



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“Aspectos metodológicos sobre la determinación del carbono orgánico disuelto lábil mediante bioensayos de respiración y producción con bacterias marinas”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE OCEANÓLOGO
PRESENTA**

Paola Jacqueline Valdés Villaverde

Ensenada, B.C., Septiembre 2015

Aspectos metodológicos sobre la determinación del carbono orgánico disuelto lábil mediante bioensayos de respiración y producción con bacterias marinas

TESIS

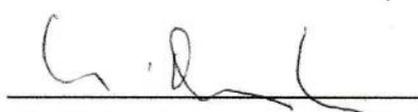
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO
PRESENTA

Paola Jacqueline Valdés Villaverde

APROBADO POR



Dr. Ramón Cajal Medrano
Director de Tesis



Dr. Helmut Maske Rubach
Sinodal



Dr. Josué Villegas Mendoza
Sinodal

Resumen

Con objeto de evaluar los aspectos metodológicos involucrados en la cuantificación de carbono orgánico disuelto lábil (LDOC), medimos la producción de biomasa bacteriana, la respiración y la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS), la abundancia de células con actividad respiratoria, la abundancia total de bacterias y el contenido de carbono orgánico disuelto (DOC) y particulado (POC), en laboratorio y en el campo (tres estaciones oceanográficas en la región de la Corriente de California frente a Ensenada). Utilizando las mediciones del consumo de oxígeno en la oscuridad, obtenidas mediante bioensayos con bacterias marinas de las muestras colectadas en la estación Micmar, se obtuvo un perfil de LDOC con una distribución congruente a la esperada. La cinética de degradación de LDOC inferida puede ser ajustada a un modelo de decaimiento exponencial del tipo $C(t) = C_0 e^{-kt}$ donde $C(t)$ es la concentración de carbono lábil y carbono lábil al tiempo cero (C_0), k es la constante de degradación y t es el tiempo. Proponemos que la tasa de respiración calculada en este tipo de bioensayos puede usarse para definir el tiempo de incubación necesario para distinguir el reciclamiento del contenido de LDOC y realizar el cálculo final de su concentración. El tiempo de incubación adecuado que en este caso hemos definido es de 6 días de incubación (LDOC₆) para todas las profundidades muestreadas. Adicionalmente se observó un incremento gradual permanente en el consumo de oxígeno y más allá del sexto día de incubación debido al reciclamiento de materia orgánica que puede ser evitado aplicando el criterio del LDOC₆. Sin embargo la cantidad de LDOC exacta calculada (LDOC₆) necesita corroborarse con mediciones directas del coeficiente respiratorio (RQ).

Palabras clave: Carbono orgánico disuelto lábil, bioensayos, respiración bacteriana

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico con especial cariño:

A mis padres, Ramón Arturo y Luz Aurora, quienes han sido mis pilares y han apoyado siempre cada una de las decisiones que he tomado.

A mi hermana, Liliana Karina, quien ha sido un ejemplo para mí y me inspira a seguir adelante.

A mi hermano, José Ramón, quien renueva en mí la curiosidad y el deseo de aprender nuevas cosas.

A mi familia que me impulsa a seguir adelante y perseguir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Ramón Cajal Medrano, por haber confiado en mí durante todo el proceso de consolidación de este trabajo.

A mis sinodales, Dr. Helmut Maske Rubach y Dr. Josué Villegas Mendoza, por sus valiosos consejos y aportes a lo largo de este proceso de aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante la realización de esta tesis (Proyecto CB-2012-01/179753. No. de Becario 21742).

Al grupo de MICMAR, M. en C. César O. Almeda Jáuregui, Dr. Ricardo Cruz López y Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre, por esas amenas charlas en el laboratorio y por compartir sus ideas conmigo.

A mis profesores de la carrera por compartir no sólo sus conocimientos académicos sino sus experiencias de vida.

A Eduardo y Luis quienes, aun estando lejos, siempre tuvieron tiempo para brindarme sus consejos, su apoyo y su cariño.

A Eder, Elizeth, Ernesto, Francisco, Jocelyn, Jonas, Julio, Mayra, Nadia, Patricia, Ricardo y Uriel quienes se volvieron mi segunda familia. Porque crecimos juntos y compartimos momentos inolvidables a lo largo de estos años.

A todos ustedes, gracias.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	6
MÉTODOS.....	6
• Área de estudio.....	6
1. Toma de datos hidrológicos y colecta de muestras de campo.....	7
2. Abundancia bacteriana por conteo directo con el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol).....	8
3. Conteo de células activas utilizando la sal de tetrazolio CTC (cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio).....	9
4. Carbono orgánico particulado (POC).....	10
5. Carbono orgánico total (TOC).....	10
6. Cuantificación de carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) mediante la determinación de la concentración de oxígeno disuelto.....	11
7. Determinación de respiración bacteriana con INT (cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H tetrazolio).....	12
8. Determinación de producción bacteriana con leucina- ³ H.....	13
9. Cultivos de bacterias marinas en lote (batch).....	14
RESULTADOS.....	15
• Condiciones hidrológicas.....	15

• Producción bacteriana.....	20
• Abundancia bacteriana total y células activas.....	21
• Respiración bacteriana usando el INT como indicador de la actividad del sistema de transporte de electrones.....	24
• Bioensayos con bacterioplancton marino para la cuantificación de carbono orgánico lábil mediante el consumo de oxígeno en la oscuridad.....	26
• Determinación de carbono orgánico total, carbono orgánico disuelto lábil, carbono orgánico disuelto y carbono orgánico particulado.....	28
• Experimentos realizados con cultivos de <i>Vibrio harveyi</i> en lote.....	30
DISCUSIÓN.....	38
• Condiciones hidrológicas.....	38
• Producción bacteriana.....	42
• Abundancia bacteriana total y células activas.....	43
• Respiración bacteriana usando el INT como indicador de la actividad del sistema de transporte de electrones.....	48
• Determinación de carbono orgánico total, carbono orgánico disuelto lábil, carbono orgánico disuelto y carbono orgánico particulado.....	51
• Experimentos realizados con cultivos de <i>Vibrio harveyi</i> en lote.....	56
CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bomba microbiana del carbono.....	2
Figura 2. Localización de las estaciones muestreadas con respecto a la Bahía de Todos Santos.....	7
Figura 3. Perfiles de Temperatura obtenidos con CTD para las estaciones Flucar (verde), Antares (morado) y Micmar (amarillo).....	15
Figura 4. Desplazamiento de la termoclina en la columna de agua. La línea punteada indica la posición de la termoclina durante el día y la línea continua indica su posición durante la noche.....	16
Figura 5. Perfiles de Salinidad obtenidos con CTD para las estaciones Flucar, Antares y Micmar.....	17
Figura 6. Diagrama TS realizado con datos de las estaciones de muestreo (Flucar: verde, Antares, morado y Micmar, amarillo) durante el crucero. Se encuentran las masas de agua que influyen la región: Agua Subártica (SAW) y Agua Subsuperficial Ecuatorial (ESsW).....	18
Figura 7. Perfiles de Fluorescencia obtenidos con datos de CTD para las tres estaciones de muestreo (Flucar: verde, Antares, morado y Micmar, amarillo).....	19
Figura 8. Perfiles de Oxígeno obtenidos a partir de datos de CTD para las tres estaciones. La línea punteada gris indica el valor mínimo de oxígeno, la línea punteada roja indica la posición de la oxiclina durante el día y la línea sólida, su posición durante la noche.....	20
Figura 9. Perfiles de producción bacteriana para las estaciones Flucar, Antares y Micmar.....	21
Figura 10. Células totales (línea punteada) y células activas (línea sólida) determinadas para las estaciones Flucar (a), Antares (b) y Micmar (c). Las barras	

muestran el coeficiente de variación $CV = \frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones.....	22
Figura 10 a)	22
Figura 10 b)	23
Figura 10 c)	24
Figura 11. Consumo total de oxígeno en la estación Micmar.....	27
Figura 12. Tasa de consumo de oxígeno en la estación Micmar.....	28
Figura 13 Perfiles de carbono orgánico particulado (POC), carbono orgánico disuelto (DOC), carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) y carbono orgánico total (TOC) obtenidos para la estación Micmar.....	30
Figura 14. Cinética de crecimiento de células totales (círculos azules) y células activas (círculos rojos) y consumo de oxígeno por célula (círculos negros) en un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> en ZoBell diluido 500 veces. El eje izquierdo se encuentra en escala logarítmica.....	31
Figura 15. Células totales (círculos azules) y células activas (círculos rojos) en un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces. Las barras muestran el coeficiente de variación $CV = \frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones.....	33
Figura 16. Consumo total de oxígeno (círculos negros) y tasa de consumo de oxígeno (círculos blancos) obtenidos para un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces.....	34
Figura 17. Cinética de crecimiento de células totales (cuadrados azules) y células activas (cuadrados rojos) y consumo de oxígeno por célula (cuadrados negros) en un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> en ZoBell diluido 250 veces. El eje izquierdo se encuentra en escala logarítmica.....	35
Figura 18. Células totales (cuadrados azules) y células activas (cuadrados rojos) en un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces. Las barras	

muestran el coeficiente de variación $CV = \frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones..... **36**

Figura 19. Consumo total de oxígeno (cuadrados negros) y tasa de consumo de oxígeno (cuadrados blancos) obtenidos para un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces..... **37**

Figura 20. Valor máximo de fluorescencia en función de la densidad para cada una de las estaciones muestreadas..... **40**

Figura 21. Profundidad del máximo de fluorescencia en función de la profundidad del máximo de oxígeno..... **41**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Profundidades a las que se colectaron muestras de agua con botellas Niskin en cada una de las estaciones de muestreo.....	8
Tabla II. Datos de absorbancia, producción de formazano y respiración estimada. *sin efecto del control, s/ctrl y con efecto del control, c/ctrl.....	25
Tabla III. Carbono orgánico particulado (POC), carbono orgánico disuelto (DOC), carbono orgánico total (TOC), carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) y constante de degradación (k) determinados para la estación Micmar.....	29
Tabla IV. Células CTC activas, abundancia bacteriana total (DAPI) y porcentaje de células CTC activas. *resultados superiores al 100% indicarían problemas metodológicos.....	46
Tabla V. Comparación de la razón de células CTC activas/DAPI contabilizadas por conteo directo y por análisis de imágenes para las tres estaciones muestreadas....	48
Tabla VI. LDOC ₆ calculado para todas las profundidades de la estación Micmar con diferentes coeficientes respiratorios (RQ).....	55
Tabla VII. Porcentaje de células CTC positivas en el tiempo para un cultivo de <i>Vibrio harveyi</i> creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces (ZB 500) y otro creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces (ZB 250).....	57

INTRODUCCIÓN

El ciclo del carbono en el océano depende fundamentalmente de los microbios marinos. Desde la captura de CO₂ atmosférico por el plancton microbiano eucariota y procariota autotróficos cuya producción primaria es comparable a la fijación de CO₂ en la masa continental (Field *et al.*, 1998). La producción primaria en el océano constituye la entrada principal de materia orgánica al ecosistema dado que las tasas de entrada y salida (vía ríos, depósitos atmosféricos, evaporación, aerosoles, derrames de petróleo etc.) de carbono orgánico en el océano son extremadamente pequeñas con relación a la producción y destrucción *in situ* (Williams, 2000). La mayor parte de esta materia orgánica se recicla rápidamente en las capas superficiales del océano (Maske *et al.*, 2007, Benner y Amon, 2015), mientras que el proceso de producción de materia orgánica se lleva a cabo exclusivamente durante el día en la zona fótica, la destrucción de esta materia orgánica por consumo, respiración y mineralización, es llevada a cabo por procariotas heterotróficos de manera continua en toda la columna de agua. Aproximadamente el 50% de la producción primaria es transferida a carbono orgánico disuelto (DOC) mediante procesos fisiológicos y mecanismos tróficos (lisis celular, muerte, depredación, etc.). El tamaño del reservorio del DOC así como su origen (Fig. 1) lo sitúan como sumidero del carbono producido autotróficamente y como fuente de sustrato para procariotas heterotróficos. El sustrato orgánico es capturado por bacterias y arqueas marinas y es convertido en biomasa y bióxido de carbono con una eficiencia variable que en gran medida depende de la composición química del DOC. La composición química exacta del DOC es desconocida en un 90% y a esta fracción se le atribuye resistencia a la degradación microbiana y constituye la fracción refractaria. Esta fracción refractaria tiene una vida media entre 4000 y 6000 años (Williams, 2000; Hansell, 2013; Arrieta

et al., 2015) pero se desconocen las características químicas o limitaciones fisiológicas que inhiben su degradación y se ha encontrado que existen fracciones específicas y arreglos moleculares de materia orgánica disuelta (DOM) que pueden tener un tiempo de residencia mucho mayor (Lechtenfeld *et al.*, 2014). Se calcula que la fracción normalmente degradada constituye <10% del total del DOC (incluye aminoácidos libres disueltos, aminoácidos combinados, monosacáridos y amino sacáridos, etc.) con un tiempo de renovación de horas a días y de semanas a meses respectivamente y se le clasifica como lábil o semilábil (Hansell, 2013). Sin embargo existe una fracción pequeña de materia orgánica que escapa a la degradación en forma de DOC y está constituido por moléculas de tamaño, bio-disponibilidad y reactividad variables (Jiao *et al.*, 2010).

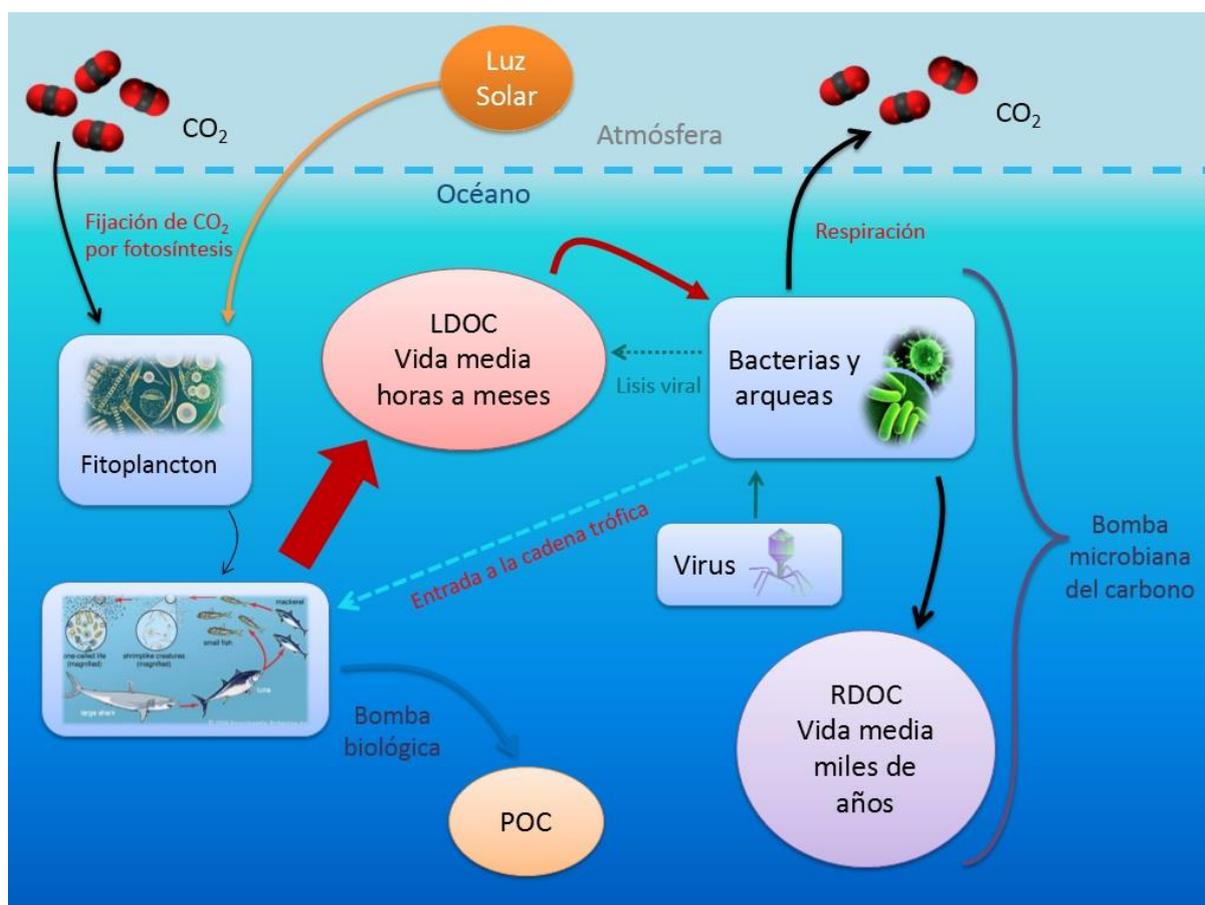


Figura 1. Bomba microbiana del carbono

La magnitud y eficiencia con la que se forma el carbono refractario a partir de sustrato lábil que depende de las condiciones ambientales es crítica para definir la magnitud del flujo del sumidero de carbono. Si la materia orgánica disuelta que en última instancia es generada en la superficie del océano por la producción primaria, resiste a la degradación durante por lo menos algunas semanas o meses antes de ser removidas de la superficie por procesos físicos, su transporte a las profundidades puede significar un sumidero importante de carbono atmosférico (Carlson *et al.*, 1994, 2010). La formación de carbono orgánico disuelto refractario (RDOC) es una condición necesaria para que la bomba microbiana de carbono pueda funcionar como sumidero de carbono atmosférico.

Existen dos hipótesis que intentan explicar la acumulación de DOM; la primera sostiene que la materia orgánica es recalcitrante y los microbios no pueden degradarla (Hansell, 2013) y la otra es que simplemente existe una dilución tan alta que los microbios se ven imposibilitados para poder degradarla (Arrieta *et al.*, 2015). En este sentido el estudio de los mecanismos de degradación microbiana del DOC es central para entender el principio propuesto de la bomba microbiana de carbono. La medición del carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) solamente puede efectuarse mediante bioensayos. La cuantificación de estos procesos involucra la estimación del carbono orgánico disuelto (o sustrato) consumido en total (dS) por procariontes heterotróficos; es decir, la suma del sustrato utilizado para la producción de biomasa (dB) y para la respiración (dR). La suma de ambos procesos ($dS = dB + dR$) constituye el flujo de carbono considerado lábil. La cuantificación del RDOC puede obtenerse

mediante la diferencia con la concentración de DOC total en la muestra medido por combustión de un volumen de agua de mar (IOC, 1994).

