonal, multi- year, and decadal phytoplankton dynamics in the Bay of Biscay. *Internarional J. Remote Sens.* 34, 1297–1331. doi:10.1080/01431161.2012.718462.

Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The Black Queen Hypothesis: Evolution of dependencies through. *MBio.* 3, 1–7. doi:10.1128/mBio.00036-12.

Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M., & Vyverman, W. (2002). Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4740–4750. doi:10.1128/AEM.68.10.4740-4750.2002.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317–322. doi:10.1016/S1369-5274(99)80055-1.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., & Wawer, C. (1997). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In Akkermans, A. D. L. and van Elsas, J. D. (ed.), *Molecular microbial ecology manual*, Vol. 3.4.4. (p.p 1–27). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700. doi:0.1128/aem.59.3.695-700.1993.

Nagata, T. (1986). Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 28–32. doi:10.1128/aem.52.1.28-32.1986.

Nakatsu, C. H. (2007). Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 562-571. doi:10.2136/sssaj2006.0080.

Needham, D. M., Chow, C. E. T., Cram, J. A., Sachdeva, R., Parada, A., & Fuhrman, J. A. (2013). Short-term observations of marine bacterial and viral communities: patterns, connections and resilience. *ISME J.* 7, 1274–1285. doi:10.1038/ismej.2013.19.

Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom. *Nat. Microbiol.* 1, 1–7. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.5.

Neef, A. (1997). Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. PhD Thesis. Munich, Germany: Technische Universität München.

Neufeld, J. D., & Mohn, W. W. (2005). Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environmental Microbiol.* 71, 4893–4896. doi:10.1128/AEM.71.8.4893.

Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A., Gago, J., & Pérez, F. F. (2005). DOM fluorescence, a tracer for biogeochemical processes in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 33–50. doi:10.3354/meps297033.

Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A., & Pérez, F. F. (2006). Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1391–1400. doi:10.4319/lo.2006.51.3.1391.

Noble, R. T., & Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 113–118. doi:10.3354/ame014113.

- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., *et al.* (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178, 5636–5643. doi: 10.1128/jb.178.19.5636-5643.1996.
- Okubo, A., & Sugiyama, S. I. (2009). Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecol. Res.* 24, 1399–1405. doi:10.1007/s11284-009-0602-9.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 337–365. doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.002005.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., *et al.* (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature.* 437, 681–686. doi:10.1038/nature04095.
- Ortega-Retuerta, E., Joux, F., Jeffrey, W. H., & Ghiglione, J. F. (2013). Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). *Biogeosciences.* 10, 2747–2759. doi:10.5194/bg-10-2747-2013.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 1–55. doi:10.2307/4514.
- Padilla, C. C., Ganesh, S., Gantt, S., Huhman, A., Parris, D. J., Sarode, N., *et al.* (2015). Standard filtration practices may significantly distort planktonic microbial diversity estimates. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.00547.
- Parveen, B., Reveilliez, J.-P., Mary, I., Ravet, V., Bronner, G., Mangot, J. F., *et al.* (2011). Diversity and dynamics of free-living and particle-associated *Betaproteobacteria* and *Actinobacteria* in relation to phytoplankton and zooplankton communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 461–476. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01130.x.
- Pedrós-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol.* 14, 257–263. doi:10.1016/j.tim.2006.04.007.
- Pedrós-Alió, C. (2012). The rare bacterial biosphere. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 449–466. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100948.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101. doi:10.1128/AEM.68.6.3094.
- Piccini, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., & Pernthaler, J. (2006). Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6560–6568. doi:10.1128/AEM.01089-06.
- Pinhassi, J., & Hagström, Å. (2000). Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21, 245–256. doi:10.3354/ame021245.
- Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., *et al.* (2004). Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753–6766. doi:10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004.
- Piontek, J., Lunau, M., Händel, N., Borchard, C., Wurst, M., & Engel, A. (2010). Acidification increases microbial polysaccharide degradation in the ocean. *Biogeosciences.* 7, 1615–1624. doi:10.5194/bg-7-1615-2010.
- 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. *J.*

Mar. Syst. 132, 83–94. doi:10.1016/j.jmarsys.2014.01.003.

Polymenakou, P. N., Bertilsson, S., Tselepidis, A., & Stephanou, E. G. (2005). Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. *Microb. Ecol.* 50, 447–462. doi:10.1007/s00248-005-0005-6.

Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3724–3730. doi:10.1128/aem.64.10.3724-3730.1998.

Pomeroy, L. R., Sheldon, J. E., Sheldon, W. M., & Peters, F. (1995). Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117, 259–268. doi:10.3354/meps117259.

Pomeroy, L. R., & Wiebe, W. J. (2001). Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 187–204. doi:10.3354/ame023187.

Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–948. doi:10.4319/lo.1980.25.5.0943.

Powell, S. M., Bowman, J. P., Snape, I., & Stark, J. S. (2003). Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 135–145. doi:10.1016/S0168-6496(03)00135-1.

Prince Manzano, C. S. (2014). Técnicas de cultivo y moleculares para el estudio de las comunidades microbianas en aguas hospitalarias. Tesis Doctoral. Palma de Mallorca, España: Universitat de Illes Balears.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Obtenido de: <http://www.r-project.org/>.

Ramette, A. (2009). Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2495–2505. doi:10.1128/AEM.02409-08.

Rappé, M. S., Vergin, K. L., & Giovannoni, S. J. (2000). Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33, 219–232. doi:10.1016/S0168-6496(00)00064-7.

Regaudie-de-Gioux, A., & Duarte, C. (2012). Temperature dependence of planktonic metabolism in the ocean. *Global Biogeochem. Cycles.* 26, 1–10. doi:10.1029/2010GB003907.

Revilla, M., Iriarte, A., Madariaga, I., & Orive, E. (2000). Bacterial and phytoplankton dynamics along a trophic gradient in a shallow temperate estuary. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 50, 297–313. doi:10.1006/ecss.1999.0576.

Riemann, L., & Grossart, H. P. (2008). Elevated lytic phage production as a consequence of particle colonization by a marine *Flavobacterium* (*Cellulophaga* sp.). *Microb. Ecol.* 56, 505–512. doi:10.1007/s00248-008-9369-8.

Riemann, L., Steward, G. F., & Azam, F. (2000). Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environmental Microbiol.* 66, 578–587. doi:10.1128/AEM.66.2.578-587.2000.

Riemann, L., & Winding, A. (2001). Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb. Ecol.* 42, 274–285. doi:10.1007/s00248-001-0018-8.

Rink, B., Seeberger, S., Martens, T., Duerselen, C. D., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2007). Effects of

- phytoplankton bloom in a coastal ecosystem on the composition of bacterial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 47–60. doi:10.3354/ame048047.
- Rivkin, R. B., Anderson, M. R., & Lajzerowicz, C. (1996). Microbial processes in cold oceans. I. Relationship between temperature and bacterial growth rate. *Aquat. Microb. Ecol.* 10, 243–254. doi:10.3354/ame010243.
- Rivkin, R. B., & Legendre, L. (2001). Biogenic carbon cycling in the upper ocean: Effects of microbial respiration. *Science*. 291, 2398–2400. doi:10.1126/science.291.5512.2398.
- Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22, 238–245. doi:10.1157/13059055.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. 140, 2849–2858. doi:10.1099/00221287-140-10-2849.
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Álvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M., & Marrasé, C. (2011). Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7490–7498. doi:10.1128/AEM.00200-11.
- Rösel, S., & Grossart, H. P. (2012). Contrasting dynamics in activity and community composition of free-living and particle-associated bacteria in spring. *Aquat. Microb. Ecol.* 66, 169–181. doi:10.3354/ame01568.
- Ruan, Q., Dutta, D., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Fuhrman, J. A., & Sun, F. (2006a). Local similarity analysis reveals unique associations among marine bacterioplankton species and environmental factors. *Bioinformatics*. 22, 2532–2538. doi:10.1093/bioinformatics/btl417.
- Ruan, Q., Steele, J. A., Schwalbach, M. S., Fuhrman, J. A., & Sun, F. (2006b). A dynamic programming algorithm for binning microbial community profiles. *Bioinformatics*. 22, 1508–1514. doi:10.1093/bioinformatics/btl114.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., *et al.* (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol.* 5, 0398–0431. doi:10.1371/journal.pbio.0050077.
- Salazar, G., Cornejo-Castillo, F. M., Borrull, E., Díez, C., Lara, E., Vaqué, D., *et al.* (2015). Particle-association lifestyle is a phylogenetically conserved trait in bathypelagic prokaryotes. *Mol. Ecol.*, 1–15. doi:10.1111/mec.13419.
- Sampou, P., & Kemp, W. M. (1994). Factors regulating plankton community respiration in Chesapeake Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110, 249–258. doi:10.3354/meps110249.
- Sánchez, F., & Olaso, I. (2004). Effects of fisheries on the Cantabrian Sea shelf ecosystem. *Ecol. Modell.* 172, 151–174. doi:10.1016/j.ecolmodel.2003.09.005.
- Sánchez, O., Garrido, L., Forn, I., Massana, R., Maldonado, M. I., & Mas, J. (2011). Molecular characterization of activated sludge from a seawater-processing wastewater treatment plant. *Microb. Biotechnol.* 4, 628–642. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00256.x.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., & Webb, E. A. (2014). The role of B vitamins in marine biogeochemistry. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 6, 339–367. doi:10.1146/annurev-marine-

120710-100912.

Sapp, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerdt, G. (2007). Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 622–637. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00238.x.

Sarmiento, H., & Gasol, J. M. (2012). Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* 14, 2348–2360. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02787.x.

Sarmiento, 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?. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 2137–2149. doi:10.1098/rstb.2010.0045.

Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S., & Tréguer, P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review. *J. Sea Res.* 53, 25–42. doi:10.1016/j.seares.2004.01.007.

Satinsky, B. M., Crump, B. C., Smith, C. B., Sharma, S., Zielinski, B. L., Doherty, M., *et al.* (2014). Microspatial gene expression patterns in the Amazon River Plume. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 11085–11090. doi:10.1073/pnas.1402782111.

Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C., & Massana, R. (2003). Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 163–174. doi:10.3354/ame031163.

Schauer, M., Massana, R., & Pedrós-Alió, C. (2000). Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33, 51–59. doi:10.1016/S0168-6496(00)00043-X.