Cada una de las mediciones involucradas en la determinación del LDOC (producción y respiración bacteriana) presentan sus propios problemas. En el caso de la producción prácticamente existe un solo método que utiliza la asimilación de timidina y leucina marcadas con tritio y la exactitud de las técnicas depende del uso de factores de conversión involucrados. La timidina es un nucleósido utilizado en la síntesis de ADN. En este caso la tasa de incorporación de timidina por la célula requiere de tres factores de conversión; primero debe ser convertida a tasa de duplicación de ADN y posteriormente a tasa de duplicación celular y de biomasa en términos de carbono (Fuhrman y Azam, 1982). Para la leucina se utilizan dos factores; la conversión de la tasa de incorporación de leucina a la tasa de producción de proteína y de ésta a la producción de carbono de biomasa (Simon y Azam, 1989). Paralelamente se puede también utilizar el incremento celular en el tiempo y convertir la tasa de cambio de la abundancia celular a tasa de cambio de la biomasa celular (Ammerman *et al*, 1984), sin embargo para obtener con exactitud la producción de biomasa, esta aproximación implica el conocimiento del número de células activas cuya información depende de la técnica que se usa para evaluarla (del Giorgio y Gasol, 2008) y por consiguiente existe un grado de incertidumbre con relación a la exactitud de las estimaciones de la producción bacteriana.

Por otra parte la medición de la respiración presenta inicialmente el problema de la separación del bacterioplancton del resto del plancton, el problema de confinamiento

de la muestra en botellas de vidrio y el tiempo de incubación (Villegas-Mendoza, 2015). Se ha reportado que los problemas mencionados anteriormente pueden modificar las condiciones fisiológicas de la muestra tales como la presión de depredación, la liberación de componentes orgánicos y por tanto inducir cambios en la estructura de la comunidad. Como resultado de dichos cambios las tasas de respiración bacteriana podrían ser sobreestimadas (Villegas-Mendoza, 2015).

En este trabajo medimos la producción de biomasa mediante la incorporación de leucina-³H, la respiración bacteriana mediante el consumo de oxígeno y la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) usando la sal de tetrazolio INT, la cantidad de células con actividad respiratoria mediante el fluorocromo CTC, la abundancia total de bacterias usando el fluorocromo DAPI, de muestras obtenidas en tres estaciones oceanográficas en la región de la Corriente de California frente a Ensenada, B.C. en marzo de 2015. Evaluamos el uso de estas técnicas en la cuantificación de carbono lábil y refractario con experimentos en el laboratorio y en el campo.

HIPÓTESIS

La medición de la producción bacteriana y su respiración en muestras de agua de mar permiten conocer la cantidad de LDOC que consume el bacterioplancton marino.

OBJETIVOS

- Determinar la degradación de carbono lábil mediante la medición de respiración y producción bacterianas.
- Explorar los aspectos metodológicos de las técnicas aplicadas para medir la producción y la respiración del bacterioplancton marino.
- Determinar la factibilidad del uso de estas técnicas en el campo.

MÉTODOS

- Área de Estudio

El área de estudio está conformada por tres estaciones oceanográficas ubicadas al sur (estaciones Flucar (31.67°N, 116.69°W) y Micmar (31.60°N, 116.87°W) y suroeste (estación Antares (31.73°N, 116.96°W) de la Bahía de Todos Santos (Fig. 2). Esta región está influenciada por el Sistema de la Corriente de California (SCC) mismo que se constituye por la Corriente de California (CC), corriente superficial con dirección al Ecuador, la Subcorriente de California (CU), corriente subsuperficial con dirección al polo, y la Contracorriente de California (CCC), corriente costera con dirección intermitente hacia el noroeste (Macías-Carballo, 2010).

El SCC está influenciado por diversas masas de agua cada una caracterizada por una salinidad y temperatura específicas y por su concentración de nutrientes y de oxígeno disuelto. Algunas de las masas de agua presentes en la zona son Agua Subártica del Pacífico (SAW) con una salinidad entre los 33.1 y 34 y temperaturas entre los 8 y 20 °C, Agua Subsuperficial Ecuatorial (ESsW) con salinidades de 33.3 a 34.6 y

temperaturas entre los 8 y 15 °C, Agua Intermedia del Pacífico (PIW) con salinidades de 34.5 a 34.8 y temperaturas de 4 a 9 °C y Agua Profunda del Pacífico (PDW) con temperaturas de 2 a 4 °C y salinidades entre 33.5 y 34.5 (Macías-Carballo, 2010). Las aguas de esta región presentan temperaturas superficiales bajas, próximas a los 11°C, en febrero y altas, 21.4°C, durante los meses de agosto y septiembre y valores máximos salinidad durante el verano y mínimos en invierno, 33.7 y 33.3 respectivamente. (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001).

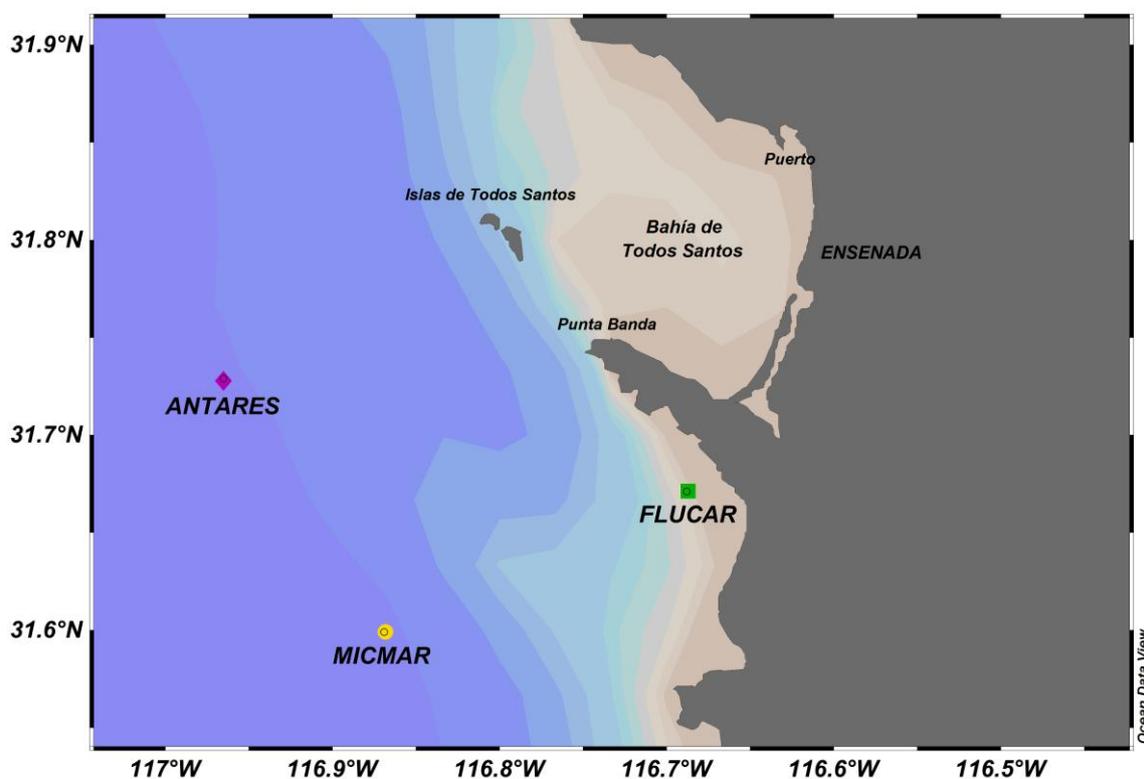


Figura 2. Localización de las estaciones muestreadas con respecto a la Bahía de Todos Santos.

1. Toma de datos hidrológicos y colecta de muestras en campo

Durante el crucero se utilizó un perfilador de conductividad, temperatura y profundidad (CTD por sus siglas en inglés) Sea-Bird 9Plus con fluorímetro (SeaPoint SCF),

altímetro (PSA-916D) y sensores de temperatura (3plus), conductividad (4C) y oxígeno disuelto (Sea-Bird 43), asociado a un sistema Sea-Bird 11Plus en cubierta para comunicación en tiempo real. Los lances de CTD se hicieron en conjunto con una Rosetta Sea-Bird Carousel 32 con capacidad para 12 botellas Niskin de 5 L. Para cada una de las estaciones se registraron posición geográfica, profundidad, fecha, hora y profundidad máxima del lance. Se obtuvieron muestras de la columna de agua para abundancia bacteriana, células activas determinadas con el fluorocromo CTC, carbono orgánico particulado (POC) y respiración bacteriana de las tres estaciones y muestras para producción bacteriana, carbono orgánico total (TOC) y carbono lábil (LDOC) sólo de la estación Micmar.

Tabla I. Profundidades a las que se colectaron muestras de agua con botellas Niskin en cada una de las estaciones de muestreo.

Estación	Flucar	Antares	Micmar
Profundidad (m)	20	20	10
	40	40	20
	50	150	40
	70	200	100
	-	680	700

2. Abundancia bacteriana por conteo directo con el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)

Se colectaron 20 mL de muestra directamente de la botella Niskin a un vial de centelleo con una solución de formaldehído amortiguado a una concentración final de

2%. Se tomó 1 mL de la muestra fijada en un tubo Eppendorf, se agregaron 10 μ L de una solución de DAPI 500 μ M y se incubó por 10 minutos en la oscuridad. Se filtró a través de un filtro de policarbonato negro con tamaño de poro de 0.2 μ m y 25 mm de diámetro (Poretics); mismo que se montó en un portaobjetos con 20 μ L de una solución anti blanqueamiento previamente preparada (50% glicerol y 50% PBS con p-fenilenediamina al 0.1%). La preparación fue observada en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss con un aumento de 100X utilizando aceite de inmersión de baja fluorescencia. Se seleccionaron campos al azar hasta contar ≥ 300 células por muestra. Los conteos se realizaron con análisis de imágenes tomadas con una cámara CCD controlada con el software Micro-manager. La abundancia celular se determinó utilizando la ecuación 1.

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\bar{x} * F}{V} \quad (1)$$

Donde \bar{x} es el promedio de células por campo, F es el cociente entre el área del filtro y el área de la rejilla y V es el volumen de muestra filtrado.

3. Conteo de células activas utilizando la sal de tetrazolio CTC (cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio).

Se colectó 1 mL de muestra en un tubo Eppendorf. Se añadió una solución de CTC 1 mM concentración final, después de pruebas previas con diferentes concentraciones para determinar la concentración ideal, y se incubó durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregó formaldehído amortiguado 2% concentración final para detener la reacción. La muestra se filtró, montó y observó siguiendo la misma metodología descrita para el conteo directo con DAPI.

4. Carbono orgánico particulado (POC)

La medición de carbono orgánico particulado se realizó a partir de muestras de agua de mar filtrada (~1.5 L) a través de filtros de vidrio GF/F previamente calcinados a 450 °C durante 4 horas. Los filtros se guardaron en papel aluminio previamente calcinado y se congelaron hasta su posterior análisis en laboratorio. Una vez en laboratorio se secaron los filtros en un horno a 60°C durante 12 horas posteriormente se guardaron en un recipiente libre de humedad para ser analizados en un analizador de elementos CHNS Elementar modelo vario MICRO cube. Los resultados se reportan en $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5. Carbono orgánico total (TOC)

En la estación de muestreo Micmar, se colectaron 40 mL de muestra directamente de la botella Niskin en una botella de Nalgene oscura de 60 mL para cada una de las profundidades (tabla I). Las muestras se acidificaron con 5 μL por mL de muestra de ácido fosfórico al 50% y se refrigeraron por más de cuatro horas. Posteriormente se almacenaron en la oscuridad y a temperatura ambiente en el laboratorio. Se analizaron en un analizador de TOC/TNb Elementar modelo vario TOC cube. Los resultados se reportan en $\mu\text{mol L}^{-1}$.

6. Cuantificación de carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) mediante la determinación de la concentración de oxígeno disuelto

Se colectaron muestras de agua de mar de diferentes profundidades (Tabla I) en la estación Micmar directamente de las botellas Niskin a las botellas de vidrio BOD de 150 mL con sensores para oxígeno “Planar Oxygen-Sensitive Spots” previamente colocados evitando introducir burbujas de aire. La determinación de la concentración de oxígeno disuelto se hizo con un sensor óptico DP-PSt3-YOP y un sistema Fibox 4 (PreSens, Regensburg, Alemania). Las muestras fueron llevadas al laboratorio y se incubaron durante 15 días en la oscuridad y se sumergieron en agua para evitar el ingreso de oxígeno. Se registró la concentración de oxígeno cada 24 horas durante los 15 días de incubación. Se obtuvieron datos de consumo de oxígeno (ec. 2), tasa de consumo de oxígeno por día (ec. 3). La constante de degradación de oxígeno por día (k , día⁻¹) se obtuvo empíricamente utilizando la fase de decaimiento exponencial del oxígeno de acuerdo al modelo de decaimiento exponencial (ec. 4).

$$C = [O_2]_{t_0} - [O_2]_{t_n} \quad (2)$$

Donde C es el consumo de oxígeno (μM), t_0 el tiempo inicial y t_n el tiempo al día de incubación.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{[O_2]_{t_n} - [O_2]_{t_{(n-1)}}}{t_n} \quad (3)$$

Donde $\frac{\Delta C}{\Delta t}$ es la tasa de consumo de oxígeno por día ($\mu\text{M día}^{-1}$) y t_n el tiempo al día de incubación.

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (4)$$

Donde C es la concentración de oxígeno, C_0 es la concentración de oxígeno al tiempo inicial, t es el tiempo en días de incubación y k es la constante de degradación (día^{-1})

7. Determinación de respiración bacteriana con INT (cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H tetrazolio)

Para cada muestra se colectaron 100 mL de agua de mar. Se agregó una solución 0.5 mM de INT (concentración final) y se incubaron durante una hora. Posteriormente, se filtraron las muestras a través de filtros de policarbonato de 0.8 y 0.2 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro. Se colocaron los filtros en tubos Eppendorf con 1.5 mL de propanol y utilizando un Bead Beater con partículas de sílica/zirconia de 0.1 mm, se homogeneizaron a 5000 rpm durante 3 min y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min. La elaboración de controles consistió en agregar una solución de formaldehído al 2% concentración final una hora antes de la adición del INT. La detección del formazano producido se realizó usando su pico de absorción a 485 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 40). La calibración se realizó con un estándar de formazano y una curva de calibración con el fin de determinar la producción de formazano (FP; μM) en las muestras. La ecuación obtenida de la curva fue la siguiente

$$\text{Absorbancia} = (0.0045 * FP) - 0.0082 \quad (5)$$

La respiración bacteriana (R ; $\mu\text{MO}_2 \text{ h}^{-1}$) se calculó con los valores obtenidos de producción de formazano (FP ; μM) de acuerdo con la relación empírica (ec. 6) propuesta por Villegas-Mendoza (2015).

$$R = 0.20FP^{2.16} \quad (6)$$

8. Determinación de producción bacteriana con leucina- ^3H

Se colectaron 1.5 mL de muestra en tubos Eppendorf con 3 μL de leucina- ^3H (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante dos horas. Para los controles, se agregaron 20 μL de ácido tricloroacético al 50%. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 1.5 mL de ácido tricloroacético al 5% frío a manera de enjuague y se centrifugaron nuevamente como se describió anteriormente. El sobrenadante fue descartado y finalmente, las células se suspendieron en 1.5 mL de líquido de centelleo EcoLume™ (Liquid Scintillation Cocktail, MP Biomedicals). Los tubos Eppendorf se colocaron dentro de viales de centelleo de vidrio debidamente etiquetados y la radioactividad de la muestra fue cuantificada con un contador de centelleo Perkin Elmer modelo Tri-Carb 2810TR. La producción bacteriana se determinó de acuerdo a la ecuación 7 (Kirchman, 2001).

$$\text{Producción}(\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}) = \text{Leu} * \frac{131.2}{\% \text{Leu}} * \frac{\text{C}}{\text{Proteína}} * \text{ID} \quad (7)$$

Donde Leu es la tasa de incorporación de leucina ($\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$), % Leu es la fracción de leucina en la proteína, $\frac{C}{\text{proteína}}$ es el factor de conversión de proteína a carbono e ID es la dilución isotópica.

9. Cultivos de bacterias marinas en lote (batch)

Con el fin de medir la respiración bacteriana en diferentes estados de crecimiento en un cultivo estacionario, se preparó medio de cultivo ZoBell concentrado (bactopeptona, 5 g; extracto de levadura, 1 g; agua de mar envejecida, 750 mL; agua destilada, 250 mL). Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y se inoculó con la bacteria marina *Vibrio harveyi* (cepa crecida en ZoBell sólido proporcionada por el Dr. Villegas-Mendoza). Se dejó crecer en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas previas a los experimentos. Se prepararon lotes más diluidos (250 veces y 500 veces) y se esterilizaron como se describe anteriormente. Los lotes diluidos fueron inoculados con el cultivo de *V. harveyi* fresco. Se tomaron muestras para abundancia bacteriana y células CTC activas y se registró la concentración de oxígeno a los tiempos 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 horas para el lote diluido 250 veces y a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 8.5, 9.5 y 10 horas para el lote diluido 500 veces. Se emplearon cultivos de *Vibrio harveyi* puesto que esta bacteria ya había sido utilizada para medir producción de formazano y consumo de oxígeno por Villegas-Mendoza *et al.* (2015).

RESULTADOS

- Condiciones hidrológicas

La temperatura máxima registrada se encontró en superficie con valores de 16.3, 16,7 y 17.4 °C para las estaciones Flucar, Micmar y Antares respectivamente. La temperatura mínima registrada en la zona arrojó valores ~5 °C aproximadamente a los 750 metros de profundidad en las estaciones Antares y Micmar (Fig. 3). Se observa también un desplazamiento de la termoclina desde su posición durante el día (termoclina a ~5 metros) hacia aguas más profundas durante la noche (termoclina a ~13 metros) (Fig. 4).