Schiel, D. R., Steinbeck, J. R., & Foster, M. S. (2004). Ten years of induced ocean warming causes comprehensive changes in marine benthic communities. *Ecology* 85, 1833–1839. doi:10.1890/03-3107.

Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., & Amann, R. (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3268–3273. doi:10.1128/aem.63.8.3268-3273.1997.

Selje, N., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature*. 427, 445–448. doi:10.1038/nature02272.

Serret, P., Fernández, E., Sostres, J. A., & Anadón, R. (1999). Seasonal compensation of microbial production and respiration in a temperate sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187, 43–57. doi:10.3354/meps187043.

Šestanović, S., Šolić, M., Krstulović, N., & Ninčević, Ž. (2004). Seasonal and vertical distribution of planktonic bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the middle Adriatic Sea. *Helgol. Mar. Res.* 58, 83–92. doi:10.1007/s10152-004-0172-8.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite.

Short, S. M., & Suttle, C. A. (2002). Sequence analysis of marine virus communities reveals that groups of related algal viruses are widely distributed in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1290–1296. doi:10.1128/AEM.68.3.1290-1296.2002.

Sibbald, M. J., & Albright, L. J. (1988). Aggregated and free bacteria as food sources for heterotrophic microflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 613–616. doi:10.1128/aem.54.2.613-616.1988.

- Sikorski, J., & Nevo, E. (2007). Patterns of thermal adaptation of *Bacillus simplex* to the microclimatically contrasting slopes of "Evolution Canyons" I and II, Israel. *Environ. Microbiol.* 9, 716–726. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01193.x.
- Simon, H. M., Smith, M. W., & Herfort, L. (2014). Metagenomic insights into particles and their associated microbiota in a coastal margin ecosystem. *Front. Microbiol.* 5, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2014.00466.
- Simon, M., & Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201–213. doi:10.3354/meps051201.
- Simon, M., Grossart, H. P., Schweitzer, B., & Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 175–211. doi:10.3354/ame028175.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., Gaskins, H. R., & Mackie, R. I. (2000). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4705–4714. doi:10.1128/AEM.66.11.4705-4714.2000.
- Sinsabaugh, R. L., & Shah, J. J. F. (2012). Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 313–343. doi:10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414.
- Sintes, E., Witte, H., Stodderegger, K., Steiner, P., & Herndl, G. J. (2013). Temporal dynamics in the free-living bacterial community composition in the coastal North Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 413–424. doi:10.1111/1574-6941.12003.
- Smith, M. W., Zeigler Allen, L., Allen, A. E., Herfort, L., & Simon, H. M. (2013). Contrasting genomic properties of free-living and particle-attached microbial assemblages within a coastal ecosystem. *Front. Microbiol.* 4, 1–20. doi:10.3389/fmicb.2013.00120.
- Smith, T. P., Thomas, T. J. H., García-Carreras, B., Sal, S., Yvon-Durocher, G., Bell, T., et al. (2019). Community-level respiration of prokaryotic microbes may rise with global warming. *Nat. Commun.* 10, 1–11. doi:10.1038/s41467-019-13109-1.
- Smythe-Wright, D., Daniel, A., Boswell, S., Purcell, D., Hartman, M., Hartman, S., et al. (2014). Phytoplankton and pigment studies in the Bay of Biscay and English Channel. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 106, 76–86. doi:10.1016/j.dsr2.2013.12.015.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12115-121220. doi:10.1073/pnas.0605127103.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., & Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1079–1084. doi:10.1128/aem.54.5.1079-1084.1988.
- Steele, J. A., Countway, P. D., Xia, L., Vigil, P. D., Beman, J. M., Kim, D. Y., et al. (2011). Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *ISME J.* 5, 1414–1425. doi:10.1038/ismej.2011.24.
- Stein, J. L., Marsh, T. L., Wu, K. Y., Shizuya, H. & DeLong, E. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archeon. *J. Bacteriol.* 178, 591–599. doi:10.1128/jb.178.3.591-599.1996.
- Stocker, R. (2012). Marine microbes see a sea of gradients. *Science.* 338, 628–633. doi:10.1126/science.1208929.
- Suter, E. A., Pachiadaki, M., Taylor, G. T., Astor, Y., & Edgcomb, V. P. (2018). Free-living

chemoautotrophic and particle-attached heterotrophic prokaryotes dominate microbial assemblages along a pelagic redox gradient. *Environ. Microbiol.* 20, 693–712. doi:10.1111/1462-2920.13997.

Suttle, C. A. (2007). Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812. doi:10.1038/nrmicro1750.

Suzuki, M., Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (1998). Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4522–4529. doi:10.1128/aem.64.11.4522-4529.1998.

Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630. doi:10.1128/aem.62.2.625-630.1996.

Suzuki, M. T., Rappé, M. S., Haimberger, Z. W., Winfried, H., Adair, N., Ströbel, J., *et al.* (1997). Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 983–989. doi:10.1128/aem.63.3.983-989.1997.

Swan, B. K., Tupper, B., Sczyrba, A., Lauro, F. M., Martinez-Garcia, M., González, J. M., *et al.* (2013). Prevalent genome streamlining and latitudinal divergence of planktonic bacteria in the surface ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11463–11468. doi:10.1073/pnas.1304246110.

Tada, Y., Nakaya, R., Goto, S., Yamashita, Y., & Suzuki, K. (2017). Distinct bacterial community and diversity shifts after phytoplankton-derived dissolved organic matter addition in a coastal environment. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 495, 119–128. doi:10.1016/j.jembe.2017.06.006.

Tada, Y., Taniguchi, A., Nagao, I., Miki, T., Uematsu, M., Tsuda, A., *et al.* (2011). Differing growth responses of major phylogenetic groups of marine bacteria to natural phytoplankton blooms in the Western North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4055–4065. doi:10.1128/AEM.02952-10.

Taguchi, S., & Laws, E. A. (1988). On the microparticles which pass through glass fiber filter type GF/F in coastal and open waters. *J. Plankton Res.* 10, 999–1008. doi:10.1093/plankt/10.5.999.

Tang, X., Chao, J., Gong, Y., Wang, Y., Wilhelm, S. W., & Gao, G. (2017). Spatiotemporal dynamics of bacterial community composition in large shallow eutrophic Lake Taihu: High overlap between free-living and particle-attached assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1366–1382. doi:10.1002/lno.10502.

Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennis, C. M., *et al.* (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., Bennis, C. M., Krüger, K., Chafee, M., Kappelmann, L., *et al.* (2016). Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. *Elife* 5, 1–31. doi:10.7554/eLife.11888.

Teira, E., Gasol, J. M., Aranguren-Gassis, M., Fernández, A., Gonzalez, J., Lekunberri, I., *et al.* (2008). Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem. *Environ. Microbiol.* 10, 906–917. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01509.x.

Teira, E., Nieto-Cid, M., & Álvarez-Salgado, X. A. (2009). Bacterial community composition and colored dissolved organic matter in a coastal upwelling ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.* 55, 131–142. doi:10.3354/ame01290.

Ter Braak, C. J. F. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*. 67, 1167–1179. doi:10.2307/1938672.

Thies, J. E. (2007). Molecular methods for studying soil ecology. In Nautiyal, C. S. and Dion, P. (ed.),

Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence (p.p 411-436). Berlin Heidelberg. doi:10.1016/B978-0-08-047514-1.50008-1.

Tonkin, J. D., Bogan, M. T., Bonada, N., Rios-Touma, B., & Lytle, D. A. (2017). Seasonality and predictability shape temporal species diversity. *Ecology*, 98, 1201–1216. doi:10.1002/ecy.1761.

Toolan, T. (2001). Coulometric carbon-based respiration rates and estimates of bacterioplankton growth efficiencies in Massachusetts Bay. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1298–1308. doi:10.4319/lo.2001.46.6.1298.

Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R., & Goksoyr, J. (1990). Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 776–781. doi:10.1128/aem.56.3.776-781.1990.

Tringe, S. G., & Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 442–446. doi:10.1016/j.mib.2008.09.011.

Turley, C. M., & Stutt, E. D. (2000). Depth-related cell-specific bacterial leucine incorporation rates on particles and its biogeochemical significance in the Northwest Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* 45, 419–425. doi:10.4319/lo.2000.45.2.0419.

Turner, J. T. (2015). Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. *Prog. Oceanogr.* 130, 205–248. doi:10.1016/j.pocean.2014.08.005.

Unanue, M., Ayo, B., Azúa, I., Barcina, I., & Iriberry, J. (1992). Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microb. Ecol.* 23, 27–39. doi:10.1007/BF00165905.

Unanue, M., Azúa, I., Arrieta, J. M., Labirua-Iturburu, A., Egea, L., & Iriberry, J. (1998). Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles: Cleavage of peptides and uptake of amino acids. *Microb. Biotechnol.* 35, 136–146. doi:10.1007/s002489900068.

Vaquer-Sunyer, R., Conley, D. J., Muthusamy, S., Lindh, M. V., Pinhassi, J., & Kritzberg, E. S. (2015). Dissolved organic nitrogen inputs from wastewater treatment plant effluents increase responses of planktonic metabolic rates to warming. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11411–11420. doi:10.1021/acs.est.5b00674.

Varela, M. (1996). Phytoplankton ecology in the Bay of Biscay. *Sci. Mar.* 60, 45–53.

Vázquez-Domínguez, E., Vaqué, D., & Gasol, J. M. (2007). Ocean warming enhances respiration and carbon demand of coastal microbial plankton. *Glob. Chang. Biol.* 13, 1327–1334. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01377.x.

Vetter, Y. A., & Deming, J. W. (1994). Extracellular enzyme activity in the Arctic northeast water polynya. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114, 23–34. doi:10.3354/meps114023.

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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262, 43–53. doi:10.3354/meps262043.

Wagner-Döbler, I., Rheims, H., Felske, A., Pukall, R., & Tindall, B. J. (2003). *Jannaschia helgolandensis* gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine *Roseobacter* clade from the North Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 731–738. doi:10.1099/ijs.0.02377-0.

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.

Ward, C. S., Yung, C. M., Davis, K. M., Blinebry, S. K., Williams, T. C., Johnson, Z. I., et al. (2017).