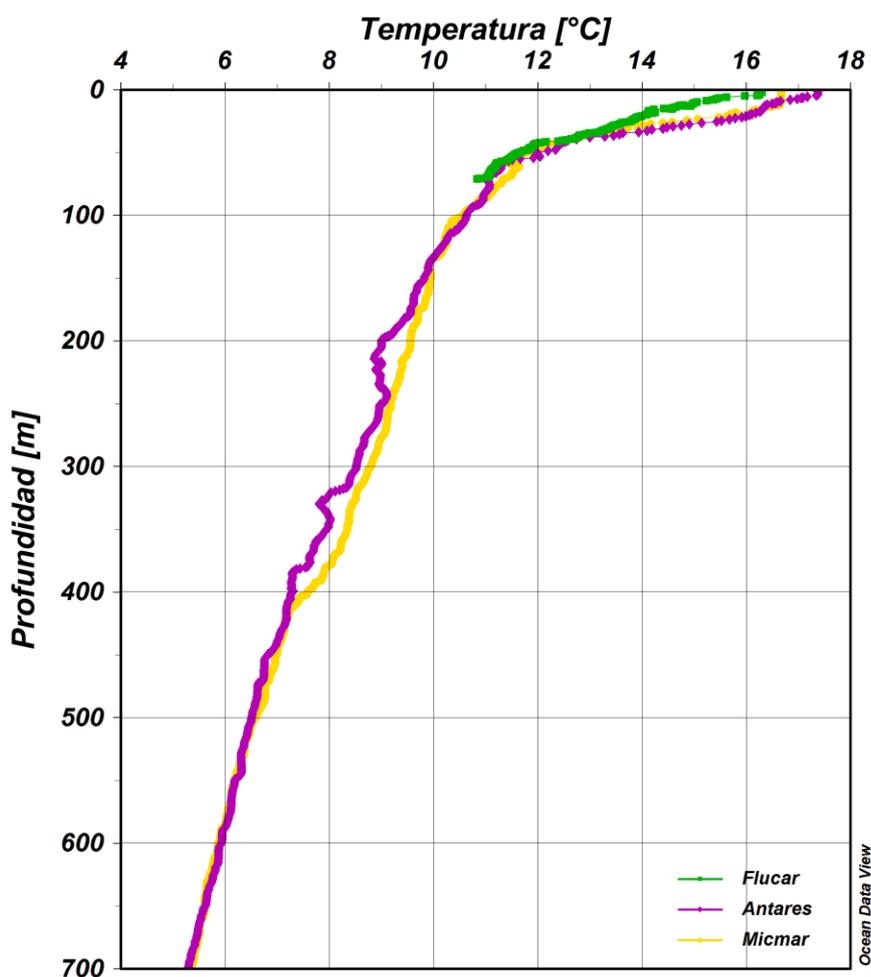


Figura 3. Perfiles de Temperatura obtenidos con CTD para las estaciones Flucar (verde), Antares (morado) y Micmar (amarillo).

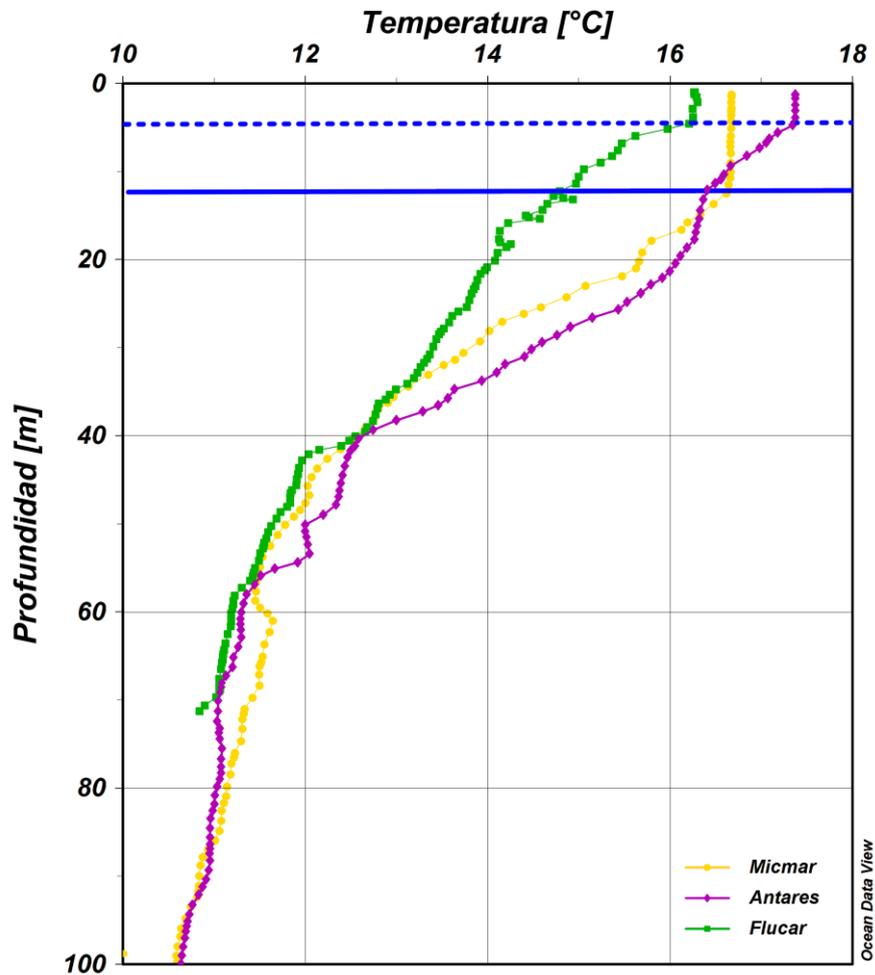


Figura 4. Desplazamiento de la termoclina en la columna de agua. La línea punteada indica la posición de la termoclina durante el día y la línea continua indica su posición en la noche.

La salinidad muestra un valor mínimo en la superficie de ~33.4 para todas las estaciones y aumenta hasta llegar a un máximo de ~34.3 aproximadamente a los 600 metros de profundidad (Fig. 5).

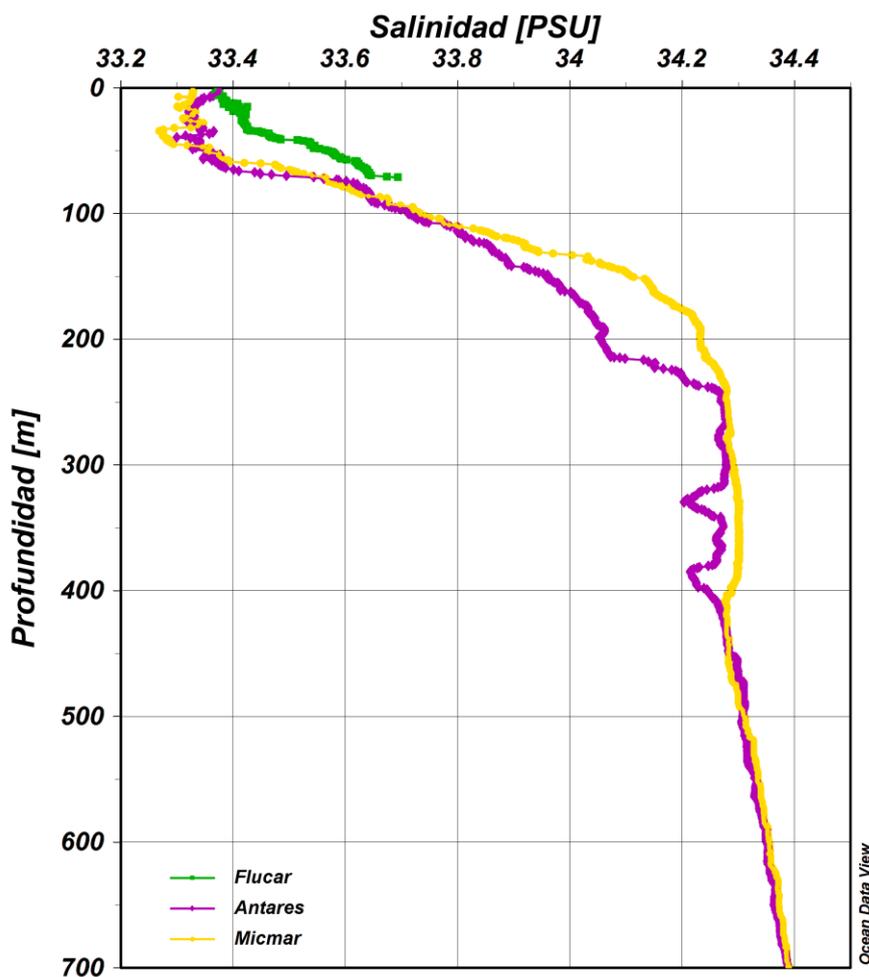


Figura 5. Perfiles de Salinidad obtenidos con CTD para las estaciones Flucar (verde), Antares (morado) y Micmar (amarillo).

El diagrama TS obtenido con los datos de CTD muestra la influencia de una masa de agua superficial (de 0 a 200 m de profundidad) y una subsuperficial (de 200 a 500 metros) (Lynn y Simpson, 1987) (Fig. 6), cada una caracterizada por una salinidad y temperatura específicas así como por su concentración de nutrientes y de oxígeno disuelto, Agua Subártica del Pacífico (SAW) con una salinidad entre los 33.1 y 34 y temperaturas entre los 8 y 20 °C y Agua Subsuperficial Ecuatorial (ESsW) con salinidades de 33.3 a 34.6 y temperaturas entre los 8 y 15 °C respectivamente (Macías-Carballo, 2010).

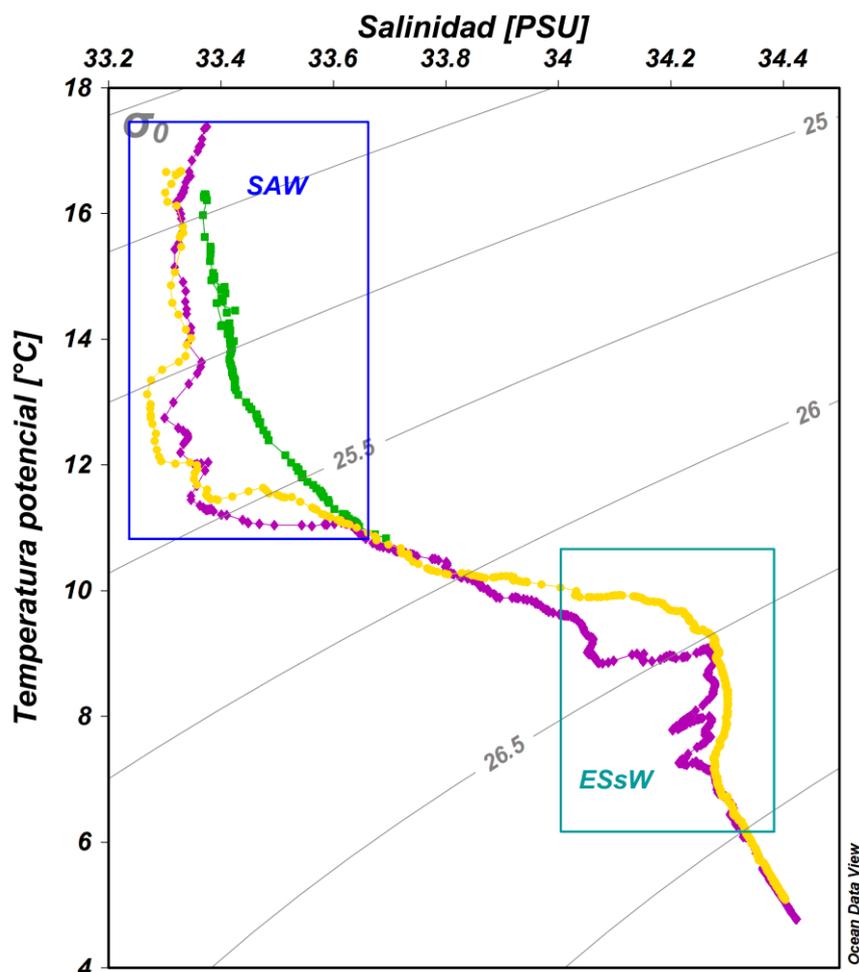


Figura 6. Diagrama TS realizado con datos de las estaciones de muestreo (Flucar: verde, Antares, morado y Micmar, amarillo) durante el crucero. Se encuentran las masas de agua que influyen la región: Agua Subártica (SAW) y Agua Subsuperficial Ecuatorial (ESsW).

Los perfiles de fluorescencia muestran dos picos, el primero con valores de ~1.3 a los 13 metros de profundidad y el segundo aproximadamente a 30 metros de profundidad con valores de 1.5 a 1.8. Es importante mencionar que el máximo de fluorescencia que se observa a 13 metros corresponde al perfil tomado en la estación Flucar a las 11:30 h mientras que el segundo pico corresponde a las estaciones Antares (tomado a las 17:30 h) y Micmar (tomado a las 19:30 h) (Fig. 7).

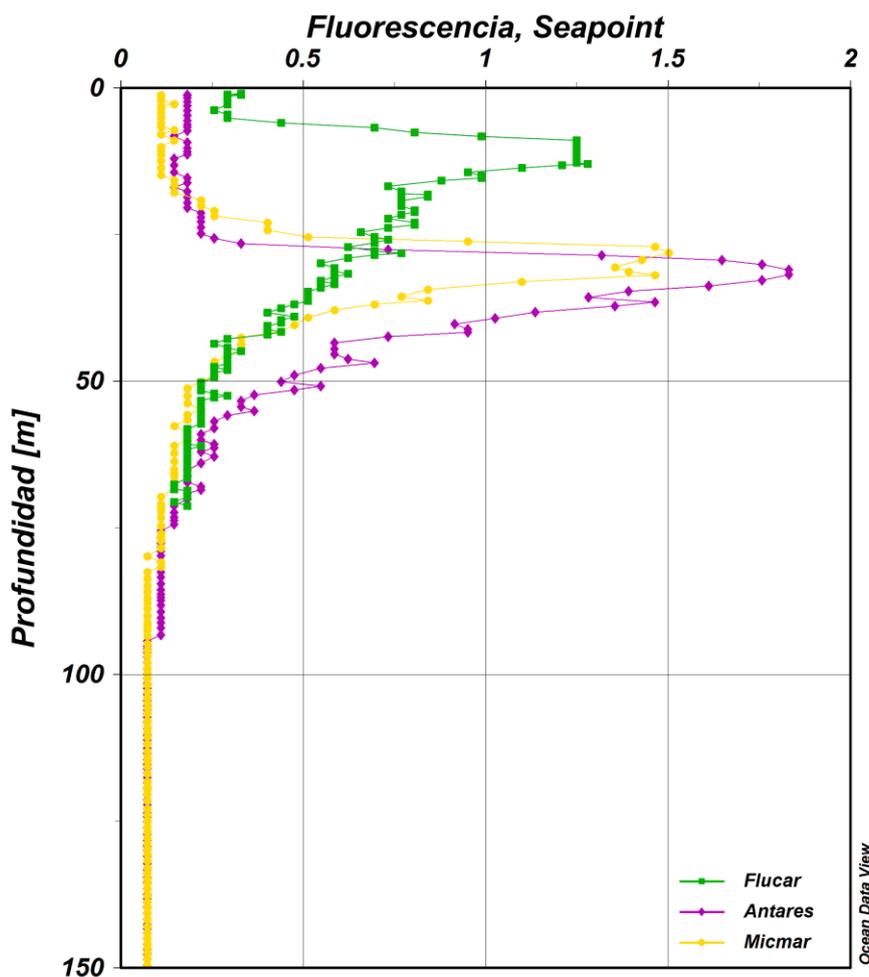


Figura 7. Perfiles de Fluorescencia obtenidos con datos de CTD para las tres estaciones de muestreo (Flucar: verde, Antares, morado y Micmar, amarillo).

Los máximos de oxígeno disuelto en la columna de agua se encontraron a los 2 metros de profundidad en la estación Flucar ($\sim 250 \mu\text{M}$) y a 27 metros de profundidad en las estaciones Antares y Micmar ($\sim 252 \mu\text{M}$). En las tres estaciones, los máximos indican el inicio de la oxiclina. Los valores de oxígeno disminuyen conforme aumenta la profundidad hasta alcanzar un valor mínimo de $\sim 8.7 \mu\text{M}$ (mínimo medido con el sensor sin calibrar a cero oxígeno) entre los 640 y 655 metros en las estaciones Micmar y Antares respectivamente. Al igual que en los perfiles de temperatura, se

observa un desplazamiento de la oxiclina desde su posición en la mañana a 9 metros de profundidad hasta los 27 metros durante la tarde-noche (Fig. 8).

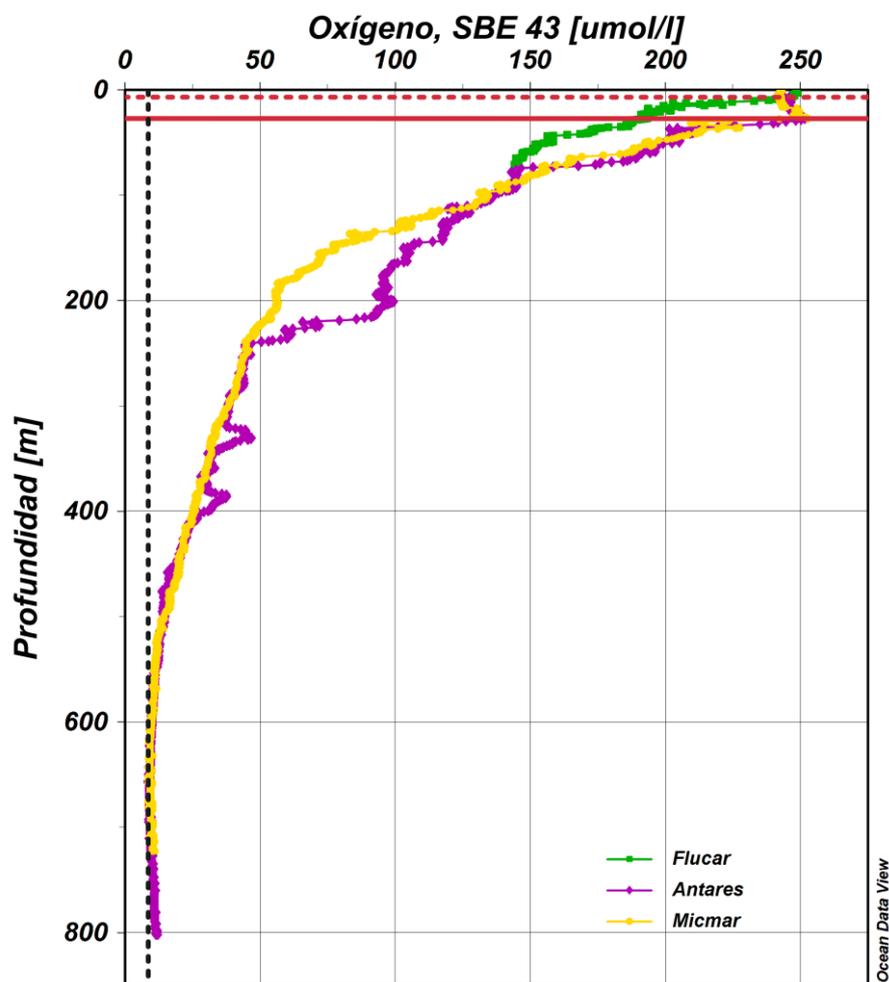


Figura 8. Perfiles de oxígeno obtenidos a partir de datos de CTD para las tres estaciones (Flucar: verde, Antares, morado y Micmar, amarillo). La línea punteada gris indica el valor mínimo de oxígeno, la línea punteada roja indica la posición de la oxiclina durante el día y la línea sólida, su posición durante la noche.

- Producción bacteriana

Los perfiles de biomasa obtenidos a partir de los datos de leucina presentan el mismo patrón en todas las estaciones; un máximo a los 20 metros, un mínimo a 40 metros, un segundo máximo a entre los 70 y 150 metros para finalmente disminuir con la

profundidad como se observa en la figura 9. Los valores más altos de producción se encontraron en la estación Flucar y los más bajos en la estación Antares.

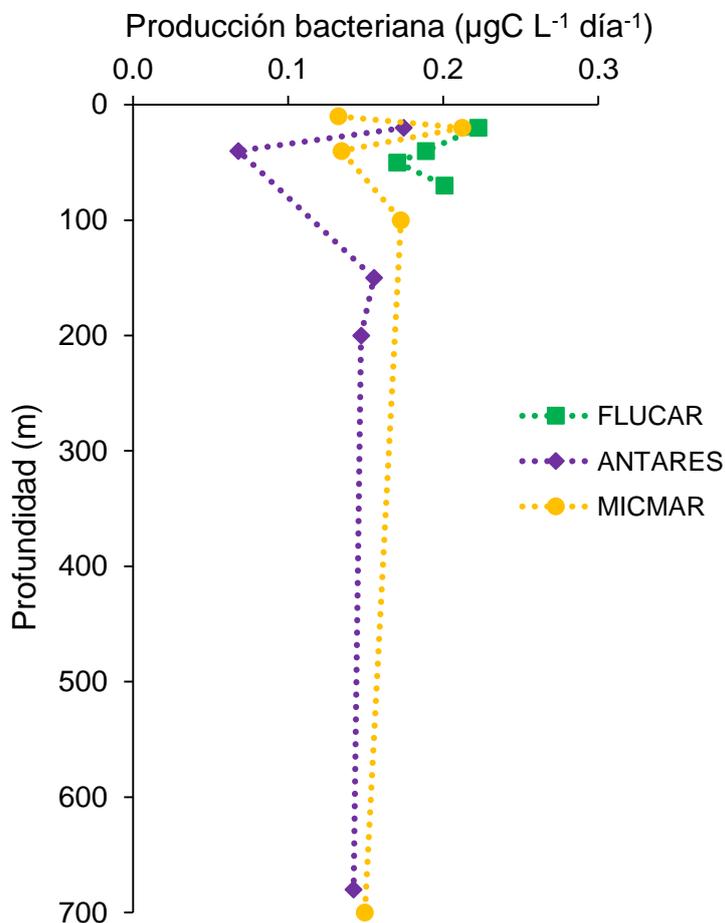
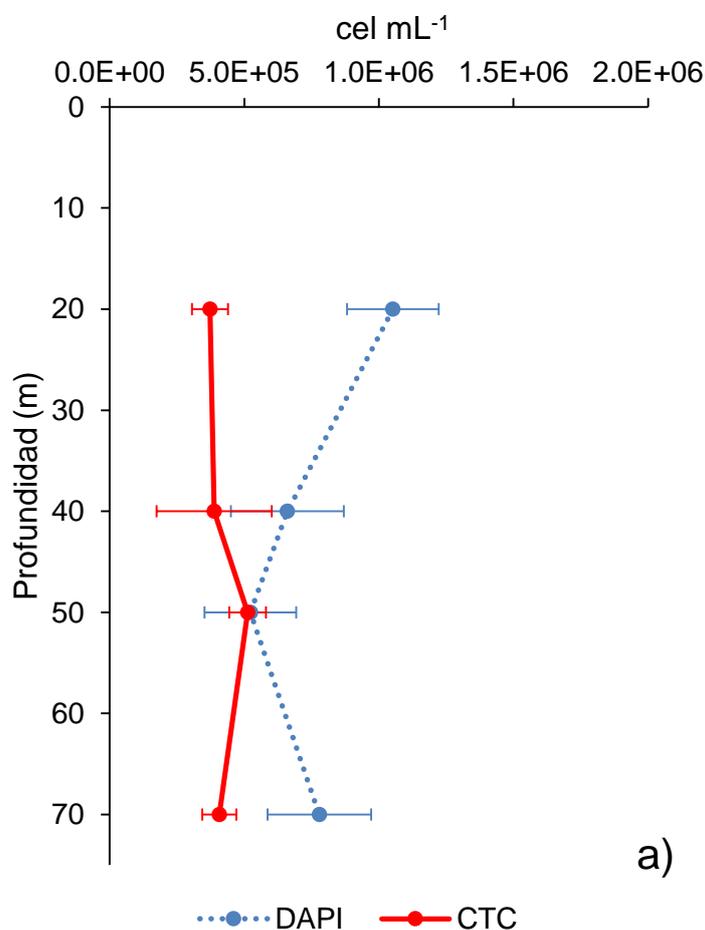


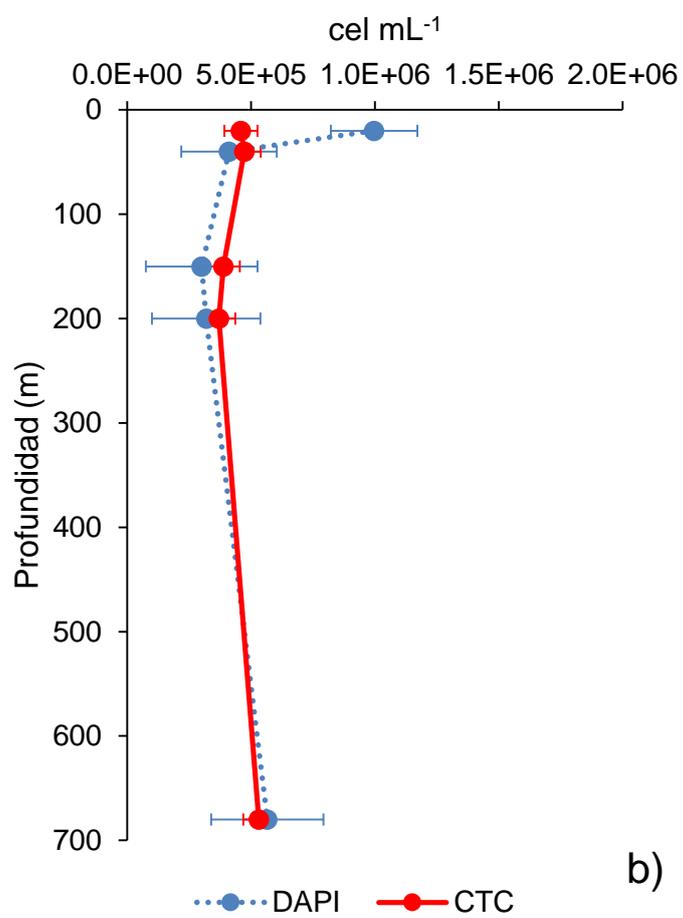
Figura 9. Perfiles de producción bacteriana para las estaciones Flucar, Antares y Micmar.

- Abundancia bacteriana total y células activas

La figura 10 muestra los perfiles de células totales cuantificadas con DAPI y de células activas cuantificadas con CTC para las estaciones muestreadas. La abundancia total de bacterias en la estación Flucar muestra un valor máximo a los 20 metros, disminuye con la profundidad hasta un mínimo a los 50 metros y aumenta

nuevamente a los 70 metros mientras que para las células activas, se observa un ligero aumento con la profundidad hasta alcanzar el máximo a los 50 metros para posteriormente disminuir a los 70 metros (Fig 10a). En la estación Antares, los valores de abundancia disminuyen desde un máximo a los 20 metros hasta los 200 metros para aumentar ligeramente con la profundidad. Es preciso mencionar que en esta estación, los valores de células totales (DAPI) son inferiores a los obtenidos para células activas (CTC) (Fig. 10b). Finalmente, los perfiles obtenidos para la estación Micmar (Fig. 10c) muestran un patrón similar a los perfiles de la estación Flucar a partir de los 20 metros de profundidad: un máximo a los 20 metros, un decremento a los 40 metros y un ligero aumento con la profundidad para la células totales y un ligero aumento a los 40 metros para disminuir con la profundidad para células activas.





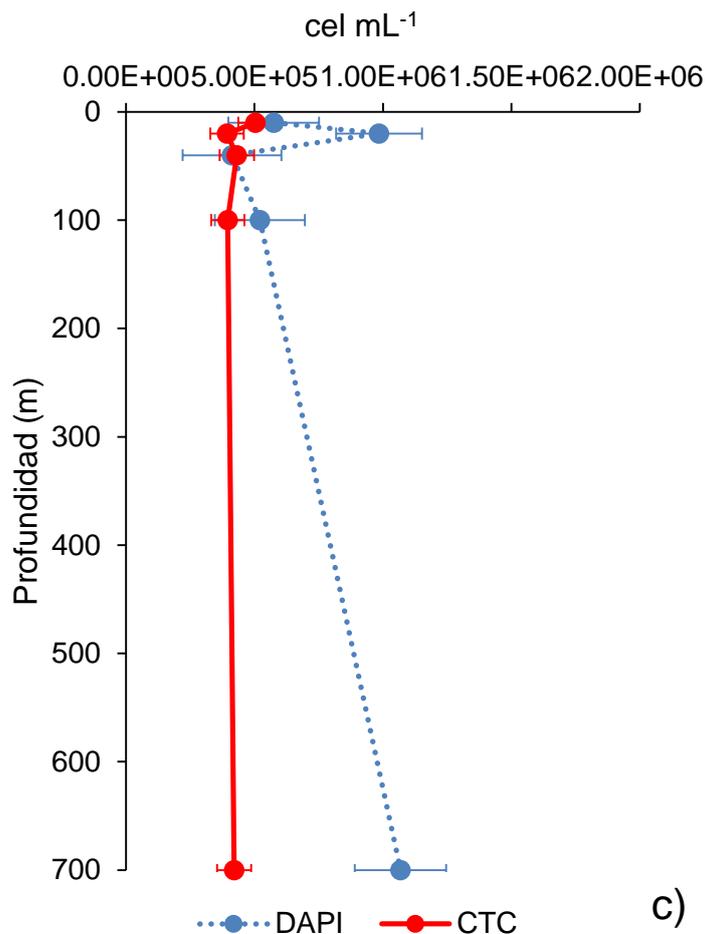


Figura 10. Células totales (línea punteada) y células activas (línea sólida) determinadas para las estaciones Flucar (a), Antares (b) y Micmar (c). Las barras muestran el coeficiente de variación $CV = \frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones.

- Respiración bacteriana usando el INT como indicador de la actividad del sistema de transporte de electrones

Se obtuvieron los datos de absorbancia de las muestras de agua de mar colectadas a distintas profundidades en cada una de las estaciones de muestreo. Se calculó la producción total de formazano en las muestras descartando el efecto del control correspondiente. Los controles consistieron en muestras a las que se les adicionó formaldehído al 2% final. Los valores de formazano determinados para cada uno de

los controles fueron altos (Antares, 7.03 μM , Flucar, 10.21 μM y Micmar 7.19 μM) y por consiguiente, los valores de producción de formazano con efecto del control fueron bajos y en algunos casos negativos. Para el cálculo de la respiración se utilizaron solamente aquellos valores que resultaron positivos, es decir todas las profundidades de la estación de muestreo Micmar y las profundidades 20 y 150 metros de la estación Antares (Tabla II).

Tabla II. Datos de absorbancia, producción de formazano y respiración estimada. *sin efecto del control, s/ctrl y con efecto del control, c/ctrl.

Estación	Profundidad (m)	Absorbancia	*Producción de formazano (μM)		Respiración ($\mu\text{M}\text{O}_2 \text{ h}^{-1}$)
			s/ctrl	c/ctrl	
Antares	control	0.023	7.0	-	-
	20	0.031	8.6	1.6	0.56
	40	0.020	6.3	-0.8	-
	150	0.025	7.3	0.3	0.01
	200	0.020	6.3	-0.8	-
	680	0.014	4.9	-2.2	-
Flucar	control	0.038	10.2	-	-
	20	0.031	8.6	-1.6	-
	40	0.013	4.7	-5.5	-
	50	0.006	3.2	-7.0	-
	70	0.015	5.1	-5.1	-
Micmar	control	0.018	5.9	-	-
	10	0.024	7.2	1.3	0.35
	20	0.032	9.0	3.1	2.22
	40	0.027	7.9	2.0	0.85
	100	0.031	8.8	2.9	1.93
	700	0.019	6.1	0.2	0.00

- Bioensayos con bacterioplancton marino para la cuantificación de carbono orgánico lábil mediante el consumo de oxígeno en la oscuridad.

Se colectó agua de mar de la estación Micmar (Tabla I) en botellas de vidrio tipo BOD de 150 mL, y se incubaron sin filtrar en la oscuridad durante 15 días. Se generó una serie de tiempo de la concentración de oxígeno para cada botella correspondiente a una profundidad. En la figura 11 se observa que el mayor consumo de oxígeno para los bioensayos de las profundidades 10, 20 y 40 metros se llevó a cabo hasta el sexto día de incubación con valores de 0 a ~42, ~46 y ~50 μM respectivamente. Para las profundidades 100 y 700 metros, se observa un consumo importante durante los primeros cuatro días de incubación (de 0 a ~35 μM a 100 m y de 0 a ~29 μM a 700). A partir del quinto y séptimo días las variaciones en la concentración de oxígeno no fueron significativas aunque en todos los casos, se observó una ligera tendencia del consumo de oxígeno a seguir aumentando con variaciones de 5, 19, 10, 13 y 7 μM de oxígeno para los 10, 20, 40, 100 y 700 metros de profundidad respectivamente.

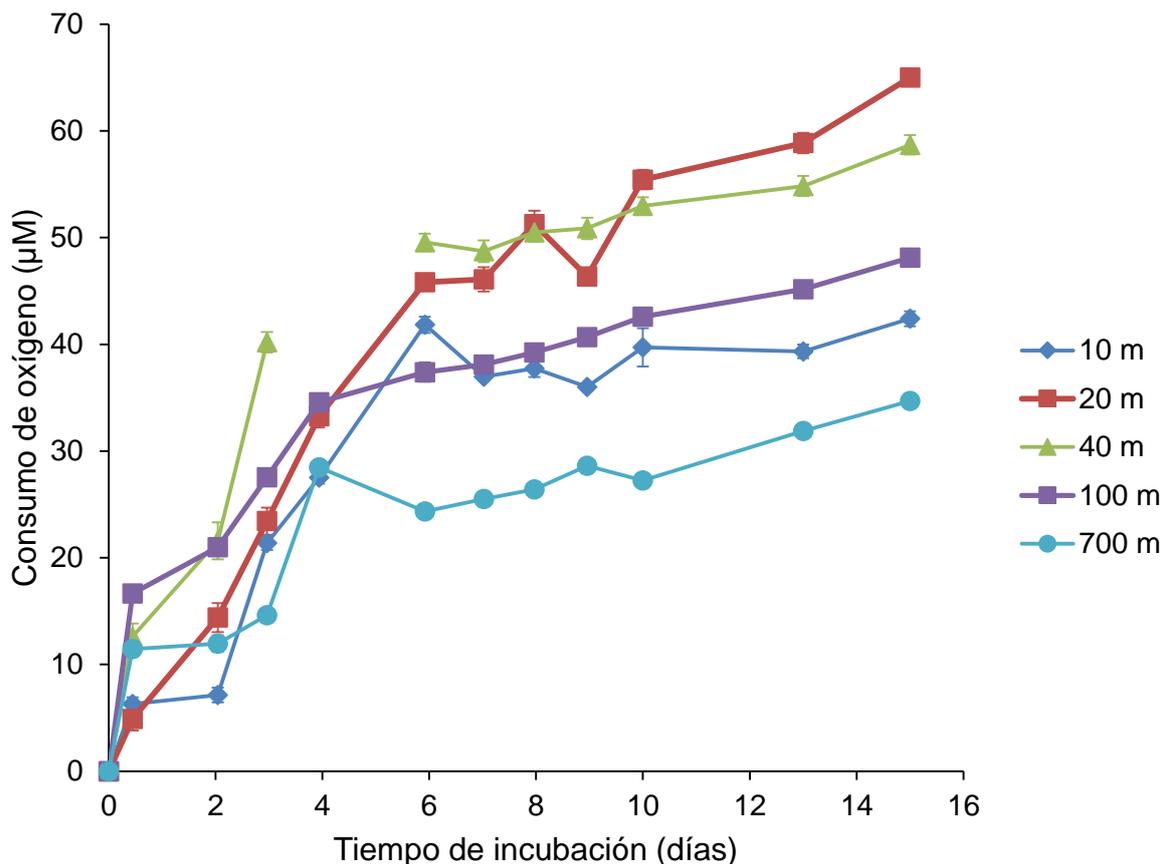


Figura 11. Consumo total de oxígeno en la estación Micmar. Las barras muestran la desviación estándar obtenida de tres réplicas por punto.