- Annual community patterns are driven by seasonal switching between closely related marine bacteria. *ISME J.* 11, 1412–1422. doi:10.1038/ismej.2017.4.
- Wasmund, N., Nausch, G., & Feistel, R. (2013). Silicate consumption: An indicator for long-term trends in spring diatom development in the Baltic Sea. *J. Plankton Res.* 35, 393–406. doi:10.1093/plankt/fbs101.
- White, P. A., Kalff, J., Rasmussen, J. B., & Gasol, J. M. (1991). The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb. Ecol.* 21, 99–118. doi:10.1007/BF02539147.
- Wintzingerode, F. V., Göbel, U. B., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229. doi:10.1016/S0168-6445(97)00057-0.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.
- Yager, P. L., Connelly, T. L., Mortazavi, B., Wommack, K. E., Bano, N., Bauer, J. E., *et al.* (2001). Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures. *Limnol. Oceanogr.* 46, 790–801. doi:10.4319/lo.2001.46.4.0790.
- Yamashita, Y., & Tanoue, E. (2003). Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Mar. Chem.* 82, 255–271. doi:10.1016/S0304-4203(03)00073-2.
- Yannarell, A. C., & Triplett, E. W. (2005). Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 227–239. doi:10.1128/AEM.71.1.227.
- Yung, C. M., Ward, C. S., Davis, K. M., Johnson, Z. I., & Hunt, D. E. (2016). Insensitivity of diverse and temporally-variable particle-associated microbial communities to bulk seawater environmental parameters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3431–3437. doi:10.1128/AEM.00395-16.
- Yung, C. M., Vereen, M. K., Herbert, A., Davis, K. M., Yang, J., Kantorowska, A., *et al.* (2015). Thermally adaptive tradeoffs in closely related marine bacterial strains. *Environ. Microbiol.* 17, 2421–2429. doi:10.1111/1462-2920.12714.
- Yvon-Durocher, G., Caffrey, J. M., Cescatti, A., Dossena, M., del Giorgio, P., Gasol, J. M., *et al.* (2012). Reconciling the temperature dependence of respiration across timescales and ecosystem types. *Nature.* 487, 472–476. doi:10.1038/nature11205.
- Zeglin, L. H. (2015). Stream microbial diversity in response to environmental changes: Review and synthesis of existing research. *Front. Microbiol.* 6, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2015.00454.
- Zeng, Y., Zou, Y., Chen, B., Grebmeier, J. M., Li, H., Yu, Y., *et al.* (2011). Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea. *Polar Biol.* 34, 907–919. doi:10.1007/s00300-010-0947-0.
- Zhang, R., Liu, B., Lau, S. C. K., Ki, J. S., & Qian, P. Y. (2007). Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 496–508. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00353.x.
- Zoßell C. E. (1941). Studies on marine bacteria I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* 4, 42-75.

Zoßell, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol Rev.* 10 (1-2), 1-49.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Valores de las variables abióticas del ecosistema: T^a: temperatura de superficie del agua (°C); ML: minutos de luz (min); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); PO₄³⁻: concentración de fosfato (μM); SiO₄⁴⁻: concentración de silicato (μM); PROT: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); HUM: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); COD: concentración de carbono orgánico disuelto (μM). n.d: no hay dato.

MUESTRA	T ^a (°C)	ML (min)	NO ₃ ⁻ (μM)	PO ₄ ³⁻ (μM)	SiO ₄ ⁴⁻ (μM)	PROT (T)(QSU)	HUM (M+C)(QSU)	COD (μM C)
F11	13,0	662	6,68	0,38	3,70	2,20	3,02	83,00
M11	12,5	698	6,50	0,40	3,62	2,54	3,13	85,00
A11	14,0	784	2,44	0,25	1,64	2,65	2,56	84,90
J11	18,5	925	1,60	0,18	1,50	2,33	2,71	166,30
Ju11	20,5	910	0,35	0,35	1,70	2,39	1,81	n.d
Ag11	21,3	837	1,00	0,08	2,45	2,34	1,99	n.d
S11	20,9	714	0,65	0,50	5,25	2,27	2,52	n.d
O11	17,1	633	0,75	0,10	5,75	3,28	3,46	253,11
N11	16,1	568	2,40	0,20	2,40	2,52	3,04	324,03
E12	13,3	576	5,05	0,20	3,95	1,57	3,43	75,47
F12	11,9	647	4,55	0,25	3,75	1,66	3,59	81,54
M12	12,4	730	1,65	0,18	2,00	1,75	3,42	79,20
A12	12,0	852	0,40	0,08	0,80	2,03	4,31	412,74
Ma12	15,3	907	1,05	0,25	4,25	1,66	2,84	170,98
J12	17,5	925	0,45	0,20	1,65	3,86	2,73	138,25
Ju12	19,4	903	0,40	0,18	2,00	2,19	1,99	217,18
Ag12	20,7	876	0,40	0,16	5,60	3,62	2,67	154,74
O12	19,4	700	1,45	0,18	1,55	2,58	1,52	137,92
N12	15,9	571	0,40	0,08	1,18	4,47	3,42	116,25
D12	13,3	542	4,75	0,16	9,00	1,83	4,20	107,41
F13	12,3	649	5,75	0,45	6,75	2,59	3,80	111,77
M13	11,6	714	2,75	0,28	2,30	2,09	2,79	114,20
A13	13,1	811	1,85	0,22	2,20	3,60	n.d	128,78
J13	14,7	918	0,85	0,35	2,95	6,08	3,63	150,86
Ju13	18,8	920	0,80	0,10	2,05	6,02	3,56	137,22
Ag13	21,0	822	0,50	0,08	7,65	n.d	n.d	248,78
S13	20,2	721	0,50	0,08	3,15	2,23	1,71	98,60

Tabla suplementaria 2. Valores de las variables bióticas (l) del ecosistema: CL a: concentración de clorofila a ($\mu\text{g l}^{-1}$); Syn: densidad de *Synechococcus* (10^7 cél l^{-1}); Pro: densidad de *Prochlorococcus* (10^7 cél l^{-1}); PV: densidad partículas víricas (10^9 pv l^{-1}); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10^5 cél l^{-1}); DB total: densidad bacterias totales (10^8 cél l^{-1}); DB LI: densidad bacterias de vida libre (10^8 cél l^{-1}). n.d: no hay dato.

MUESTRA	CL a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Syn (10^7 cél l^{-1})	Pro (10^7 cél l^{-1})	PV (10^9 pv l^{-1})	NFH (10^5 cél l^{-1})	DB total (10^8 cél l^{-1})	DB LI (10^8 cél l^{-1})
F11	1,88	0,06	0	0,17	14,00	3,12	2,62
M11	2,64	0,18	0	4,58	7,65	2,58	5,05
A11	2,27	0,01	0	7,83	56,04	8,97	3,51
J11	0,23	0,44	0	99,96	41,20	10,73	9,81
Ju11	0,26	13,89	0	20,70	43,56	17,90	5,73
Ag11	0,16	5,75	0,13	36,98	3,93	9,19	4,56
S11	0,59	1,42	1,93	38,50	18,14	21,00	4,12
O11	0,81	2,29	4,76	32,69	9,20	7,69	4,33
N11	1,24	1,12	3,01	20,10	5,12	8,76	6,21
E12	0,37	0,21	0	12,82	2,84	9,78	1,42
F12	1,12	0,64	0	9,58	6,51	15,78	9,53
M12	1,13	0,12	0	18,31	5,53	11,49	7,24
A12	0,25	0,40	0	17,48	6,25	8,24	7,31
Ma12	0,39	0,29	0	15,71	3,20	2,19	1,03
J12	0,25	1,52	0	16,40	6,20	12,10	5,91
Ju12	0,19	2,42	0	15,11	10,02	12,52	8,59
Ag12	0,37	3,00	0	14,43	6,30	10,13	8,50
O12	0,28	6,29	5,81	11,36	7,80	12,05	6,06
N12	1,15	1,08	1,33	12,11	3,88	9,09	7,58
D12	1,97	0,64	0,21	19,96	2,79	7,10	3,76
F13	2,93	1,90	0	16,95	8,22	8,46	6,13
M13	0,24	0,04	0	17,16	3,51	9,09	2,83
A13	0,54	0,08	0	21,20	3,62	5,64	2,68
J13	0,70	6,82	0	59,59	2,10	5,95	4,93
Ju13	0,14	5,86	0	20,38	4,91	13,89	12,69
Ag13	0,37	20,87	0	12,70	5,01	16,24	11,90
S13	0,33	n.d	n.d	23,26	19,58	11,04	9,10

Tabla suplementaria 3. Valores de las variables bióticas (II) del ecosistema: PB: producción bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); RB: respiración bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); DBC: demanda bacteriana de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); ECB: eficiencia de crecimiento bacteriana (%).

MUESTRA	PB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	RB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	DBC ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	ECB (%)
F11	33,30	51,09	84,00	39,46
M11	36,56	85,50	121,00	29,48
A11	16,52	80,21	97,00	17,08
J11	43,82	101,46	153,00	33,57
Ju11	38,94	81,14	120,00	32,43
Ag11	37,33	117,69	155,00	24,08
S11	14,00	64,00	78,00	17,68
O11	25,44	54,52	80,00	31,82
N11	17,56	65,51	83,00	21,14
E12	14,56	30,81	45,00	32,09
F12	24,74	100,44	125,00	19,77
M12	37,17	57,52	95,00	39,25
A12	11,59	76,23	88,00	13,20
Ma12	54,66	70,36	125,00	43,72
J12	92,09	113,69	206,00	44,75
Ju12	45,26	74,19	119,00	37,89
Ag12	48,72	104,11	153,00	31,88
O12	24,08	65,45	90,00	26,90
N12	35,82	57,08	93,00	38,55
D12	19,89	49,13	69,00	28,82
F13	31,18	100,80	131,98	23,62
M13	15,07	17,20	32,27	46,71
A13	17,42	75,78	93,21	18,69
J13	82,36	122,88	205,24	40,13
Ju13	47,52	58,26	105,78	44,92
Ag13	50,34	93,78	144,12	34,93
S13	10,34	76,19	86,52	11,95

Tabla suplementaria 4. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables abióticas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables abióticas son: T^a: temperatura de superficie del agua (°C); ML: minutos de luz (min); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); PO₄³⁻: concentración de fosfato (μM); PROT: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); HUM: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); COD: concentración de carbono orgánico disuelto (μM).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	0,43	0	0,008	0,006	32
COD	NO ₃ ⁻	-0,55	0	0,006	0,022	32
T ^a	NO ₃ ⁻	-0,61	0	0,001	0,011	32
T ^a	COD	0,52	1	0,004	0,018	31
T ^a	HUM	-0,66	0	0,001	0,011	31
ML	NO ₃ ⁻	-0,51	0	0,001	0,001	32
ML	COD	0,25	-1	0,039	0,008	30
ML	PROT	0,37	0	0,049	0,017	22
ML	HUM	-0,30	0	0,001	0,043	31
ML	T ^a	0,35	-1	0,001	0,023	31
EHU47	PROT	0,53	1	0,007	0,009	29
EHU47	T ^a	0,33	-1	0,004	0,029	30
EHU47	ML	0,59	0	0,002	0,049	30
DES14	HUM	-0,03	1	0,032	0,021	19
EHU46	COD	0,39	0	0,018	0,013	14
EHU46	T ^a	0,46	1	0,008	0,003	29
EHU45	NO ₃ ⁻	-0,50	0	0,018	0,002	32
EHU45	PROT	0,45	0	0,011	0,004	31
EHU45	HUM	-0,58	0	0,005	0,008	31
EHU45	T ^a	0,65	0	0,001	0,039	32
EHU45	ML	0,55	0	0,001	0,039	31
EHU43	COD	-0,08	1	0,043	0,024	31
EHU43	ML	0,01	-1	0,021	0,017	24
EHU5	NO ₃ ⁻	0,21	1	0,043	0,024	28
EHU5	COD	-0,18	0	0,004	0,069	28
EHU5	HUM	0,60	0	0,003	0,062	30
EHU5	T ^a	-0,62	0	0,001	0,039	29
EHU5	ML	-0,28	2	0,003	0,006	28
EHU40	NO ₃ ⁻	0,43	-1	0,033	0,006	29
EHU40	COD	-0,25	-1	0,008	0,010	28
EHU40	PROT	-0,52	0	0,004	0,001	24
EHU40	HUM	0,37	-1	0,043	0,017	24
EHU40	T ^a	-0,32	-1	0,001	0,039	29
EHU40	ML	-0,60	0	0,001	0,039	30
EHU38	PROT	-0,40	0	0,014	0,010	24
EHU38	HUM	0,57	0	0,005	0,049	24
EHU38	T ^a	-0,46	-1	0,002	0,049	29
EHU38	ML	-0,29	0	0,001	0,039	30
EHU37	COD	0,01	-1	0,003	0,050	31

Tabla suplementaria 4. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU34	NO ₃ ⁻	0,54	0	0,011	0,012	32
DES10	NO ₃ ⁻	-0,25	0	0,036	0,022	30
EHU4	NO ₃ ⁻	-0,46	0	0,012	0,004	32
EHU4	PROT	0,31	-1	0,025	0,038	22
EHU4	HUM	-0,39	1	0,033	0,013	30
EHU4	T ^a	0,35	0	0,002	0,049	25
EHU4	ML	0,47	0	0,001	0,039	29
EHU31	PROT	0,35	0	0,013	0,023	29

Tabla suplementaria 5. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (I) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (I) son: CL *a*: concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g l}^{-1}$); *Syn*: densidad de *Synechococcus* (10^7 cél l^{-1}); *Pro*: densidad de *Prochlorococcus* (10^7 cél l^{-1}); PV: densidad partículas víricas (10^9 pv l^{-1}); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10^5 cél l^{-1}).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
CL <i>a</i>	<i>Syn</i>	-0,57	0	0,001	0,011	32
NFH	CL <i>a</i>	-0,16	-1	0,024	0,039	28
EHU47	<i>Syn</i>	0,27	0	0,001	0,039	30
DES14	CL <i>a</i>	-0,26	2	0,001	0,039	17
DES11	<i>Pro</i>	0,18	-1	0,011	0,012	20
EHU46	CL <i>a</i>	-0,47	0	0,003	0,003	32
EHU46	PV	0,44	0	0,012	0,005	22
EHU45	<i>Syn</i>	0,54	-1	0,001	0,039	31
EHU45	CL <i>a</i>	-0,43	0	0,028	0,007	32
EHU45	NFH	0,40	-1	0,048	0,011	29
EHU43	CL <i>a</i>	0,35	-1	0,018	0,022	28
EHU43	PV	-0,51	0	0,030	0,001	32
EHU43	NFH	0,37	0	0,008	0,018	31
EHU42	<i>Pro</i>	0,43	0	0,020	0,007	25
EHU5	<i>Syn</i>	-0,31	0	0,026	0,041	27
EHU5	<i>Pro</i>	0,06	2	0,030	0,020	24
EHU5	CL <i>a</i>	0,63	0	0,001	0,039	28
EHU5	NFH	-0,26	0	0,011	0,012	32
EHU38	CL <i>a</i>	0,40	0	0,043	0,010	21
EHU37	CL <i>a</i>	-0,33	0	0,028	0,030	32
EHU35	CL <i>a</i>	-0,30	0	0,037	0,047	32
EHU35	NFH	-0,15	2	0,044	0,024	26
EHU34	CL <i>a</i>	0,33	0	0,041	0,029	27
DES9	<i>Pro</i>	0,22	-1	0,002	0,049	30
EHU4	CL <i>a</i>	-0,44	0	0,001	0,039	32
EHU31	PV	-0,13	1	0,002	0,049	31

Tabla suplementaria 5. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU31	NFH	0,31	2	0,048	0,038	30
EHU10	PV	0,31	0	0,025	0,041	32
DES1	PV	0,53	0	0,008	0,001	29

Tabla suplementaria 6. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (II) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (II) son: PB: producción bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); RB: respiración bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); DBC: demanda bacteriana de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); ECB: eficiencia de crecimiento bacteriana (%).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
PB	ECB	0,70	0	0,001	0,013	30
PB	DBC	0,77	0	0,001	0,013	31
RB	DBC	0,88	0	0,001	0,013	31
RB	PB	0,45	0	0,038	0,053	28
EHU47	PB	0,47	0	0,041	0,003	30
DES14	DBC	0,09	-1	0,006	0,030	20
EHU45	DBC	0,38	1	0,008	0,015	31
EHU45	PB	0,19	1	0,017	0,015	28
EHU45	RB	0,43	0	0,032	0,006	32
EHU5	RB	-0,15	1	0,036	0,022	31
EHU40	DBC	-0,34	0	0,039	0,025	31
EHU40	RB	-0,26	0	0,031	0,021	31
EHU37	DBC	0,43	1	0,042	0,006	29
EHU4	DBC	0,24	-1	0,016	0,015	26
EHU4	RB	0,26	0	0,007	0,009	30

Tabla suplementaria 7. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias adheridas a partículas. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU45	EHU47	0,45	-1	0,002	0,049	29
EHU43	DES14	-0,08	-1	0,001	0,039	27
EHU42	DES11	0,08	1	0,032	0,021	25
EHU5	EHU45	-0,50	0	0,017	0,002	30
EHU40	EHU5	0,09	2	0,039	0,023	21
EHU38	EHU5	0,52	0	0,026	0,001	25
EHU38	EHU40	0,49	0	0,006	0,002	32
EHU37	DES14	0,19	1	0,005	0,008	16
EHU37	EHU46	0,37	-1	0,021	0,017	29

Tabla suplementaria 7. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU37	EHU44	0,09	-1	0,045	0,025	23
EHU36	EHU40	0,44	0	0,036	0,005	22
EHU36	EHU38	0,38	0	0,035	0,014	32
EHU 36	DES10	0,30	1	0,005	0,008	17
EHU35	EHU46	0,45	1	0,012	0,004	31
EHU34	EHU5	0,35	0	0,001	0,039	27
DES10	DES14	-0,14	2	0,023	0,018	17
DES10	DES11	0,29	-1	0,011	0,012	16
DES9	DES11	0,69	0	0,020	0,017	32
DES9	DES10	0,50	0	0,007	0,002	17
EHU4	EHU47	0,38	0	0,029	0,015	29
EHU4	EHU46	0,49	-1	0,024	0,002	16
EHU4	EHU40	-0,48	1	0,015	0,003	29
EHU4	EHU38	-0,37	0	0,014	0,018	29
EHU4	EHU35	-0,09	2	0,028	0,020	23
EHU31	EHU47	0,35	-1	0,001	0,039	29
EHU31	EHU45	0,27	-1	0,016	0,015	29
EHU31	EHU43	0,28	2	0,015	0,014	14
EHU31	EHU38	-0,21	1	0,039	0,023	31
EHU31	EHU35	-0,25	1	0,007	0,009	31
EHU31	EHU34	0,32	1	0,030	0,034	31
EHU31	EHU4	0,49	0	0,005	0,002	29
DES1	EHU47	0,03	2	0,034	0,022	24
DES1	EHU45	-0,41	0	0,031	0,008	30
DES1	EHU5	0,54	0	0,008	0,098	32

Tabla suplementaria 8. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables abióticas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias de vida libre. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables abióticas son: T^a: temperatura de superficie del agua (°C); ML: minutos de luz (min); NO₃⁻: concentración de nitrato (µM); PO₄³⁻: concentración de fosfato (µM); PROT: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); HUM: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); COD: concentración de carbono orgánico disuelto (µM).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	0,43	0	0,008	0,006	32
COD	NO ₃ ⁻	-0,55	0	0,006	0,022	32
T ^a	NO ₃ ⁻	-0,61	0	0,001	0,011	32
T ^a	COD	0,52	1	0,004	0,018	31
T ^a	HUM	-0,66	0	0,001	0,011	31
ML	NO ₃ ⁻	-0,51	0	0,001	0,001	32
ML	COD	0,25	-1	0,039	0,008	30
ML	PROT	0,37	0	0,049	0,017	22