La tasa de consumo de oxígeno por día (Fig. 12) indica que durante los primeros dos días de incubación esta disminuye drásticamente de 14.2 a 0.41 $\mu\text{M día}^{-1}$ para 10 metros, de 11 a 4.65 $\mu\text{M día}^{-1}$ para 20 metros, de 28.3 a 4.41 $\mu\text{M día}^{-1}$ para 40 metros, de 37.4 a 2.12 $\mu\text{M día}^{-1}$ para 100 metros y de 25.7 a 0.26 $\mu\text{M día}^{-1}$ para los 700 metros de profundidad. Hacia el tercer día se observa un ligero aumento para disminuir hasta su valor mínimo promedio de 0.25 $\mu\text{M día}^{-1}$ para todas las profundidades.

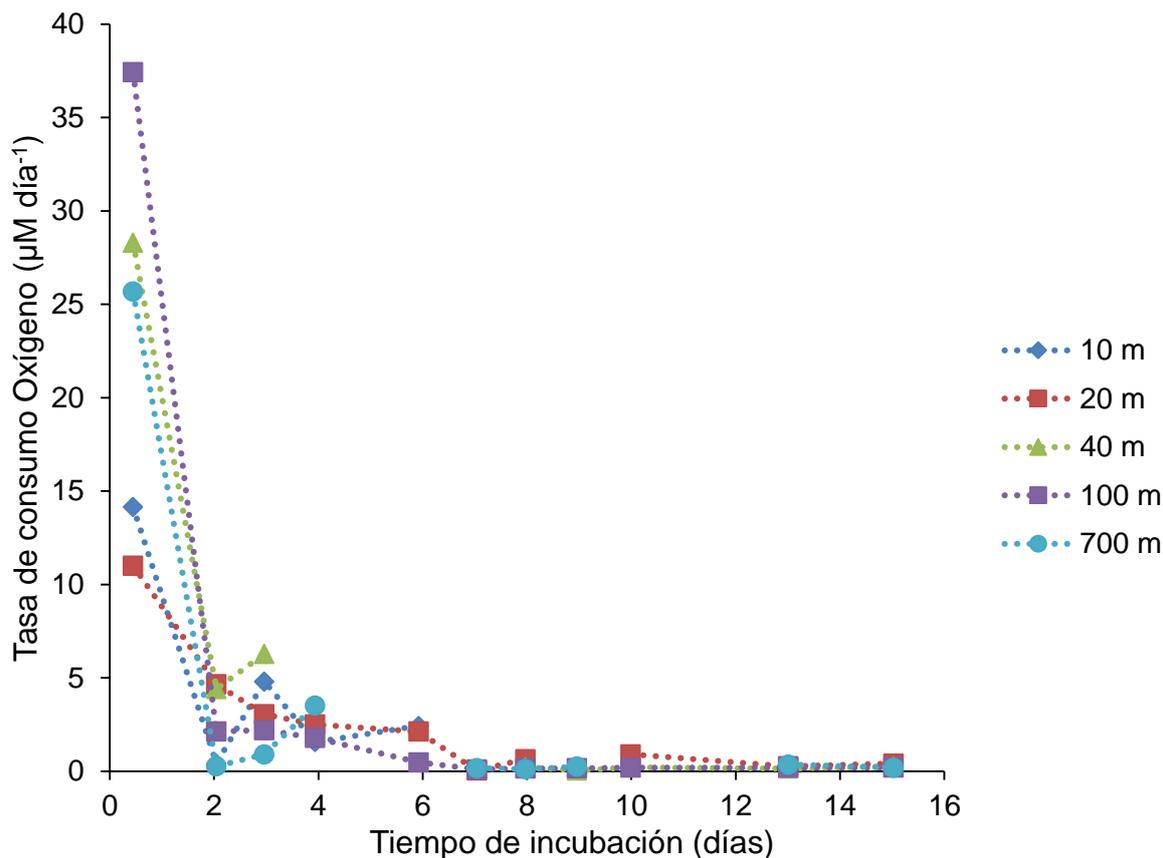


Figura 12. Tasa de consumo de oxígeno por día en la estación Micmar.

- Determinación de carbono orgánico total, carbono orgánico disuelto lábil, carbono orgánico disuelto y carbono orgánico particulado.

Los resultados de TOC representan la muestra completa sin filtrar, los resultados de POC representan la muestra filtrada con filtros GF/F, los resultados de DOC representan la diferencia entre los datos de TOC y POC. Los valores de LDOC se calcularon con el consumo de oxígeno medido durante los primeros 6 días de incubación en los bioensayos ($LDOC_6$) utilizando un RQ (cociente respiratorio; $\frac{\Delta CO_2}{\Delta O_2}$) de 1. Se calculó la constante de degradación de manera empírica utilizando los datos

de consumo de oxígeno de los bioensayos. La constante de degradación calculada k para cada profundidad muestra su decremento a la mayor profundidad (Tabla III).

Tabla III. Carbono orgánico particulado (POC), carbono orgánico disuelto (DOC), carbono orgánico total (TOC), carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) y constante de degradación (k) determinados para la estación Micmar.

Profundidad m	POC μM	DOC μM	TOC μM	LDOC₆ μM	k día^{-1}
10	14.16	72.64	86.80	41.80	0.03
20	11.10	76.30	87.40	45.80	0.10
40	10.19	72.21	82.40	49.60	0.05
100	8.70	88.50	97.20	37.40	0.06
700	4.70	63.50	68.20	24.30	0.04

Los valores de POC tienden a disminuir ligeramente con la profundidad desde un máximo de 14.16 μM en superficie hasta los 4.70 μM a 700 metros. Los perfiles de DOC y TOC muestran la misma tendencia en aguas superficiales ya que en los tres se observa un aumento hacia los 20 metros, un decremento hacia los 40 metros y a partir de los 100 metros de profundidad ambos perfiles, muestran un máximo (97.20 y 88.50 μM respectivamente) mientras que el perfil de LDOC₆ presenta un aumento hasta su valor máximo a los 40 metros de 49.60 μM y un decremento con la profundidad hasta su valor mínimo de 24.30 μM (Fig. 13).

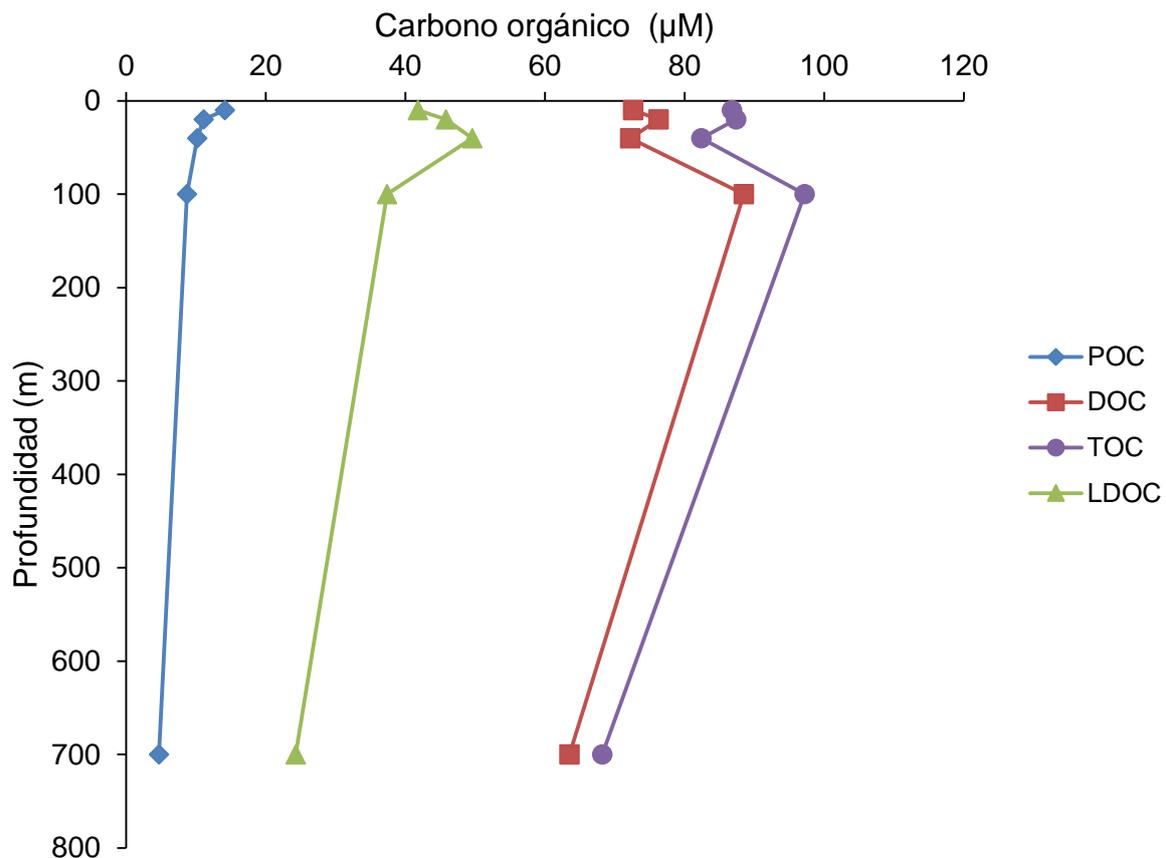


Figura 13. Perfiles de carbono orgánico particulado (POC), carbono orgánico disuelto (DOC), carbono orgánico disuelto lábil (LDOC) y carbono orgánico total (TOC) obtenidos para la estación Micmar.

- Experimentos realizados con cultivos de *Vibrio harveyi* en lote

Con objeto de estudiar el efecto de la respiración y crecimiento bacteriano exclusivamente con bacterias marinas, se generó la cinética de crecimiento así como una serie de tiempo de consumo de oxígeno en un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces. Se observa un aumento en el consumo de oxígeno asociado al crecimiento del cultivo ya que se observa un incremento en el número de células totales cuantificadas con DAPI y el número de células CTC activas. La cinética de crecimiento obtenida muestra que el número de células activas disminuyó después

de las primeras dos horas de incubación para aumentar de manera exponencial a partir de la sexta hora de incubación hasta su máximo aproximadamente a las nueve horas de incubación. Los aumentos en los conteos de células totales y en el consumo de oxígeno muestran una tendencia lineal (Fig. 14). Es importante mencionar que sólo se aprecian las fases de crecimiento lag y exponencial en la cinética obtenida con conteos de células CTC activas. El consumo de oxígeno total encontrado no difiere del patrón observado en el bioensayo para la estación Micmar en el que se registraron valores comprendidos entre los 0 y 34.7, 42.4, 48.1, 58.7 y 65 μM para los 700, 10, 100, 40 y 20 metros de profundidad respectivamente. Las tasas de respiración en el bioensayo para la estación Micmar mostró un patrón descendente (Fig. 12) mientras que los bioensayos con cultivos específicos mostraron un patrón ascendente (Figs. 16 y 19).

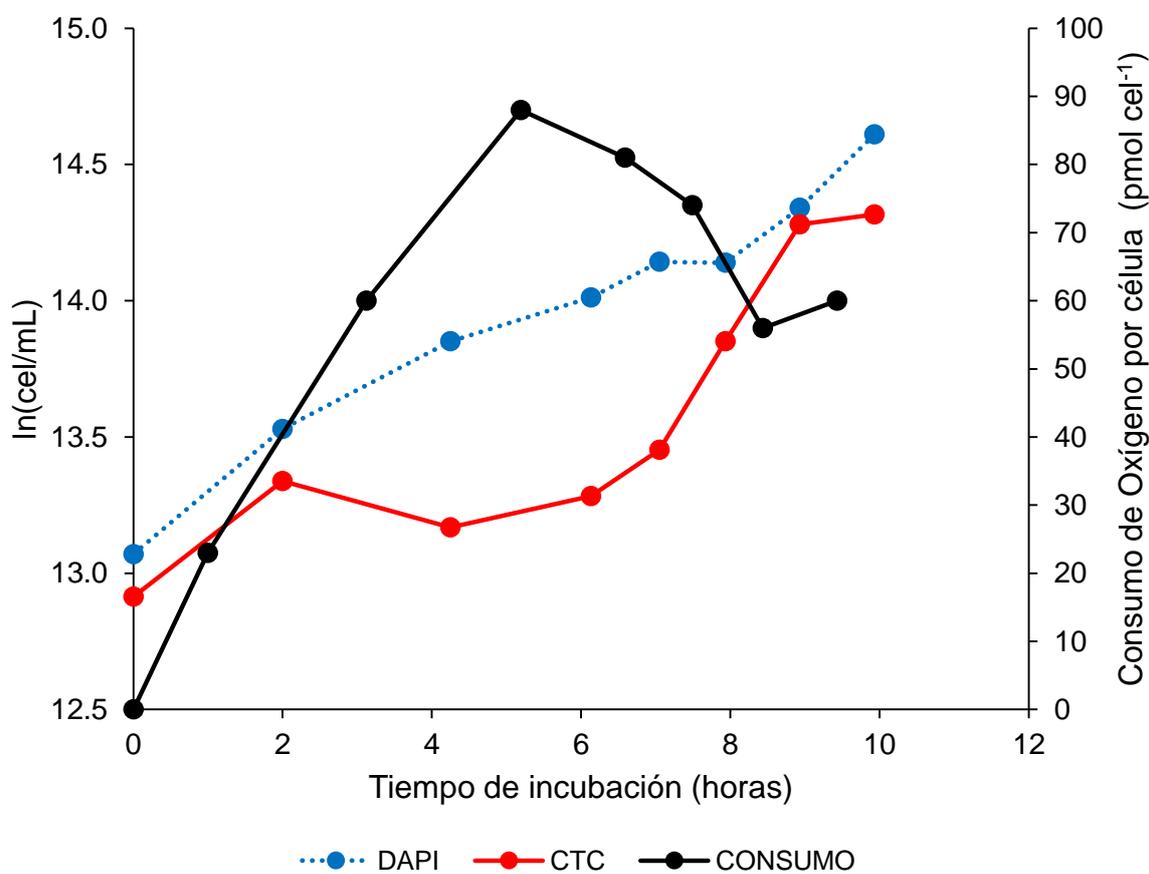


Figura 14. Cinética de crecimiento de células totales (círculos azules y línea punteada azul) y células activas (círculos rojos y línea punteada roja) y consumo de oxígeno por célula (círculos negros y línea continua negra) en un cultivo de *Vibrio harveyi* en ZoBell diluido 500 veces. El eje izquierdo se encuentra en escala logarítmica.

Al inicio del experimento los conteos de células totales y de células CTC activas arrojaron valores similares (4.75×10^5 y 4.06×10^5 cel mL⁻¹ respectivamente). En la figura 14 se observa que el número de células totales contadas durante el periodo de incubación aumenta progresivamente hasta su valor máximo a las diez horas ($\sim 2.21 \times 10^6$ cel mL⁻¹) mientras que el número de células CTC activas aumenta ligeramente a las dos horas incubación para disminuir nuevamente a las cuatro horas y a partir de la sexta hora de incubación se observa nuevamente un aumento en los conteos de células CTC activas hasta su valor máximo $\sim 1.65 \times 10^6$ cel mL⁻¹ (Fig. 15). En todos los tiempos de muestreo la fracción de células activas con relación al total siempre es menor.

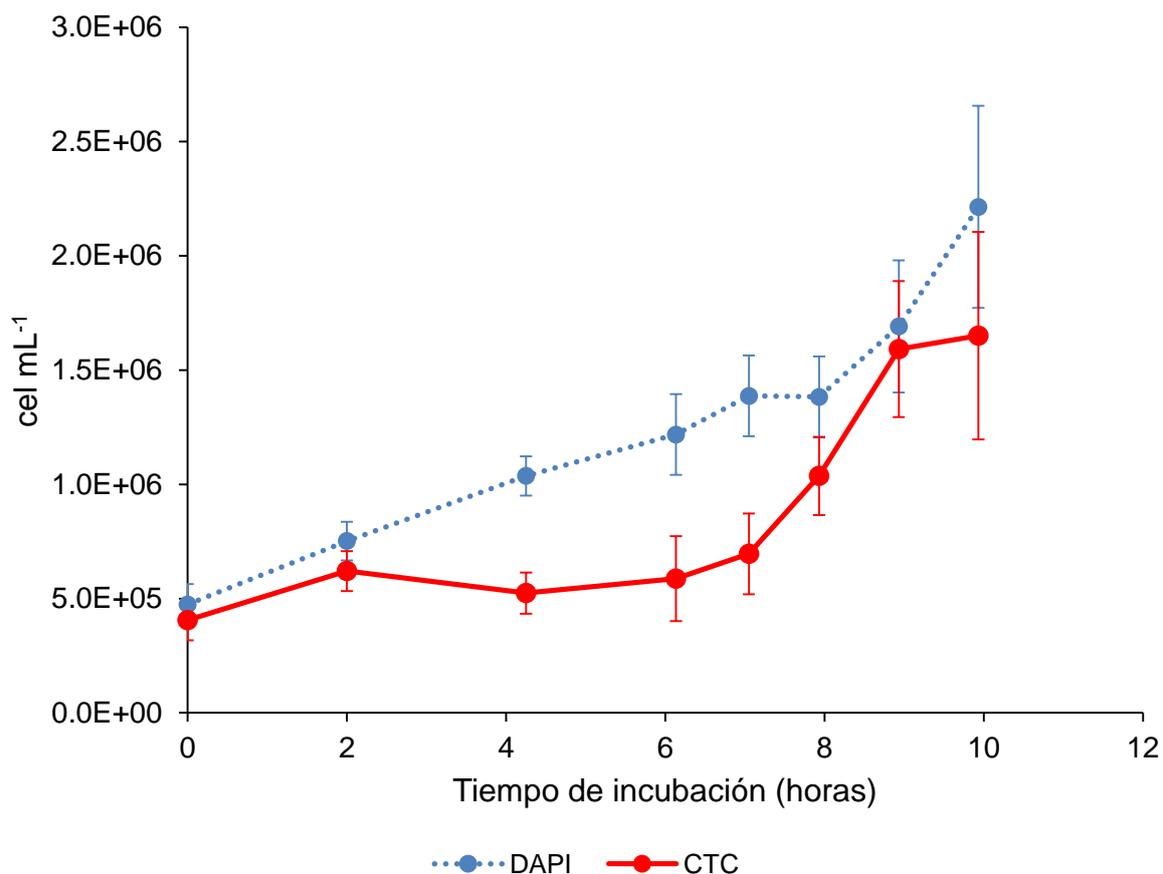


Figura 15. Células totales (círculos azules) y células activas (círculos rojos) en un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces. Las barras muestran el coeficiente de variación $CV = \frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones.