Tabla suplementaria 8. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
ML	HUM	-0,30	0	0,001	0,043	31
ML	Tª	0,35	-1	0,001	0,023	31
EHU67	NO ₃ ⁻	-0,54	0	0,004	0,007	32
EHU67	HUM	-0,34	1	0,006	0,025	30
EHU67	PROT	0,14	2	0,001	0,021	29
EHU67	Tª	0,61	0	0,001	0,039	31
EHU67	ML	0,60	0	0,001	0,039	32
EHU66	PROT	0,42	1	0,001	0,039	21
EHU66	Tª	0,06	0	0,040	0,043	27
EHU17	Tª	0,55	0	0,010	0,011	32
EHU17	ML	0,23	2	0,004	0,069	30
EHU64	PROT	0,20	1	0,002	0,049	21
EHU64	Tª	0,03	0	0,042	0,041	23
EHU63	PROT	0,25	1	0,003	0,006	21
EHU63	Tª	0,02	0	0,043	0,039	26
EHU62	PROT	0,19	1	0,022	0,018	21
EHU62	HUM	-0,31	0	0,039	0,039	24
EHU62	Tª	0,46	0	0,017	0,004	22
EHU62	ML	0,30	1	0,001	0,039	24
EHU61	PROT	0,52	1	0,004	0,007	21
EHU61	Tª	0,05	0	0,040	0,031	24
EHU61	ML	0,03	0	0,042	0,033	23
EHU11	COD	-0,44	0	0,034	0,006	32
DES7	PROT	0,21	-1	0,006	0,008	19
EHU58	PROT	-0,44	-1	0,001	0,039	22
EHU58	Tª	-0,32	0	0,048	0,034	32
EHU58	ML	-0,43	0	0,042	0,006	32
DES13	ML	-0,07	2	0,034	0,025	19
EHU3	COD	-0,47	0	0,012	0,003	28
EHU3	PROT	-0,57	0	0,003	0,006	24
EHU3	HUM	0,22	0	0,044	0,024	19
EHU3	Tª	-0,36	0	0,031	0,021	29
EHU3	ML	-0,28	0	0,018	0,016	30
EHU57	PROT	-0,35	0	0,001	0,039	22
EHU57	Tª	-0,08	0	0,046	0,033	21
EHU57	ML	-0,46	0	0,021	0,003	30
EHU56	PROT	-0,14	2	0,035	0,022	18
EHU50	COD	0,25	1	0,003	0,006	27
EHU48	PROT	-0,09	1	0,037	0,047	20
EHU48	ML	-0,33	1	0,021	0,030	26

Tabla suplementaria 9. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (I) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias de vida libre. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (I) son: CL a: concentración de clorofila a ($\mu\text{g l}^{-1}$); *Syn*: densidad de *Synechococcus* (10^7 cél l^{-1}); *Pro*: densidad de *Prochlorococcus* (10^7 cél l^{-1}); PV: densidad partículas víricas (10^9 pv l^{-1}); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10^5 cél l^{-1}).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
CL a	<i>Syn</i>	-0,57	0	0,001	0,011	32
NFH	CL a	-0,16	-1	0,024	0,039	28
EHU68	CL a	-0,26	0	0,039	0,023	22
EHU67	<i>Syn</i>	0,59	0	0,001	0,039	31
EHU67	CL a	-0,51	0	0,001	0,039	32
EHU67	<i>Pro</i>	-0,18	2	0,045	0,008	29
EHU66	PV	0,37	0	0,048	0,018	32
EHU66	NFH	-0,18	1	0,038	0,023	31
EHU66	<i>Syn</i>	0,09	0	0,011	0,001	31
EHU17	PV	0,55	0	0,006	0,008	32
EHU64	<i>Syn</i>	0,49	0	0,021	0,002	32
EHU64	PV	0,05	0	0,045	0,028	22
EHU63	<i>Syn</i>	0,48	0	0,018	0,002	32
EHU63	PV	0,12	2	0,043	0,024	30
EHU62	<i>Syn</i>	0,53	0	0,016	0,015	32
EHU62	<i>Pro</i>	0,16	-1	0,002	0,049	31
EHU68	CL a	-0,06	0	0,049	0,043	21
EHU61	<i>Syn</i>	0,18	0	0,018	0,001	30
EHU61	NFH	-0,33	0	0,048	0,031	32
EHU11	CL a	0,34	0	0,046	0,026	19
EHU11	PV	-0,61	0	0,001	0,039	32
EHU11	NFH	0,40	0	0,036	0,010	31
DES7	NFH	-0,21	-1	0,009	0,011	31
DES5	<i>Pro</i>	0,50	1	0,011	0,002	27
DES13	<i>Pro</i>	0,42	-1	0,005	0,007	21
EHU56	<i>Pro</i>	0,05	2	0,040	0,030	24
EHU52	<i>Pro</i>	0,30	1	0,022	0,048	31
EHU48	<i>Pro</i>	0,03	2	0,050	0,040	22

Tabla suplementaria 10. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (II) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias de vida libre. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (II) son: PB: producción bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); RB: respiración bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); DBC: demanda bacteriana de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); ECB: eficiencia de crecimiento bacteriana (%).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
PB	ECB	0,70	0	0,001	0,013	30
PB	DBC	0,77	0	0,001	0,013	31
RB	DBC	0,88	0	0,001	0,013	31
RB	PB	0,45	0	0,038	0,053	28
EHU68	PB	0,44	0	0,020	0,005	20
EHU67	DBC	0,45	0	0,010	0,004	32
EHU67	PB	0,46	0	0,005	0,003	29
EHU67	RB	0,41	0	0,022	0,009	31
EHU62	ECB	0,01	1	0,003	0,006	30
EHU62	DBC	0,07	1	0,004	0,007	24
EHU62	PB	0,06	1	0,001	0,004	24
EHU62	RB	0,07	1	0,044	0,024	24
EHU61	PB	0,32	0	0,039	0,033	24
DES13	PB	-0,05	2	0,040	0,023	20
EHU48	DBC	-0,08	2	0,031	0,021	26

Tabla suplementaria 11. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad de bacterias de vida libre. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU17	EHU67	0,33	2	0,001	0,039	30
EHU17	EHU66	0,67	0	0,003	0,006	24
EHU64	EHU67	0,29	1	0,043	0,024	24
EHU64	EHU66	0,84	0	0,001	0,039	32
EHU64	EHU17	0,56	0	0,026	0,019	24
EHU63	EHU66	0,82	0	0,002	0,049	32
EHU63	EHU17	0,55	0	0,024	0,018	24
EHU63	EHU64	0,99	0	0,001	0,039	32
EHU62	EHU68	-0,12	2	0,027	0,019	27
EHU62	EHU67	0,51	0	0,006	0,001	24
EHU61	EHU66	0,94	0	0,001	0,039	32
EHU61	EHU17	0,63	0	0,004	0,069	24
EHU61	EHU64	0,61	0	0,002	0,049	32
EHU61	EHU63	0,60	0	0,002	0,049	32
DES7	EHU61	0,04	-1	0,007	0,009	28
EHU3	EHU58	0,77	1	0,001	0,039	30

Tabla suplementaria 11. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU57	EHU58	0,91	0	0,001	0,039	31
EHU57	EHU3	0,68	-1	0,002	0,049	31
DES13	EHU62	0,32	1	0,004	0,069	29
EHU56	EHU63	-0,39	0	0,040	0,012	18
EHU56	DES7	-0,06	-1	0,002	0,049	19
EHU56	EHU58	-0,41	-1	0,028	0,009	25
EHU56	EHU57	-0,44	-1	0,021	0,005	26
EHU52	DES7	0,34	0	0,010	0,026	26
EHU52	DES13	0,53	1	0,011	0,012	22
EHU52	EHU56	0,52	0	0,005	0,001	25
DES5	DES13	0,38	1	0,008	0,010	27
DES5	EHU52	0,40	0	0,043	0,011	27
EHU51	DES7	0,53	0	0,016	0,015	28
EHU51	DES13	0,46	0	0,036	0,004	23
EHU51	EHU56	0,00	2	0,022	0,017	23
EHU51	EHU52	0,30	1	0,019	0,045	26
EHU50	EHU58	0,10	1	0,001	0,039	20
EHU50	EHU3	-0,07	1	0,002	0,049	31
EHU50	EHU57	0,24	-1	0,001	0,039	19
EHU50	DES13	-0,43	0	0,031	0,006	31
EHU50	EHU56	-0,42	0	0,047	0,008	25
EHU50	EHU52	-0,51	0	0,014	0,001	31
EHU50	EHU51	-0,59	0	0,004	0,007	32
EHU48	EHU3	0,26	-1	0,004	0,007	21
EHU15	EHU17	0,37	1	0,003	0,017	27
EHU15	EHU58	0,44	0	0,003	0,005	26
EHU15	EHU3	0,16	2	0,024	0,018	29
EHU15	EHU57	0,44	-1	0,001	0,039	21
EHU15	DES13	-0,33	0	0,029	0,031	32
EHU15	EHU56	-0,80	0	0,001	0,039	31
EHU15	EHU52	-0,66	0	0,002	0,049	32
EHU15	EHU50	0,63	0	0,001	0,039	31
EHU15	EHU48	0,25	1	0,021	0,017	20

Tabla suplementaria 12. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables abióticas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad mixta. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables abióticas son: T^a: temperatura de superficie del agua (°C); ML: minutos de luz (min); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); PO₄³⁻: concentración fosfato (μM); PROT: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); HUM: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); COD: concentración de carbono orgánico disuelto (μM).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	0,43	0	0,008	0,006	32
COD	NO ₃ ⁻	-0,55	0	0,006	0,022	32
T ^a	NO ₃ ⁻	-0,61	0	0,001	0,011	32
T ^a	COD	0,52	1	0,004	0,018	31
T ^a	HUM	-0,66	0	0,001	0,011	31
ML	NO ₃ ⁻	-0,51	0	0,001	0,001	32
ML	COD	0,25	-1	0,039	0,008	30
ML	PROT	0,37	0	0,049	0,017	22
ML	HUM	-0,30	0	0,001	0,043	31
ML	T ^a	0,35	-1	0,001	0,023	31
DES4	T ^a	-0,16	2	0,049	0,026	29
EHU76	NO ₃ ⁻	0,48	0	0,048	0,002	32
EHU76	HUM	0,27	-1	0,011	0,012	29
EHU76	T ^a	-0,53	0	0,001	0,039	32
EHU76	ML	-0,61	0	0,002	0,049	32
EHU74	PROT	0,07	-1	0,043	0,024	22
EHU73	COD	-0,04	2	0,039	0,023	29
DES2	NO ₃ ⁻	0,21	0	0,017	0,015	25
DES2	T ^a	-0,07	-1	0,025	0,019	31
DES2	ML	-0,54	0	0,007	0,009	32
EHU71	T ^a	-0,43	1	0,005	0,006	31
DES3	COD	0,26	0	0,040	0,023	26

Tabla suplementaria 13. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (I) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad mixta. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (I) son: CL a: concentración de clorofila a (μg l⁻¹); Syn: densidad de *Synechococcus* (10⁷ cél l⁻¹); Pro: densidad de *Prochlorococcus* (10⁷ cél l⁻¹); PV: densidad partículas víricas (10⁹ pv l⁻¹); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10⁵ cél l⁻¹).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
CL a	Syn	-0,57	0	0,001	0,011	32
NFH	CL a	-0,16	-1	0,024	0,039	28
EHU76	Syn	-0,37	0	0,039	0,017	32
EHU76	Pro	0,27	1	0,007	0,009	30
EHU76	CL a	0,45	0	0,001	0,039	26
EHU75	Pro	0,59	1	0,004	0,000	30

Tabla suplementaria 13. (continuación)

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
EHU74	PV	0,46	-1	0,024	0,004	29
EHU73	PV	0,23	-1	0,025	0,019	31
DES2	CL a	0,11	2	0,005	0,027	30
EHU71	Syn	-0,54	0	0,004	0,007	31
EHU71	PV	-0,35	1	0,005	0,024	31
EHU70	NFH	0,17	1	0,045	0,025	31
DES3	CL a	-0,01	2	0,035	0,022	30
DES3	PV	0,11	-1	0,030	0,020	27

Tabla suplementaria 14. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas y variables bióticas (II) analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad mixta. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento). Las variables bióticas (II) son: PB: producción bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); RB: respiración bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); DBC: demanda bacteriana de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); ECB: eficiencia de crecimiento bacteriana (%).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
PB	ECB	0,70	0	0,001	0,013	30
PB	DBC	0,77	0	0,001	0,013	31
RB	DBC	0,88	0	0,001	0,013	31
RB	PB	0,45	0	0,038	0,053	28
DES4	ECB	0,13	2	0,046	0,025	30
DES4	PB	0,28	-1	0,043	0,024	30
EHU76	DBC	-0,45	0	0,031	0,005	32
EHU76	RB	-0,53	0	0,016	0,015	32
DES2	RB	-0,08	1	0,027	0,019	30
EHU71	PB	0,03	2	0,003	0,006	28

Tabla suplementaria 15. Datos de correlaciones estadísticamente significativas entre las OTUs detectadas analizadas mediante el Análisis de Similitud Local (Ruan *et al.*, 2006a) de la comunidad mixta. Las columnas, siguiendo el orden, corresponden con: X (factor 1), Y (factor 2), LS (*local similarity score*), D (desplazamiento de la segunda secuencia con respecto a la primera), P-val (valor p para LS), Q-val (valor q calculado para LS), Lon (longitud del alineamiento).

X	Y	LS	D	P-val	Q-val	Lon
DES4	EHU79	0,28	1	0,039	0,023	16
EHU75	EHU76	0,52	0	0,009	0,011	32
EHU74	DES4	0,15	1	0,011	0,012	31
EHU71	DES4	0,12	-1	0,016	0,015	29

Tabla suplementaria 16. Valores de las variables abióticas del ecosistema: T^a: temperatura de superficie del agua (°C); ML: minutos de luz (min); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); PO₄³⁻: concentración de fosfato (μM); SiO₄⁴⁻: concentración de silicato (μM); PROT: fracción proteica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); HUM: fracción húmica de materia orgánica fluorescente disuelta (QSU); COD: concentración de carbono orgánico disuelto (μM). Se muestra con fondo gris el valor medio de cada situación (χ), el error estándar (± e.e) y coeficiente de variación (cv) de cada situación y global. n.d: no hay dato.

MUESTRA	T ^a (°C)	ML (min)	NO ₃ ⁻ (μM)	PO ₄ ³⁻ (μM)	SiO ₄ ⁴⁻ (μM)	PROT (T)(QSU)	HUM (M+C)(QSU)	COD (μM C)
I1	13,00	662,00	6,68	0,38	3,70	2,20	3,02	83,00
I2	12,00	671,00	5,13	0,35	2,20	2,20	3,02	79,90
I3	12,00	689,00	6,78	0,33	2,88	2,10	3,19	80,30
I4	13,00	698,00	7,60	0,53	5,78	3,40	3,17	94,90
χ	12,50	680,00	6,55	0,40	3,64	2,48	3,10	84,53
± e.e	0,29	8,22	0,52	0,05	0,78	0,31	0,05	3,53
cv	4,62	2,42	15,75	22,82	42,66	24,99	2,99	8,34
T1	13,50	766,00	3,48	0,28	1,85	2,30	2,39	75,50
T2	13,50	775,00	4,10	0,44	2,23	3,70	2,39	85,10
T3	14,00	784,00	1,95	0,19	1,70	1,60	2,36	75,50
T4	14,00	793,00	1,25	0,15	0,95	1,90	2,83	74,70
T5	14,50	801,00	1,40	0,17	1,48	3,70	2,85	113,60
χ	13,90	783,80	2,44	0,25	1,64	2,64	2,56	84,88
± e.e	0,19	6,22	0,57	0,05	0,21	0,45	0,11	7,43
cv	3,01	1,78	52,63	48,49	28,85	37,84	9,84	19,58
V1	18,50	923,00	0,93	0,11	1,45	5,20	3,35	n.d
V2	18,70	924,00	2,03	0,25	1,23	3,70	2,93	92,20
V3	18,50	925,00	1,60	0,18	1,50	2,30	2,71	166,30
V4	19,20	925,00	2,58	0,25	1,95	3,40	2,44	87,30
V5	19,10	924,00	n.d	n.d	n.d	3,80	2,98	n.d
χ	18,80	924,20	1,79	0,20	1,53	3,68	2,88	115,27
± e.e	0,15	0,37	0,35	0,03	0,15	0,46	0,15	25,56
cv	1,76	0,09	39,05	33,93	19,71	28,20	11,71	38,40
cv global	18,59	12,78	66,89	44,50	58,12	34,37	11,57	27,84

Tabla suplementaria 17. Valores de las variables bióticas (l) del ecosistema: CL a: concentración de clorofila a ($\mu\text{g l}^{-1}$); Syn: densidad de *Synechococcus* (10^6 cél l^{-1}); PV: densidad partículas víricas (10^9 pv l^{-1}); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10^5 cél l^{-1}); DB total: densidad bacterias totales (10^8 cél l^{-1}); DB LI: densidad bacterias de vida libre (10^8 cél l^{-1}); DB AD: densidad bacterias adheridas a partículas (10^8 cél l^{-1}). Se muestra con fondo gris el valor medio de cada situación (χ), el error estándar ($\pm e.e$) y coeficiente de variación (cv) de cada situación y global. n.d: no hay dato.

MUESTRA	CL a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Syn (10^6 cél l^{-1})	PV (10^9 pv l^{-1})	NFH (10^5 cél l^{-1})	DB total (10^8 cél l^{-1})	DB LI (10^8 cél l^{-1})	DB AD (10^8 cél l^{-1})
I1	0,80	0,64	0,17	14,00	2,92	2,11	0,81
I2	0,24	0,40	1,97	7,65	2,34	1,50	0,84
I3	0,19	1,24	6,09	66,35	6,59	4,46	2,13
I4	1,65	3,85	5,67	77,92	6,32	2,58	3,74
χ	0,72	1,53	3,48	41,48	4,54	2,66	1,88
$\pm e.e$	0,34	0,79	1,44	17,90	1,11	0,64	0,69
cv	94,29	103,42	82,81	86,32	48,95	47,97	73,63
T1	0,52	0,17	10,70	31,50	9,52	5,55	3,97
T2	0,49	0,11	6,41	41,90	8,97	4,74	4,23
T3	0,41	0,06	5,43	58,00	7,59	5,22	2,37
T4	1,01	0,12	8,03	73,30	13,12	6,31	6,81
T5	0,51	0,10	8,57	75,50	8,38	3,64	4,74
χ	0,59	0,11	7,83	56,04	9,52	5,09	4,42
$\pm e.e$	0,11	0,02	0,91	8,61	0,96	0,44	0,72
cv	40,79	35,38	26,02	34,35	22,47	19,50	36,19
V1	0,45	6,00	8,74	83,90	8,64	7,70	0,94
V2	0,18	6,40	6,75	74,10	7,69	6,30	1,39
V3	0,45	4,43	9,96	41,20	10,39	8,88	1,51
V4	0,17	15,24	6,64	111,00	7,03	5,74	1,29
V5	0,25	10,69	8,52	64,10	7,16	5,67	1,49
χ	0,30	8,55	8,12	74,86	8,18	6,86	1,32
$\pm e.e$	0,06	1,97	0,63	11,48	0,62	0,62	0,10
cv	46,79	51,45	17,41	34,30	16,96	20,32	17,52
cv global	77,17	132,67	42,99	48,48	36,09	41,18	70,28

Tabla suplementaria 18. Valores de las variables bióticas (II) del ecosistema: PB: producción bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); RB: respiración bacteriana ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); DCB: demanda bacteriana de carbono ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$); ECB: eficiencia de crecimiento bacteriana (%). Se muestra con fondo gris el valor medio de cada situación (χ), el error estándar ($\pm e.e$) y coeficiente de variación (cv) de cada situación y global.