La tasa de consumo de oxígeno por hora ($\mu\text{M h}^{-1}$) muestra un mínimo a las siete horas y un máximo a las ocho horas aproximadamente. Hacia las nueve horas, la tasa de consumo de oxígeno disminuye drásticamente (Fig. 16).

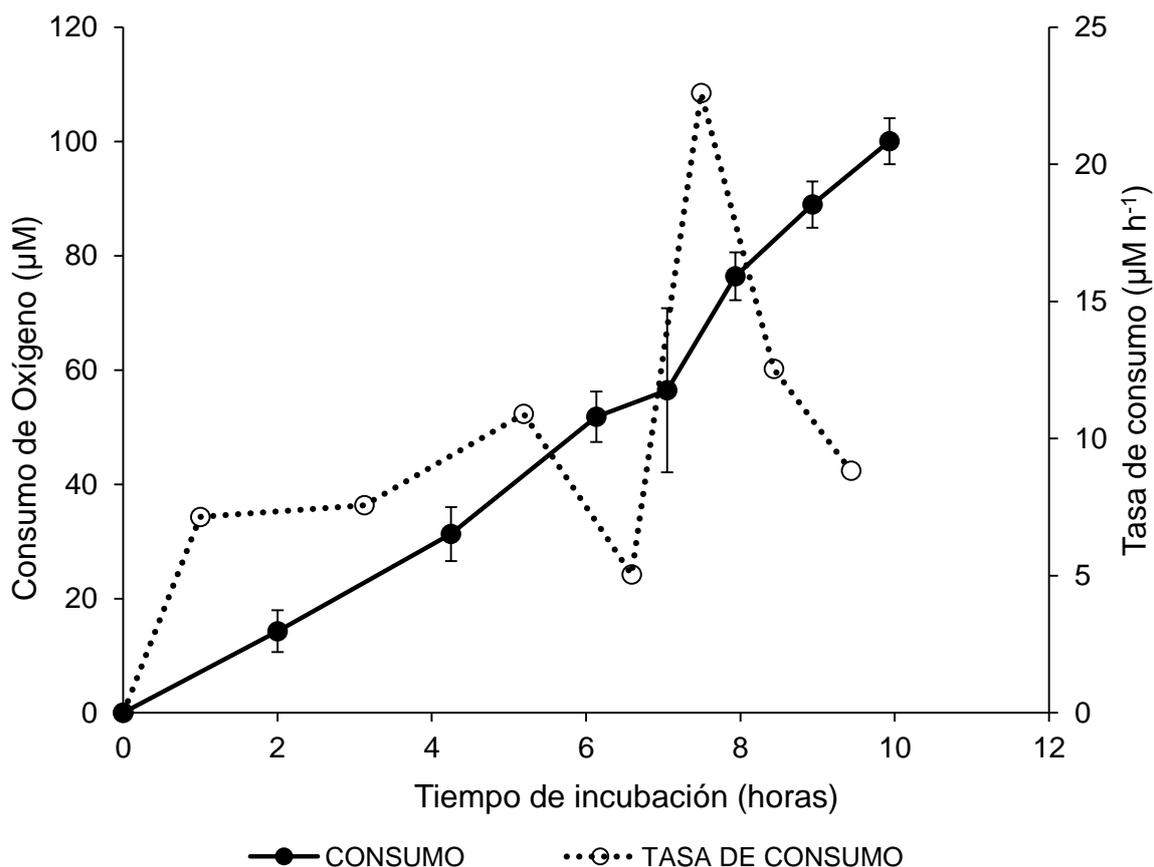


Figura 16. Consumo total de oxígeno (círculos negros y línea continua negra) y tasa de consumo de oxígeno por hora (círculos blancos y línea negra punteada) obtenidos para un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces. Las barras muestran la desviación estándar del consumo de oxígeno obtenida a partir de cuatro réplicas por punto.

Con un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces, se realizó un experimento similar del cual se obtuvieron la cinética de crecimiento, una serie de tiempo de consumo de oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno por hora así como los conteos de células totales y células activas en el cultivo (Figs. 17, 18 y 19).

La cinética de crecimiento obtenida a partir del conteo de células totales muestra valores constantes durante las primeras seis horas de incubación para aumentar a partir de la octava hora hasta alcanzar un valor máximo a las 9.5 horas de incubación. En cuanto a los conteos de células activas, se nota un aumento gradual del número de células hasta alcanzar un máximo a las 9.5 horas de incubación. Es importante mencionar que para los tiempos 8.5, 9,5 y 10 horas de incubación, los valores de células activas son superiores a los valores de células totales (Fig. 17) aunque no tiene significancia estadística. El consumo de oxígeno muestra una tendencia a aumentar acorde con el crecimiento celular.

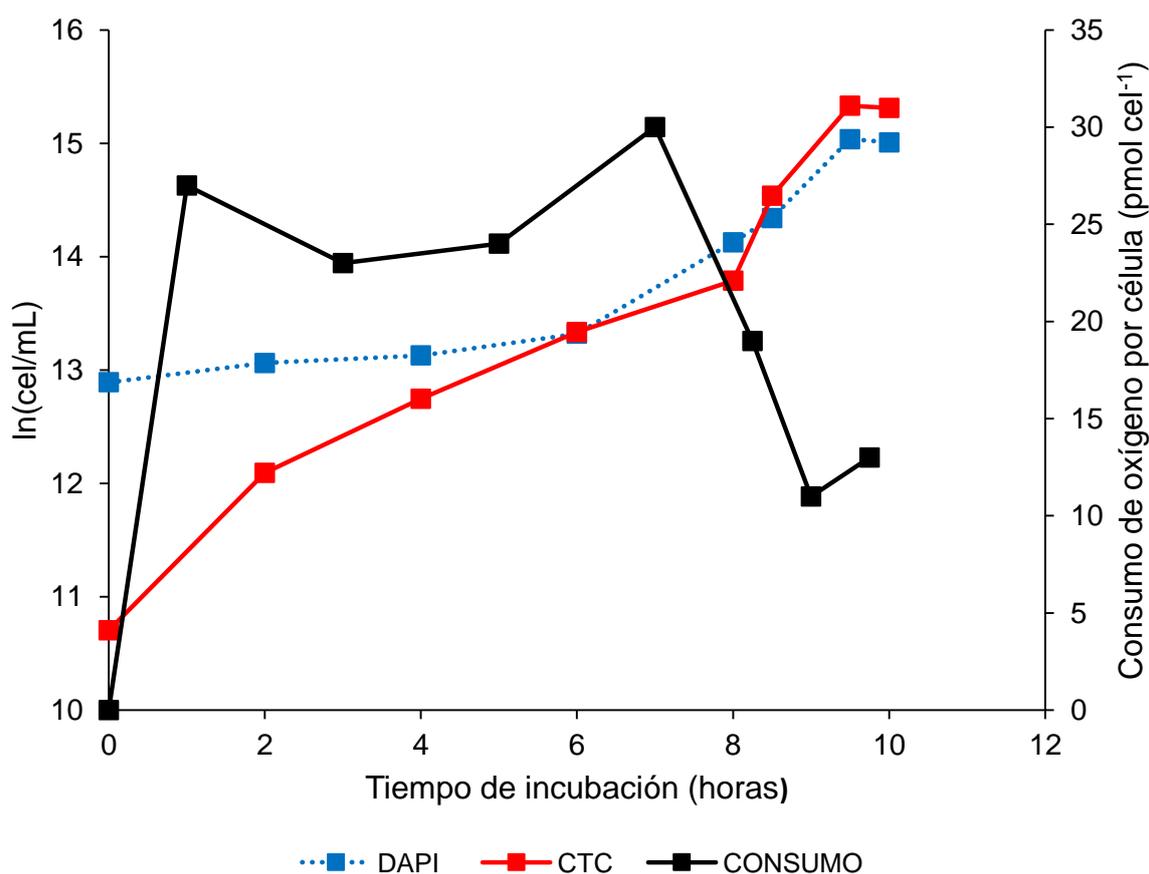


Figura 17. Cinética de crecimiento de células totales (cuadrados azules y línea punteada azul) y células activas (cuadrados rojos y línea continua roja) y consumo de oxígeno por célula (cuadrados negros y línea continua negra) en un cultivo de *Vibrio*

harveyi en ZoBell diluido 250 veces. El eje izquierdo se encuentra en escala logarítmica.

Al inicio del experimento los conteos de células totales arrojaron un valor aproximado de 3.9×10^5 cel mL⁻¹ mientras que la cifra obtenida para células CTC activas fue de 4.4×10^4 cel mL⁻¹. Durante las primeras seis horas de incubación hubo un ligero incremento en el número de células para ambos casos. A partir de la octava hora, se observa un rápido aumento hasta alcanzar valores máximos a las 9.5 horas, 3.4×10^6 cel mL⁻¹ para células totales y 4.56×10^6 cel mL⁻¹ para las células activas (Fig. 18).

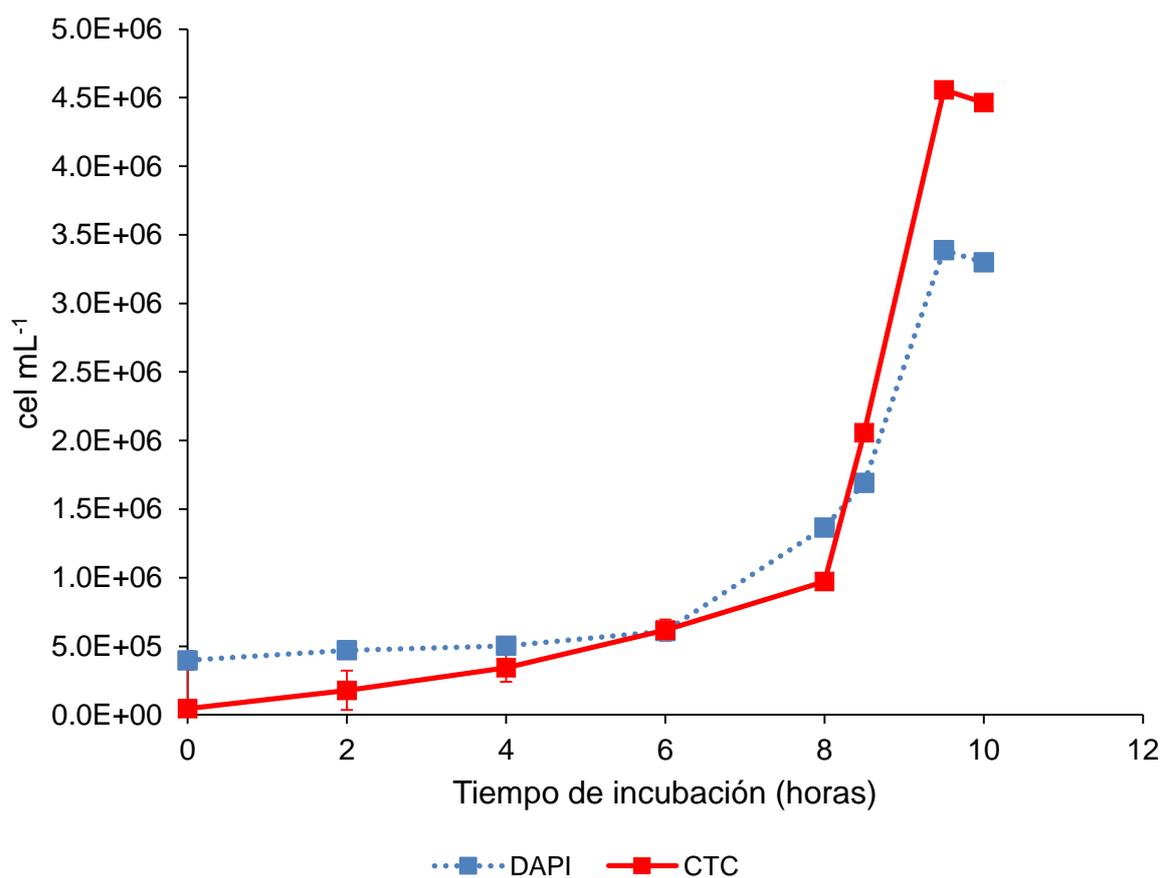


Figura 18. Células totales (cuadrados azules y línea punteada azul) y células activas (cuadrados rojos y línea continua roja) en un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces. Las barras muestran el coeficiente de variación $CV =$

$\frac{\sqrt{N}}{N} * 100$ donde N es el número total de células contadas en cada muestra con cada una de las tinciones.

La tasa de consumo de oxígeno por hora ($\mu\text{M h}^{-1}$) obtenida muestra el mismo patrón que el consumo de oxígeno (μM) con su valor máximo hacia las 8.5 horas, disminuye ligeramente durante la siguiente hora para volver a aumentar hacia el final del experimento (Fig. 19).

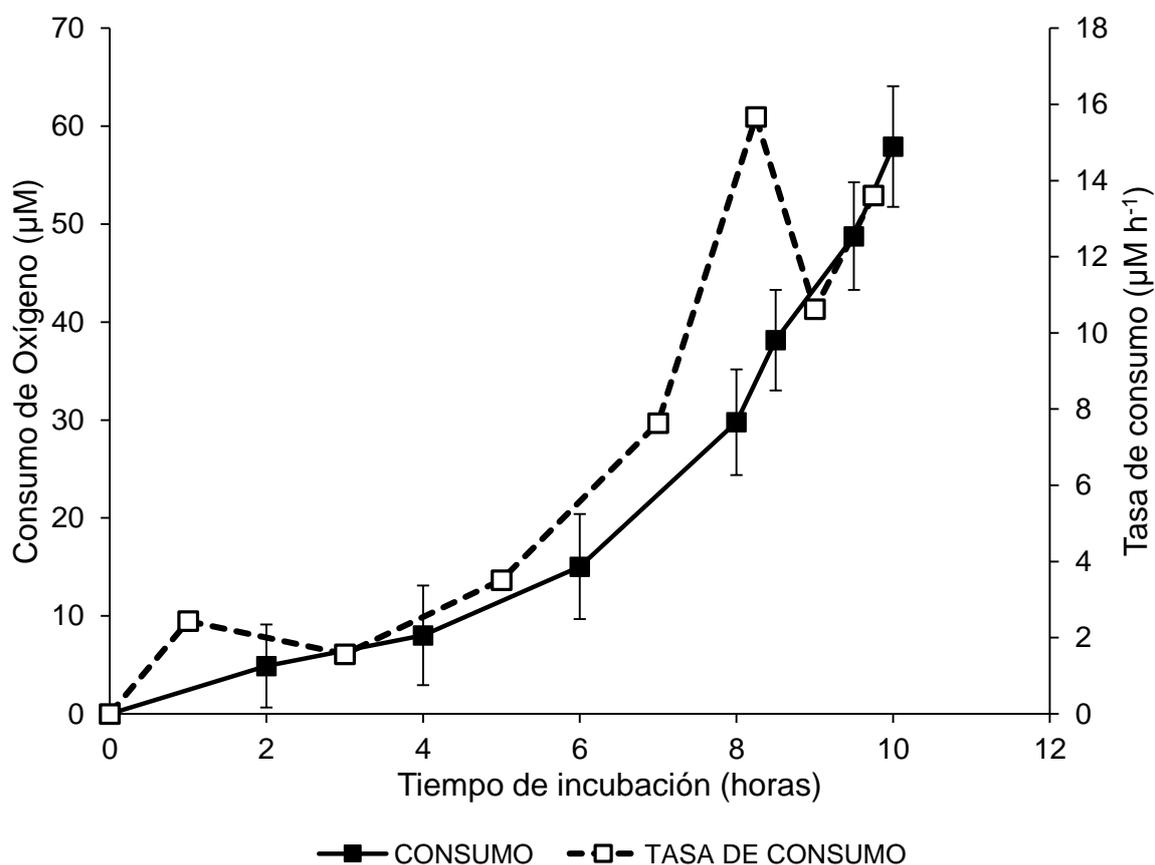


Figura 19. Consumo total de oxígeno (cuadrados negros y línea continua negra) y tasa de consumo de oxígeno por hora (cuadrados blancos y línea punteada negra) obtenidos para un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 250

veces. Las barras muestran la desviación estándar del consumo de oxígeno obtenida a partir de cuatro réplicas por punto.

DISCUSIÓN

- Condiciones hidrológicas

Las temperaturas obtenidas para los primeros 100 metros de la columna de agua se encontraron entre los 16 y 17.5 °C en superficie y 11 °C a 100 metros de profundidad (Fig. 3) con una salinidad promedio de 33.3 y 33.7 (Fig. 5) y concentraciones de oxígeno de 252 y 135 μM respectivamente (Fig. 8). Estos resultados coinciden con la descripción realizada por Lynn y Simpson (1987) para el Agua Subártica del Pacífico (baja salinidad, baja temperatura y altas concentraciones de oxígeno). Durazo y Baumgartner (2002) mencionan que dicha masa de agua entra al Sistema de la Corriente de California (SCC) desde el norte y forma un núcleo altamente oxigenado, de baja salinidad y baja temperatura que se encuentra entre la superficie y los 100 metros de profundidad.