MUESTRA	PB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	RB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	DCB ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	ECB (%)
I1	33,30	51,09	84,39	39,46
I2	19,38	85,54	104,91	18,47
I3	31,56	85,39	116,95	26,98
I4	32,17	85,58	117,75	27,32
χ	29,10	76,90	106,00	28,06
$\pm e.e$	3,26	8,60	7,78	4,32
cv	22,42	22,37	14,68	30,77
T1	13,81	66,86	80,67	17,12
T2	14,37	95,93	110,30	13,03
T3	18,58	83,62	102,20	18,18
T4	19,56	54,52	74,08	26,40
T5	21,76	99,45	121,21	17,95
χ	17,62	80,08	97,69	18,54
$\pm e.e$	1,53	8,56	8,89	2,18
cv	19,44	23,92	20,34	26,25
V1	28,86	97,38	126,24	22,86
V2	38,10	94,20	132,30	28,80
V3	51,26	101,46	152,73	33,57
V4	64,63	136,15	200,79	32,19
V5	36,25	139,10	175,35	20,67
χ	43,82	113,66	157,48	27,62
$\pm e.e$	6,33	9,86	13,83	2,54
cv	32,33	19,40	19,64	20,53
cv global	47,64	27,65	29,25	30,46

Tabla suplementaria 19. Porcentaje de explicación de cada eje del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas y las variables estudiadas.

Eje	Valor	%
1	0,56	35,40
2	0,37	23,47
3	0,32	20,07
4	0,21	13,12
5	0,13	7,93
6	2,21E-06	1,40 E-04

Tabla suplementaria 20. Valores del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad de bacterias adheridas a partículas y las variables estudiadas, siendo T^a: temperatura de superficie del agua (°C); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); CL a: concentración de clorofila a (μg l⁻¹); Syn: densidad de *Synechococcus* (10⁶ cél l⁻¹); PV: densidad partículas víricas (10⁹ pv l⁻¹); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10⁵ cél l⁻¹).

MUESTRA	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6
OTU_350	0,57	-0,06	0,36	0,20	1,26	0,83
OTU_453	1,21	0,17	0,32	-1,01	-0,05	0,72
OTU_460	0,33	-0,10	0,78	-4,61	-3,63	-0,31
OTU_480	0,10	0,18	-0,32	-2,06	0,04	-1,16
OTU_490	0,25	-0,80	-1,57	0,55	-1,86	0,80
OTU_496	2,49	-1,45	-0,39	-0,31	0,68	0,88
OTU_507	0,49	-0,01	0,53	-0,05	0,22	-0,82
OTU_534	-1,72	-1,65	1,06	-0,04	1,22	-0,20
OTU_549	0,65	0,88	2,14	2,04	0,16	-0,37
OTU_554	0,36	0,02	-0,34	-1,00	-0,23	0,23
OTU_558	-0,20	1,64	0,10	-2,43	-0,97	-0,42
OTU_566	-0,16	2,40	-0,85	-0,96	1,49	1,47
OTU_569	0,42	-1,11	-1,89	0,58	0,14	-0,79
OTU_573	-0,76	-1,42	-0,28	0,14	1,17	-2,03
OTU_581	-0,05	0,83	-0,06	-0,87	0,26	-0,45
OTU_585	0,22	1,54	-0,48	1,10	0,87	2,60
OTU_591	1,24	0,12	2,05	1,96	0,20	-1,76
OTU_603	-0,80	1,35	-0,99	-0,01	-0,27	0,04
OTU_640	-0,32	2,01	-0,61	0,09	1,39	0,40
OTU_650	-1,06	-0,53	0,63	-1,00	0,51	-0,32
OTU_656	-0,10	-1,35	-0,14	-0,92	0,53	0,10
OTU_661	-0,65	1,21	-0,21	-0,95	2,75	-2,27
OTU_669	0,87	0,38	2,24	-0,21	-2,48	-0,69
OTU_677	-1,75	-1,42	1,34	0,06	0,53	0,93
OTU_681	-0,64	-0,07	-0,56	1,96	-1,89	-0,51
OTU_686	-1,33	-0,66	-0,95	1,12	-0,60	-1,87
OTU_696	-0,38	-0,60	-1,31	1,11	0,32	-1,66
OTU_701	0,63	-0,30	-1,15	0,68	0,05	-0,57
OTU_706	-0,31	-0,10	-1,00	1,12	-0,52	-0,48
OTU_731	0,15	0,54	-0,29	1,13	0,17	-1,12
OTU_740	-0,25	0,23	-0,95	-0,03	0,01	-0,19
OTU_745	0,27	0,57	0,61	0,55	-1,06	0,42
OTU_754	-0,08	-0,79	-1,52	0,92	0,24	-1,32
OTU_765	-0,81	-0,21	-1,11	0,31	-2,24	0,79
OTU_771	0,10	-0,39	-0,66	0,65	0,41	-1,14
OTU_777	-0,78	2,04	-0,81	0,06	0,27	-0,02
OTU_789	-0,91	0,06	-1,05	1,30	-1,84	0,89
OTU_794	-0,22	1,49	-0,72	0,83	0,55	2,60
OTU_819	0,63	1,61	1,82	-0,60	0,08	-0,86
OTU_827	-0,85	-0,88	-1,37	0,08	-2,50	0,61
OTU_836	-0,10	-1,35	-0,13	-0,92	0,53	0,10

Tabla suplementaria 20. (continuación)

MUESTRA	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6
OTU_857	-1,74	-1,19	1,27	0,00	0,40	1,68
OTU_874	-0,84	-0,88	-1,37	0,08	-2,51	0,62
OTU_888	-0,60	-1,22	-0,61	-0,18	-0,26	-0,54
I1	-0,32	1,09	-0,28	-0,71	0,56	-0,25
I2	0,20	1,05	0,03	0,16	0,40	0,86
I3	0,70	0,52	1,54	0,80	-0,42	-0,50
I4	0,41	0,24	0,47	-1,07	-0,59	-0,20
T1	2,14	-1,12	-0,23	-0,34	0,66	0,86
T2	0,30	-0,02	-0,48	0,32	0,03	-0,38
T3	-0,39	0,63	-0,09	0,38	-0,35	0,49
T4	-0,27	-0,20	-0,18	-0,44	-0,52	0,34
T5	0,08	-0,09	-0,33	0,28	-0,25	-0,14
V1	-0,73	-0,51	-0,80	0,39	-0,63	-0,34
V2	-0,39	0,19	-0,36	0,43	0,07	-0,44
V3	0,12	-0,39	-0,53	0,30	0,03	-0,71
V4	-1,43	-1,06	1,04	-0,23	0,60	0,72
V5	-0,43	-0,43	0,20	-0,25	0,41	-0,30
T ^a	-0,53	-0,59	-0,25	0,17	0,13	-0,29
NO ₃ ⁻	0,32	0,49	0,53	-0,39	0,15	-0,08
CL <i>a</i>	0,18	0,12	-0,10	-0,75	-0,41	-0,07
Syn	-0,60	-0,52	0,31	-0,11	0,28	-0,04
PV	0,24	-0,83	-0,18	0,20	-0,19	-0,12
NFH	-0,51	-0,52	0,33	0,05	-0,42	-0,11

Tabla suplementaria 21. Porcentaje de explicación de cada eje del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad de bacterias de vida libre y las variables estudiadas.

Eje	Valor	%
1	0,20	53,86
2	0,08	22,45
3	0,05	12,46
4	0,03	7,07
5	0,02	4,15
6	4,19E-07	1,16E-04

Tabla suplementaria 22. Valores del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad de bacterias de vida libre y las variables estudiadas, siendo T^o: temperatura de superficie del agua (°C); NO₃⁻: concentración de nitrato (µM); CL a: concentración de clorofila a (µg l⁻¹); Syn: densidad de *Synechococcus* (10⁶ cél l⁻¹); PV: densidad partículas víricas (10⁹ pv l⁻¹); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10⁵ cél l⁻¹).

MUESTRA	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6
OTU_424	3,41	-1,14	2,08	-2,18	1,73	3,34
OTU_438	0,13	-0,66	-0,16	-1,00	-0,60	0,49
OTU_522	1,10	2,17	1,94	1,02	-2,89	1,19
OTU_539	3,18	-1,56	0,74	-1,15	0,97	1,13
OTU_562	1,54	2,29	1,11	-2,14	-2,29	2,09
OTU_591	0,00	0,40	0,10	0,03	0,31	-0,58
OTU_613	-1,14	1,26	0,21	0,20	0,27	-0,64
OTU_636	3,03	-1,86	-0,21	-0,43	0,41	-0,43
OTU_640	-1,75	0,98	0,17	-1,93	1,89	-0,39
OTU_656	0,00	0,41	0,10	0,03	0,31	-0,58
OTU_661	-0,27	-0,69	-0,97	1,32	-1,20	-1,56
OTU_664	0,08	-0,32	0,07	0,18	-1,00	-0,11
OTU_673	-0,21	-1,68	1,10	-2,16	0,65	1,54
OTU_681	0,00	0,41	0,10	0,03	0,31	-0,58
OTU_686	0,18	-0,50	-1,40	1,70	1,48	0,71
OTU_691	-2,39	-0,88	-2,40	3,51	0,38	5,05
OTU_696	-2,43	-3,20	1,23	-1,91	-0,89	-0,88
OTU_701	-2,43	-3,20	1,23	-1,91	-0,89	-0,88
OTU_723	0,28	-1,03	0,96	0,60	-1,15	-0,50
OTU_736	0,12	0,25	0,02	0,05	0,00	-0,65
OTU_740	0,91	-0,09	2,64	-0,66	-0,99	4,86
OTU_745	-0,18	-2,28	-4,18	2,66	3,88	3,30
OTU_750	3,03	-1,86	-0,21	-0,43	0,42	-0,43
OTU_754	-1,70	-0,78	-0,98	-0,61	-0,50	1,01
OTU_760	-1,56	-1,71	0,87	-0,96	-0,60	-2,01
OTU_771	-0,38	0,37	-0,25	0,14	0,46	0,23
OTU_781	-2,27	0,69	-2,88	-3,45	0,49	4,97
OTU_799	-1,84	-1,18	1,01	3,18	-1,68	2,41
OTU_802	0,40	1,51	0,72	0,42	0,79	0,58
OTU_810	0,00	0,41	0,10	0,03	0,32	-0,58
OTU_819	3,03	-1,87	-0,21	-0,43	0,43	-0,43
OTU_836	0,00	1,06	0,26	0,29	-0,67	-0,36
OTU_847	0,33	-0,17	-0,44	0,09	0,79	-0,52
OTU_864	1,82	0,45	-1,24	-0,65	-0,81	-0,11
OTU_870	0,00	0,41	0,09	0,03	0,32	-0,58
OTU_882	-0,17	0,47	-0,24	0,63	0,25	0,75
OTU_896	0,27	-0,76	0,07	1,06	-0,47	-0,27
OTU_907	-0,48	0,73	0,33	0,05	2,19	-0,11
OTU_926	0,77	0,16	-2,96	0,06	-2,59	-0,01
OTU_957	0,14	-0,39	0,21	-0,22	0,21	-0,44
OTU_960	-0,58	1,63	-5,04	-3,71	-1,77	0,46