Para aguas subsuperficiales, 200 a 500 metros de profundidad, se registraron temperaturas entre 10 y 6 °C (Fig. 3), salinidades de 34 a 34.3 (Fig. 5) y concentraciones de oxígeno $\leq 100 \mu\text{M}$ (Fig. 8). Lynn y Simpson (1987) caracterizaron como Agua Ecuatorial del Pacífico el flujo subsuperficial de agua cálida, salina y con bajas concentraciones de oxígeno mientras que Durazo y Baumgartner (2002) se refieren a éste como Agua Subsuperficial Ecuatorial (ESsW). Esta agua ingresa a la Subcorriente de California (CU) desde el sur a profundidades entre los 150 y 500 m y es acarreada hacia el norte para formar parte del SCC (Durazo y Baumgartner, 2002).

Con base en lo anterior, se elaboró un diagrama TS (Fig. 6) en el que se observa que sólo dos masas de agua influyeron en la zona de estudio al momento del crucero; Agua Subártica del Pacífico caracterizada por una salinidad entre los 33.1 y 34 y temperaturas entre los 8 y 20 °C y Agua Subsuperficial Ecuatorial con salinidades de 33.3 a 34.6 y temperaturas entre los 8 y 15 °C (Macías-Carballo, 2010).

En lo que respecta al hundimiento del pico de fluorescencia (Fig. 7), de los 13 a los 30 metros de profundidad, éste puede estar asociado a la migración de las células del fitoplacton o bien debido a los diferentes procesos de mezcla que pueden afectar la densidad de la masa de agua (Fig. 20). Está documentado que los organismos fitoplanctónicos (dinoflagelados) se encuentran en aguas someras por las mañanas, cuando el ángulo de incidencia solar es menor, y migran hacia aguas más profundas ricas en nutrientes durante la noche (Hall *et al.*, 2015). Espinosa-Carreón *et al.* (2001) reportaron que el máximo de clorofila en la columna de agua fue somero (a una profundidad de 20 y 30 m) durante el mes de marzo asociado a la posición de la nutriclina (~17 m) ya que a tal profundidad las cantidades de luz y nutrientes serían adecuados para realizar la fotosíntesis. Si bien en este trabajo no se transformaron los datos de fluorescencia a clorofila *a*, el movimiento en la vertical es consistente con lo anteriormente descrito para la zona adyacente. La gráfica de la fluorescencia contra la densidad no muestra una relación clara para las tres estaciones sin embargo, no es posible confirmar si la densidad de las masas de agua influye sobre el desplazamiento del máximo de fluorescencia debido a la ausencia de otros datos (Fig. 20).

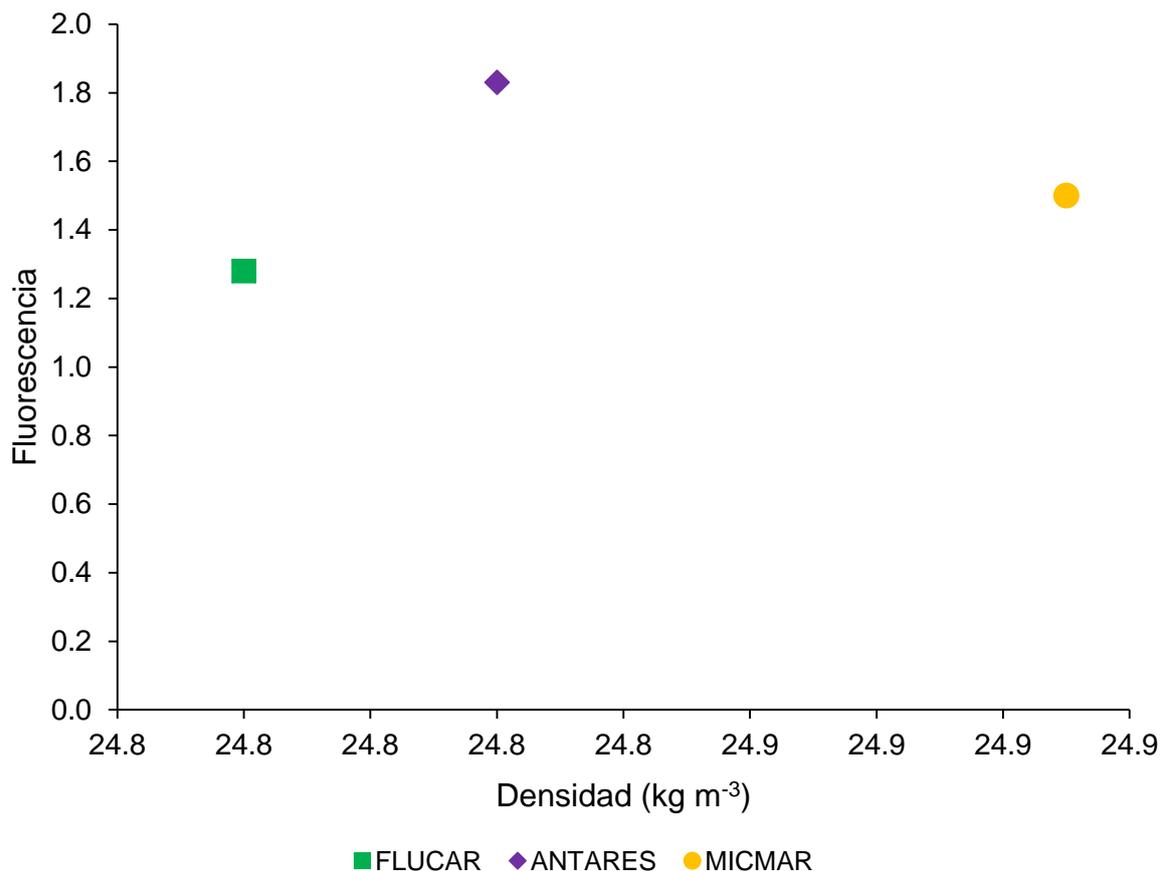


Figura 20. Valor máximo de fluorescencia en función de la densidad para cada una de las estaciones muestreadas.

Las concentraciones máximas de oxígeno disuelto (~250 μM) se registraron en superficie. Es sabido que las altas concentraciones en los primeros metros de la columna de agua se deben al intercambio océano-atmósfera por procesos de turbulencia así como por la liberación de oxígeno como resultado del proceso de fotosíntesis (Serrano, 2012). Con base en lo anterior, el desplazamiento de la oxiclina se puede asociar al hundimiento del pico de fluorescencia (Figs. 7, 8 y 21). La degradación de materia orgánica por procesos bioquímicos y el consumo de oxígeno correspondiente por procesos biológicos para respiración, mantenimiento y obtención de energía suponen una disminución del oxígeno disuelto conforme aumenta la

profundidad (Serrano, 2012); patrón obtenido en los perfiles de oxígeno disuelto presentados en este trabajo (Fig. 8).

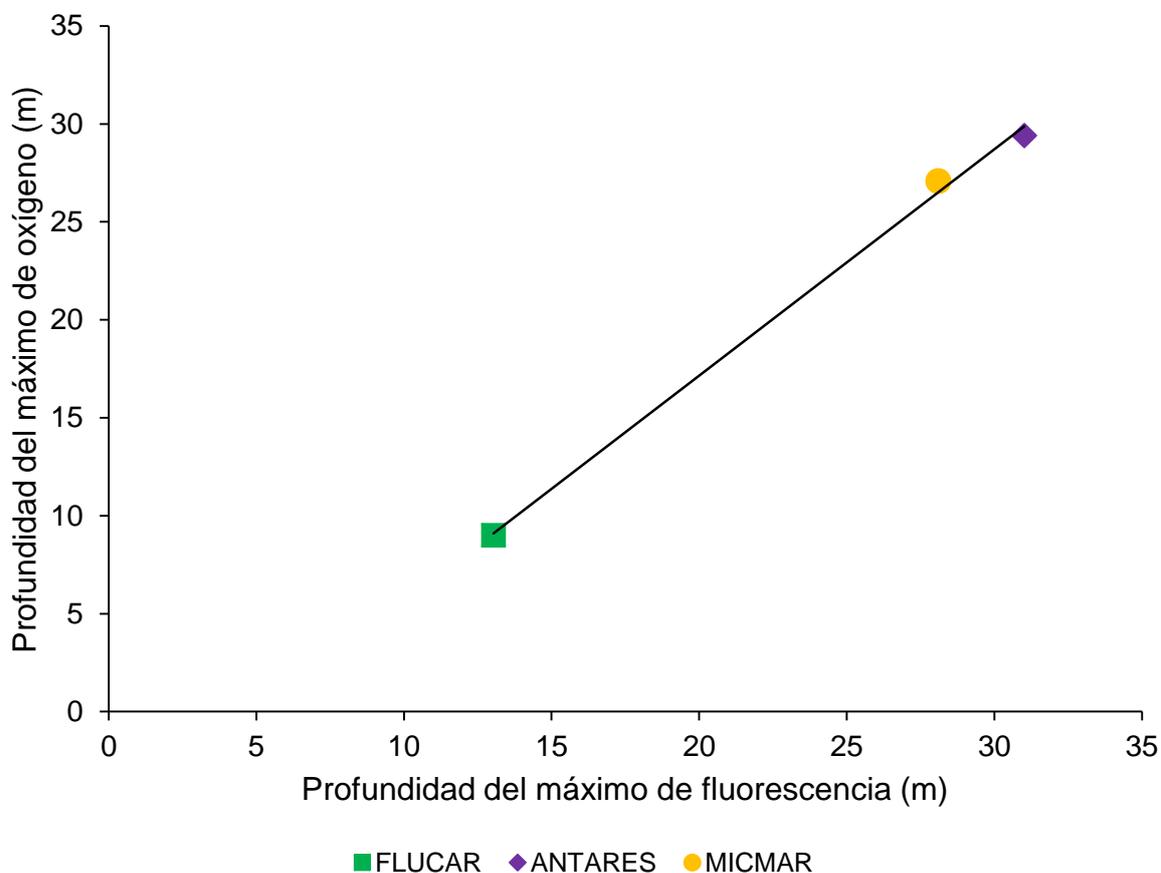


Figura 21. Profundidad del máximo de fluorescencia en función de la profundidad del máximo de oxígeno mostrando una buena relación entre ellas ($y = 0.864x + 5.19$, $r^2 = 0.99$).

En cuanto al mínimo de oxígeno, Segovia-Zavala *et al.* (2013) mencionan que las capas subóxicas se caracterizan por tener concentraciones $<20 \mu\text{M}$ y Serrano (2012) sugiere que estas concentraciones se mantienen casi constantes entre 700 y 800 metros de profundidad. Aunque el mínimo de oxígeno registrado para este trabajo fue de $\sim 8.7 \mu\text{M}$ para las profundidades 640 y 655 metros debemos tener cuidado en la

interpretación de este resultado ya que el electrodo de oxígeno no fue calibrado para establecer un cero de oxígeno absoluto. No obstante, los valores registrados entre 640 y 800 metros de profundidad se mantuvieron por debajo de $20 \mu\text{M}$ por lo que se puede inferir que para la región estudiada, la zona del mínimo de oxígeno (ZMO) fue detectada a partir de los 640 metros (Fig. 8). Sin embargo, más estudios son necesarios para caracterizar la ZMO en la región del Sistema de la Corriente de California.

- Producción bacteriana

En relación a la producción bacteriana, esta es determinada de manera indirecta mediante la utilización marcadores radioisotópicos de ADN (timidina) o de proteína (leucina). Ambos compuestos son marcados con tritio y han sido revisados y debatidos ampliamente (Ducklow, 2000). En este trabajo se obtuvieron resultados de producción bacteriana con el método de la leucina- ^3H con valores $<0.3 \mu\text{gC L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para todas las estaciones. Estos números podrían indicar condiciones oligotróficas en la zona de estudio no obstante varios autores reportan que en esta región de la costa de Baja California, se presentan fenómenos de surgencias durante los meses de marzo a julio los cuales se asocian a altos niveles de nutrientes y por consiguiente de producción primaria (Lynn y Simpson, 1987; Durazo y Baumgartner, 2002; Espinosa-Carreón *et al.*, 2001; Linacre *et al.*, 2012). Aunque nuestro estudio no incluyó la colecta de nutrientes los perfiles de temperatura no muestran alguna tendencia aparente que indique un fenómeno de surgencias durante el momento de muestreo.

De acuerdo con lo anteriormente citado, se esperaría que los valores de producción bacteriana (Fig.8) estuviesen en acorde con la producción primaria descrita para la zona debido a que tanto la abundancia como la producción bacterianas se han reportado que guardan una correlación significativa con la biomasa del fitoplancton (clorofila a) y la producción primaria respectivamente (Ducklow, 2000). Dichas relaciones reflejan la dependencia del metabolismo microbiano con respecto a la producción primaria local (Ducklow, 2000). Sin embargo, al momento de analizar los datos obtenidos para la producción bacteriana, se observa que los controles arrojan valores elevados, similares al resto de las muestras (datos no mostrados), por lo que al restar el efecto del control en éstas se obtuvieron cifras muy bajas que normalmente se asocian a zonas oligotróficas. Así pues, la aparente poca productividad microbiana medida estaría sujeta a problemas de tipo metodológicos que en este momento no permiten evaluar con exactitud la producción bacteriana con el método usado.

- Abundancia bacteriana total y células activas

La tinción de células con la sal de tetrazolio CTC, es un método simple y efectivo que detecta tanto la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) (respiración) como la mayoría de las células metabólicamente activas capaces de iniciar la división celular (Créach *et al.*, 2003). Si bien ha sido utilizado en distintos estudios ecológicos, se trata de una técnica controvertida debido a que no se ha estandarizado y por consiguiente dificulta la comparación de resultados. Las variaciones en los protocolos consisten en el uso de diferentes concentraciones finales de CTC, de 2 a 5 mM las más comunes, así como distintos tiempos de incubación, por lo general >1 hora (Créach *et al.*, 2003; Gasol y Arístegui, 2007). En este trabajo se realizaron conteos

con distintas concentraciones del compuesto (0.5, 1 y 2 mM) para determinar la concentración ideal y con base en los resultados se decidió utilizar la concentración de 1 mM e incubar durante una hora.

En cuanto a los resultados obtenidos con CTC se ha reportado que los conteos de células activas en muestras de campo son inferiores a los conteos de células totales obtenidos con DAPI, por ejemplo Karner y Fuhrman (1997) y del Giorgio y Gasol (2008). Así mismo, Karner y Fuhrman (1997), Smith (1998) y Ullrich *et al.* (1999) mencionan que el número de células CTC activas es inferior al número de células activas determinadas con otros métodos fisiológicos. Ullrich *et al.* (1999) también mencionan que los bajos valores estarían asociados a incertidumbre en la metodología relacionada a la técnica de CTC (ver abajo). Los porcentajes de células CTC activas por lo general representan $\leq 50\%$ de la fracción bacteriana total, ver por ejemplo; del Giorgio y Scarborough (1995). Contrariamente a esta observación, Yager *et al.* (2001) reportaron un 84% de células CTC activas asociado a un florecimiento algal en aguas de la región ártica, hasta ese momento sin precedentes (Gasol y Arístegui, 2007). Los altos porcentajes de células marcadas con CTC en el estudio de Yager *et al.* (2001) indicarían una rápida respuesta de las comunidades a las adiciones de CTC (5 mM y 1 a 3 h de incubación). Sin embargo es difícil la correcta interpretación. Podemos decir que desde la introducción del CTC para cuantificar la cantidad de las células con actividad respiratoria en los ecosistemas acuáticos (Rodríguez *et al.* 1992) se ha intentado ligar el metabolismo a nivel celular con el efecto de la respiración en el ciclo del carbono en el océano. Esta técnica ha sido aplicada en un amplio rango de ecosistemas acuáticos (lagos, ríos, estuarios y

océanos) (del Giorgio y Scarborough, 1995). Dentro de los diferentes ecosistemas el número de células positivas con CTC han mostrado correlación con la tasa de respiración (Smith, 1998; Cook y Garland, 1997), con la concentración de nutrientes y clorofila (del Giorgio y Scarborough, 1995), con la temperatura (Bartosch *et al.*, 2003), con la producción de biomasa bacteriana (del Giorgio *et al.*, 1997; Sherr *et al.*, 1999, Bhupathiraju *et al.*, 1999) y el tamaño bacteriano (Gasol *et al.*, 1995). Por estas razones algunos autores han señalado el potencial de ésta técnica para evaluar el metabolismo celular individual (Sherr *et al.*, 1999; del Giorgio y Gasol, 2008). Sin embargo existen restricciones metodológicas que tradicionalmente se han venido considerando: a) toxicidad de CTC (Kaprelyants y Kell, 1993; Ullrich *et al.*, 1996; Servais *et al.*, 2001, Hatzinger *et al.*, 2003; Gasol y Arístegui 2007) y b) la posibilidad de que no todas las células puedan reducir el CTC (Hatzinger *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003, Gasol y Arístegui 2007). En general los porcentajes relativamente bajos de células activas arrojados con la técnica de CTC (típicamente 5%) cuando se compara con otras técnicas (del Giorgio y Gasol, 2008) han arrojado dudas sobre la utilidad de la técnica.

En este trabajo los conteos celulares mostraron que sólo en la estación Flucar la abundancia bacteriana total fue mayor o igual a la cantidad de células CTC activas. En el caso de las estaciones Antares y Micmar, se obtuvieron resultados de células activas superiores a los resultados del conteo con DAPI para algunas profundidades (Fig. 9). Si bien se obtuvieron porcentajes de células CTC activas $\leq 50\%$ similares a los obtenidos en estudios previos, también se presentaron valores comprendidos

entre el 50 y 100% así como valores >100%, mismos que reflejarían problemas de la técnica utilizada (Tabla IV).

Tabla IV. Células CTC activas, abundancia bacteriana total (DAPI) y porcentaje de células CTC activas. *resultados superiores al 100% indicarían problemas metodológicos.