Tabla suplementaria 22. (continuación)

MUESTRA	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6
OTU_970	-1,88	-1,60	0,89	-0,79	-0,33	-0,05
OTU_978	-0,58	1,63	-5,04	-3,71	-1,77	0,46
OTU_990	-0,44	1,15	1,18	-0,42	-0,06	0,19
OTU_999	-1,58	-1,52	-0,21	-1,60	-1,02	-0,42
I1	0,62	-0,34	-0,20	0,08	0,26	0,03
I2	0,60	-0,29	-0,24	0,14	-0,05	-0,27
I3	0,74	-0,04	0,22	-0,21	-0,15	0,22
I4	0,67	-0,10	0,26	-0,11	0,10	0,21
T1	0,08	0,27	0,25	0,43	-0,11	-0,14
T2	0,12	0,09	0,07	0,00	-0,10	-0,17
T3	-0,04	0,45	-0,50	-0,13	-0,27	-0,05
T4	-0,18	0,60	0,18	0,00	0,40	-0,25
T5	-0,09	0,10	-0,02	0,09	-0,13	-0,12
V1	-0,43	0,12	0,07	-0,11	0,21	0,27
V2	-0,49	-0,15	-0,43	-0,08	-0,13	0,43
V3	-0,52	-0,41	-0,09	0,07	0,02	0,24
V4	-0,55	-0,38	0,25	-0,34	-0,03	-0,36
V5	-0,39	-0,22	0,20	0,18	-0,02	-0,02
T ^a	-0,89	-0,30	-0,01	-0,16	0,02	0,28
NO ₃ ⁻	0,81	-0,42	0,23	0,01	0,01	0,08
CL _a	0,38	0,22	0,28	0,04	0,55	0,07
Syn	-0,57	-0,54	0,27	-0,40	0,01	0,04
PV	-0,66	0,34	0,41	0,21	-0,12	0,12
NFH	-0,44	0,17	0,35	-0,67	0,02	0,11

Tabla suplementaria 23. Porcentaje de explicación de cada eje del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad mixta y las variables estudiadas.

Eje	Valor	%
1	0,12	46,89
2	0,07	26,36
3	0,04	16,91
4	0,02	6,42
5	0,01	3,42
6	1,46E-06	5,57E-04

Tabla suplementaria 24. Valores del análisis CCA basado en la intensidad de las OTUs de ARISA de la comunidad mixta y las variables estudiadas, siendo T^a: temperatura de superficie del agua (°C); NO₃⁻: concentración de nitrato (μM); CL *a*: concentración de clorofila *a* (μg l⁻¹); *Syn*: densidad de *Synechococcus* (10⁶ cél l⁻¹); PV: densidad partículas víricas (10⁹ pv l⁻¹); NFH: densidad nanoflagelados heterótrofos (10⁵ cél l⁻¹).

MUESTRA	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6
OTU_591	-1,03	0,81	1,36	-1,32	-0,55	0,77
OTU_640	0,60	-2,05	-0,91	-1,09	-0,35	-2,08
OTU_656	-0,38	0,51	0,62	1,60	1,26	-1,85
OTU_661	0,20	-1,88	1,55	0,28	-2,01	-0,77
OTU_681	-0,30	0,49	-0,17	-0,53	0,54	-0,40
OTU_686	0,72	-1,04	-0,75	0,79	-0,37	1,50
OTU_696	2,37	0,16	0,62	-1,24	2,39	-0,11
OTU_701	1,28	0,90	0,91	0,20	-0,63	0,05
OTU_740	0,17	-0,27	-1,41	1,75	0,05	0,74
OTU_745	-0,98	-0,01	-1,58	-1,34	0,01	0,08
OTU_754	2,03	0,43	0,04	-0,62	0,60	0,18
OTU_771	0,42	0,51	0,35	0,07	-0,72	0,95
OTU_819	-1,77	-1,75	1,39	0,24	2,06	1,24
OTU_836	-0,72	1,28	-0,07	0,46	-0,51	-0,88
I1	-0,21	-0,71	0,12	0,19	-0,20	-0,14
I2	-0,41	-0,53	-0,04	-0,27	0,07	-0,20
I3	0,78	0,20	0,18	-0,18	0,20	0,20
I4	0,61	-0,11	-0,11	0,02	0,34	0,31
T1	0,36	0,47	0,47	0,17	-0,37	-0,45
T2	-0,16	0,32	-0,04	0,15	-0,34	0,25
T3	0,27	0,11	-0,58	-0,07	-0,12	0,06
T4	0,34	0,34	-0,46	0,53	0,04	-0,36
T5	-0,32	0,07	-0,14	-0,46	0,03	-0,21
V1	-0,02	-0,21	0,05	0,33	0,14	0,51
V2	-0,60	-0,12	-0,09	-0,20	0,12	-0,02
V3	-0,68	0,20	0,12	-0,09	0,07	0,24
V4	-0,46	0,15	0,41	-0,20	0,00	-0,40
V5	0,08	-0,21	0,20	0,21	0,05	-0,05
T ^a	-0,77	0,05	0,27	0,03	0,17	0,12
NO ₃ ⁻	0,63	-0,38	0,25	-0,05	0,12	0,13
CL <i>a</i>	0,39	-0,03	-0,32	0,39	0,21	0,14
<i>Syn</i>	-0,45	-0,08	0,47	-0,06	0,31	-0,03
PV	-0,33	0,73	0,18	0,15	0,00	0,03
NFH	-0,24	0,34	-0,04	-0,05	0,48	0,09

Tabla suplementaria 25. Valores medios mensuales y el error estándar (\pm e.e) de las actividades específicas de la comunidad bacteriana de la estación de Armintza durante el periodo 2011-2013. Los valores de producción bacteriana (PB_{esp}), respiración bacteriana (RB_{esp}), y eficiencia de crecimiento bacteriana (ECB) proceden de la información presentada en el **Capítulo 1**; los valores de actividad enzimática extracelular leucina aminopeptidasa (LAP_{esp}) se han tomado de Abad (2020).

MUESTRA	PB_{esp} (fg C cél⁻¹ h⁻¹)	\pm e.e	RB_{esp} (fg C cél⁻¹ h⁻¹)	\pm e.e	ECB (%)	\pm e.e	LAP_{esp} (amol MCA cél⁻¹ h⁻¹)	\pm e.e
Enero	0,62		1,31		32,09		115,99	
Febrero	2,50	1,43	5,25	1,59	27,62	6,03	240,53	137,82
Marzo	1,69	0,69	3,31	1,91	38,48	4,99	180,91	44,90
Abril	0,88	0,21	4,39	0,60	16,32	1,63	215,77	27,73
Mayo	10,39		13,37		43,72		874,79	
Junio	3,60	1,15	5,61	1,50	39,48	3,25	185,56	21,48
Julio	1,28	0,19	2,04	0,22	38,41	3,62	97,96	13,29
Agosto	1,82	0,09	4,30	0,59	30,30	3,23	118,90	12,63
Septiembre	0,56	0,23	2,14	0,47	18,84	4,36	73,24	9,73
Octubre	1,11	0,27	2,61	0,35	29,36	2,46	125,58	50,71
Noviembre	1,24	0,40	2,87	0,25	29,85	8,71	162,41	7,84
Diciembre	1,17		2,89		28,82		161,26	

La relación entre la composición taxonómica de la comunidad bacteriana y su actividad en el espacio y tiempo es uno de los principales temas de estudio en el campo de la ecología microbiana, debido a la relevancia del bacterioplancton en el funcionamiento del océano global. Por ello, este trabajo se ha centrado en el estudio de la composición taxonómica de la comunidad bacteriana en aguas superficiales de un sistema marino costero del Mar Cantábrico oriental durante un periodo plurianual, para el que se utilizaron una combinación de diferentes técnicas moleculares y frecuencias de muestreo. Los resultados mostraron dos situaciones estacionales claramente diferenciadas: invierno, con dominancia de *Alfaproteobacteria*, y verano, con dominancia de *Bacteroidetes*. Ambas situaciones se conectaron mediante dos momentos de transición, en abril y septiembre, en los que ocurrieron cambios significativos en la composición y eficiencia de crecimiento de las comunidades bacterianas. En este sistema marino se detectó la coexistencia de tres comunidades bacterianas diferenciadas por su hábitat: la comunidad de bacterias adheridas a partículas, la comunidad de bacterias de vida libre y la comunidad mixta. La composición taxonómica de las tres comunidades fue muy específica del hábitat colonizado y mostró una marcada estacionalidad de OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) abundantes. Los factores que provocaron el cambio en la composición de cada comunidad fueron distintos, ya que los impulsores del cambio en la comunidad de bacterias adheridas a partículas fueron la concentración de clorofila a, la depredación por los nanoflagelados heterótrofos y la lisis vírica y en la comunidad de bacterias de vida libre fueron la temperatura del sistema y la concentración de materia orgánica disuelta fluorescente de tipo proteico. El muestreo intensivo reveló que la variabilidad intrasituaciones de ciertas variables y grupos filogenéticos fue incluso superior al detectado en periodos largos de tiempo (entre situaciones). Por último, y en el contexto de calentamiento global del planeta, se estudió la sensibilidad a la temperatura de varias actividades de tres bacterias que fueron detectadas recurrentemente en las distintas situaciones que atraviesa este sistema costero. La actividad que mostró mayor sensibilidad a la temperatura en las tres bacterias fue la respiración, lo que permite predecir un incremento en la transferencia de CO₂ a la atmósfera. Asimismo, la sensibilidad a la temperatura de las distintas actividades de las tres bacterias fue heterogénea, lo que predice posibles cambios en la composición de la comunidad de bacterias naturales en respuesta a un aumento de la temperatura superficial del sistema costero.