Estación	Profundidad m	%CTC activas
Flucar	20	35
	40	59
	50	98
	70	52
Antares	20	46
	40	115
	150	130
	200	116
	680	94
Micmar	10	88
	20	40
	40	105
	100	76
	700	39

Los altos porcentajes de células activas podrían explicarse por fallas en el criterio de conteo. El efecto del criterio del conteo también fue evaluado con experimentos en el laboratorio (ver “Experimentos realizados con cultivos de *Vibrio harveyi* en lote”) en los que igualmente se observaron altos porcentajes de bacterias CTC positivas. Gasol y Arístegui (2007) mencionan que el CTC detiene el crecimiento y la actividad celular y sostienen que una aparente desintegración celular ocurre al adicionar el compuesto que tiene como consecuencia la liberación de los cristales de formazano. Por otra parte con los datos del crucero se introdujo la incertidumbre de que las muestras teñidas con DAPI utilizadas para determinar abundancia bacteriana no provienen del

mismo filtro usado para el conteo con CTC. Por lo general las muestras para determinación de células CTC activas con microscopía de epifluorescencia también son teñidas con DAPI con el fin de asociar los cristales de formazano a las células (Sherr *et al.*, 2001 en Gasol y Arístegui, 2007) empero no fue el caso. La omisión del tinte DAPI en las muestras utilizadas para los conteos de células CTC activas tuvo como resultado una sobrestimación ya que se consideró a cada cristal de formazano como una célula activa. Si bien es cierto que la presencia de un solo cristal de formazano en la membrana celular es indicador de actividad metabólica es posible encontrar dos o más de estos cristales por cada célula activa (Gasol y Arístegui, 2007; Nielsen *et al.*, 2003). Es preciso mencionar que los conteos de células CTC activas se realizaron con análisis de imágenes de las muestras y por conteo directo y en ambos casos se observó la misma tendencia en la proporción de células totales y células CTC activas (Tabla. V). En la tabla V se muestra el resultado de la prueba del recuento de las muestras de bacterias CTC positivas mediante el uso de la cámara y obtención de imágenes y el conteo normal a ojo del operador del microscopio. La tabla muestra que prácticamente no hay diferencia entre el conteo a ojo y el realizado sobre las imágenes obtenidas con la cámara. Los experimentos con *V. harveyi* y CTC realizados indican un porcentaje menor de bacterias CTC positivas al de células totales marcadas con DAPI. También indican un incremento gradual de células CTC positivas con el desarrollo del cultivo en el tiempo y concuerda bien con el comportamiento esperado en un cultivo en lote de bacterias marinas. La discordancia de este patrón obtenido en laboratorio con las muestras de campo es difícil de evaluar pero mientras en laboratorio tenemos un cultivo puro de bacterias, en el campo hemos utilizado la muestra completa del plancton que incluye organismos eucariotas, que pueden reducir el CTC y producir cristales de formazano y elevar el número de células

activas ya que en los experimentos en el campo se determinaron la cantidad de células CTC positivas y células totales (DAPI) en diferentes filtros. Entre otros factores que contribuyen a la imprecisión de la técnica se incluye una posible subestimación de las células totales por mal estado de la solución de DAPI. Sin embargo, el cuidado tenido con el manejo de la solución de DAPI y los números de células totales obtenidos, no favorecen esta hipótesis.

Tabla V. Comparación de la razón de células CTC activas/DAPI contabilizadas por conteo directo y por análisis de imágenes para las tres estaciones muestreadas.

Estación	Profundidad	Razón CTC/DAPI	
	m	Conteo directo	Conteo con imágenes
Flucar	20	0.35	0.35
	40	0.59	0.37
	50	0.98	0.61
	70	0.52	0.30
Antares	20	0.46	0.18
	40	1.15	0.90
	150	1.30	1.72
	200	1.16	1.39
	680	0.94	0.71
MICMAR	10	0.88	0.55
	20	0.40	0.36
	40	1.05	1.13
	100	0.76	0.77
	700	0.39	0.34

- Respiración bacteriana usando el INT como indicador de la actividad del sistema de transporte de electrones

En los ambientes marinos, las técnicas más utilizadas para medir respiración son el consumo de oxígeno en oscuridad y los bioensayos *in vitro* para determinar actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) (Villegas-Mendoza *et al.*, 2015); en esta

sección se tratará solamente la actividad del ETS. Al igual que el CTC, la sal de tetrazolio INT ha sido utilizada para determinar la actividad del sistema de transporte de electrones y ambas técnicas se basan en la reducción de tetrazolio a cristales de formazano insolubles en agua, mismos que pueden ser detectados por espectrofotometría o bien por microscopía (Martínez-García *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Packard y Williams (1981), los autores demostraron que la actividad del sistema de transporte de electrones y la respiración siguen un mismo patrón que más tarde fue reportado en diversas investigaciones (Arístegui y Montero, 1995). En 2009, Martínez-García y colaboradores propusieron un método para estimar la respiración de comunidades planctónicas utilizando la proporción existente entre el consumo de oxígeno y la reducción del INT. No obstante, en un reciente estudio realizado por Villegas-Mendoza (2015) se argumenta que debido a la toxicidad del INT la reducción de tetrazolio no funcionaría como estimador y en su lugar proponen la utilización de la producción de formazano. En el presente trabajo se estimó la respiración utilizando la ecuación propuesta por Villegas-Mendoza *et al.* (2015).

Los valores de producción de formazano obtenidos para los controles en cada una de las estaciones fueron similares al resto de las muestras (Antares, 7.03 μM , Flucar, 10.21 μM y Micmar 7.19 μM). Como consecuencia, al restar el control a las muestras de cada perfil, los resultados fueron en su mayoría bajos o bien negativos ($\leq 3 \mu\text{M}$) y por ende, la respiración sólo pudo ser estimada para dos profundidades de la estación Antares (20 y 150 metros) y para todas las de la estación Micmar como se observa en la tabla II. El uso de un volumen relativamente pequeño de muestra (100 mL) en la determinación del formazano generado a partir del INT, limita la sensibilidad de la

técnica porque el valor numérico de la señal es disminuido con los altos blancos. En relación a lo anterior, Packard y Williams (1981) reportaron altos valores en sus controles y los asociaron al origen (fabricante) del INT utilizado ya que este reaccionó de forma no enzimática con algunos sustratos del ETS (NADH, NADPH y succinato) y recomiendan que se omita el uso de soluciones de INT que promuevan esta reducción no enzimática.

Por su parte, Smith y McFeters (1997) mencionan que es importante tener en cuenta qué inhibidor se va a utilizar para los controles puesto que en algunos casos pueden favorecer la reducción del INT, por ejemplo, el cianuro de potasio (KCN) y la azida de sodio (NaN_3). También mencionan que es necesario dejar actuar el inhibidor durante el tiempo suficiente para que la actividad metabólica de las células termine por completo. Con lo anterior en mente, se realizaron pruebas de laboratorio (datos no mostrados) para intentar obtener blancos usando tres inhibidores a diferentes concentraciones (NaN_3 (50, 5 y 0.5 mM), NaCN (2, 0.2 y 0.02 mM) y formaldehído a una concentración de 2% final). Para el caso de la azida de sodio y el cianuro de sodio, se obtuvieron altas concentraciones de formazano en comparación con las obtenidas cuando se utilizó el formaldehído al 2% y contrario a lo que describen Smith y McFeters (1997), se encontró que una lisis celular es inducida al usar tanto la azida y como el cianuro de sodio ya que en ambos casos se liberan compuestos celulares que reducen el INT a formazano. Esta lisis celular no se presentó cuando se usó formaldehído. Con base en tales resultados, se optó por usar formaldehído. En cuanto al tiempo de incubación, este veneno se dejó actuar en las muestras de campo durante una hora (Martínez-García *et al.*, 2009), periodo que sería más que suficiente para detener el metabolismo celular de acuerdo a los 15 minutos que Smith y

McFeters (1997) reportaron como suficientes para interrumpir la actividad metabólica. Es probable que un mejor protocolo en el uso de los controles pueda generarse al agregar formaldehído a la muestra y refrigerarla durante una hora para posteriormente agregar la solución de INT. Sin embargo, también es posible que la técnica requiera de mayor sensibilidad al tratarse de muestras tomadas a diferentes profundidades, es decir, que cuando se desee utilizar la técnica *in situ* sería adecuado realizar un control para cada una de las muestras colectadas. Si bien, esto implica el análisis de un mayor número de muestras, también aumentaría la precisión de la prueba.

- Determinación de carbono orgánico total, carbono orgánico disuelto lábil, carbono orgánico disuelto y carbono orgánico particulado

El carbono orgánico disuelto (DOC) conforma el sumidero de materia orgánica más grande del océano y juega un papel importante en el ciclo del carbono y por consiguiente en la bomba biológica sin embargo, el desarrollo de técnicas para su análisis es relativamente reciente (Carlson *et al.*, 2010). Con base en la reactividad del DOC este puede ser clasificado en diferentes fracciones entre las que destacan la fracción lábil (LDOC), rápidamente degradada en su mayoría por microbios, y la fracción refractaria (RDOC) que funciona como reservorio de carbono orgánico hasta su eventual mineralización o eliminación por otro tipo de procesos (Hansell, 2013). Con la finalidad de obtener la distribución del carbono orgánico disuelto en los primeros 700 metros de la columna de agua se tomaron muestras de agua de mar en la estación Micmar para cuantificar carbono orgánico total (TOC) y carbono orgánico particulado (POC) para finalmente deducir la concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) presente en la zona de estudio como la diferencia entre ambas

fracciones. Los perfiles obtenidos para TOC, POC y DOC muestran una distribución típica de estas variables con valores superficiales altos y disminuyendo con la profundidad (Hansell, 2013). La concentración máxima para el TOC ($90 \mu\text{M}$) ocurre a los 100 metros de profundidad y el carbono lábil (49.6) a los 40 metros mientras que el máximo de POC ocurre a 10 metros ($16 \mu\text{M}$). La magnitud de los valores es comparable a lo que típicamente se encuentra en la literatura (Hansell, 2013) con máximos en las capas más someras y mínimos a mayor profundidad, reflejando el efecto de la producción de partículas por producción primaria y secundaria así como la liberación de DOC por procesos biológicos de muerte, lisis, depredación, entre otros. Debido a que la cuantificación de DOC se realizó calculando la diferencia entre el TOC y el POC, los perfiles obtenidos para TOC y DOC son idénticos en su forma y distintos en magnitud. El LDOC_6 resulta de un cálculo independiente a partir del consumo de oxígeno y el uso de un RQ de 1 (ver adelante) por lo que la magnitud de su concentración es incierta. Sin embargo, los valores de DOC calculados caen dentro del rango de otras observaciones (del Giorgio y Davis, 2003) (24 a $49 \mu\text{M}$) típicos de una plataforma continental (Biddanda, 1988). La distribución del LDOC_6 muestra congruencia con patrones esperados de actividad biológica en la columna de agua con máximos de concentración en las capas superficiales y una disminución gradual con la profundidad donde la actividad biológica en general disminuye por la falta de luz, el descenso de la temperatura y la falta de suministro de materia orgánica. Sin embargo los resultados obtenidos deben enmarcarse en la siguiente perspectiva. La determinación de carbono lábil mediante bioensayos con bacterias marinas depende de la determinación apropiada de la producción de biomasa y respiración bacteriana así como de la viabilidad del crecimiento bacteriano en la muestra de agua evaluada o bien la determinación del consumo de oxígeno durante un tiempo de incubación

prolongado > 1 día. En esta aproximación se adopta el mismo principio que para la determinación de la demanda biológica de oxígeno (BOD) (Water Environment Federation, 1998). Actualmente la exactitud en la determinación de la respiración y producción bacteriana es muy difícil de evaluar y es necesario trabajar con el nivel de incertidumbre inherente a la medición de ambos procesos metabólicos (producción de biomasa y respiración). En este trabajo se encontró que los valores de respiración y producción bacteriana corresponden a una región oligotrófica similar a los episodios reportados por Linacre *et al.* (2012) para esta zona de estudio y por ende, se ha considerado que los datos obtenidos son posibles. Sin embargo, la cuantificación de carbono lábil con el tipo de bioensayos usados muestra claramente que el consumo de oxígeno puede seguir incluso después de que el carbono lábil ha sido agotado (Figs.11 y 12) como lo sugiere la cinética de la tasa de respiración (Fig. 12). Mientras que el consumo total de oxígeno parece continuar hasta los 15 días de incubación para todas las profundidades (Fig.11), al usar la tasa de consumo de oxígeno por día como indicador, observamos que aparece una disminución gradual de la tasa de respiración en los primeros 2, 6 y 7 días de incubación a las profundidades de 700, 100 y 20 metros de profundidad respectivamente sugiriendo un diferente contenido de carbono lábil y su disminución con la profundidad (Fig. 13). El patrón de la tasa de consumo en la figura 12 puede ser usado como criterio para definir el tiempo de incubación que debe ser considerado en el cálculo del consumo total de oxígeno en bioensayos de este tipo. Por ejemplo si se considera el consumo de oxígeno durante el período completo de incubación (15 días) para la profundidad de 20 metros, se obtiene un valor de 65 μM y solamente de 45.8 μM si se consideran los 6 días que indica la figura 12. La conversión del consumo de oxígeno a consumo de carbono requiere del uso del cociente respiratorio $RQ = \frac{\Delta CO_2}{\Delta O_2}$ que representa la razón molar de

carbono producido y oxígeno consumido. A partir de consideraciones bioquímicas, teóricamente la variación esperada para este cociente parece ser pequeña (0.5 a 1.33) de acuerdo a Williams y del Giorgio (2005), donde los valores más pequeños corresponden a la oxidación de materia orgánica más reducida como por ejemplo el metano y los valores más altos a los compuestos más oxidados como el ácido glicólico. No obstante lo anterior, recientemente (Berggren *et al.*, 2012) ha sido demostrado que el RQ en comunidades de bacterias acuáticas puede variar de 0.5 a 4 aunque por lo general este tiende a agruparse alrededor de 1.2. Por su parte, Romero-Kutzner *et al.* (2015) usando dos cultivos puros de dos bacterias marinas, encontraron que el estado nutricional afecta el valor del RQ y que incluso puede llegar a tener un valor de 10. El uso de distintos valores de RQ pueden producir un amplio rango de valores de LDOC₆, por ejemplo, para los 40 metros de profundidad estos van de 24.78 a 495.67 μM (Tabla VI). Es importante mencionar que el reciclamiento de DOC puede confundir la cuantificación exacta del carbono lábil si no se toma un criterio como el adoptado en este trabajo (LDOC₆). Los datos obtenidos en este trabajo, indican que en los presentes bioensayos ocurre reciclamiento del carbono orgánico vía el metabolismo endógeno de los microorganismos presentes en la muestra (del Giorgio y Cole, 2000).

Tabla VI. LDOC₆ calculado para todas las profundidades de la estación Micmar con diferentes coeficientes respiratorios (RQ).

RQ	0.5	1	4	10
Profundidad (m)	LDOC ₆ (μM)			
10	20.92	41.83	167.33	418.33
20	22.92	45.83	183.33	458.33
40	24.78	49.57	198.27	495.67
100	18.70	37.40	149.60	374.00
700	12.17	24.33	97.33	243.33

Los bioensayos para cuantificación de carbono lábil en el presente estudio se incubaron en condiciones de oscuridad y se utilizó la muestra de agua completa, es decir, sin excluir organismos de tamaño mayor al de los procariotas marinos; en esencia se incluyó a todo el espectro de eucariotas autótrofos y heterótrofos. Las incubaciones en la oscuridad también impiden que los productos de fotooxidación sean reabastecidos y puede ocurrir que en el bioensayo se seleccionen bacterias oportunistas que pueden confundir la aparente labilidad (del Giorgio y Davis, 2003). Cuando comparamos los experimentos con muestras de plancton sin filtrar con el de cultivos puros de bacterias marinas, observamos que el patrón en el consumo de oxígeno en este tipo de bioensayo es similar al observado en los bioensayos de bacterias específicas como se observó en los experimentos de laboratorio realizados con cultivos de la bacteria marina *Vibrio harveyi*. El consumo de oxígeno por parte de la comunidad planctónica (muestras de campo) durante todo el período de incubación mostró un patrón con tendencia ascendente y arrojó valores máximos comprendidos entre 30 y 100 μM de O₂, (700 metros y 20 metros de profundidad respectivamente) (Fig. 11). En lo que respecta al consumo de oxígeno en bioensayos monoespecíficos,

este mostró una tendencia a aumentar en función del tiempo hasta llegar a valores máximos de ~60 y ~100 μM en los cultivos creciendo en medios diluidos 250 y 500 veces respectivamente (Figs. 14 y 19). Al comparar los resultados obtenidos en ambos tipos de bioensayos, se observa que el consumo de oxígeno de la comunidad planctónica (~ 30 a 100 μM) es similar al oxígeno consumido en cultivos monoespecíficos (~60 y ~100 μM). Debido a esto, los datos parecen indicar que el metabolismo bacteriano tiene un papel predominante en el consumo de oxígeno con respecto al resto de la comunidad planctónica y que las concentraciones de carbono lábil (LDOC₆) obtenidas en los bioensayos no específicos (además del DOC), representan el consumo del carbono proveniente de todas las partículas presentes en la muestra.

- Experimentos realizados con cultivos de *Vibrio harveyi* en lote para comparar una de la técnicas de respiración bacteriana usadas (consumo de oxígeno en la oscuridad) y la abundancia de células activas (CTC positivas).

Se realizaron cultivos de *Vibrio harveyi* con la finalidad de realizar pruebas metodológicas de dos técnicas utilizadas para medir respiración bacteriana, bioensayos *in vitro* de ETS y consumo de oxígeno en la oscuridad (Villegas-Mendoza *et al.*, 2015). Las pruebas consistieron en mediciones del consumo de oxígeno en la oscuridad, determinación de la tasa de consumo de oxígeno por hora así como conteos de bacterias totales con tinción DAPI y bacterias CTC positivas en dos cultivos frescos creciendo a diferentes concentraciones en medio ZoBell. En ambos cultivos se observó un incremento en el número de células totales y activas y sólo en el experimento con medio ZoBell diluido 250 veces (Fig. 18) se registraron valores de

células CTC positivas similares a los obtenidos mediante el conteo directo con DAPI. Los porcentajes de células CTC positivas fluctuaron entre 11 al inicio y >100% para el cultivo con medio diluido 250 veces y entre 86 y 75% para el cultivo con medio diluido 500 veces (Tabla VII).

Tabla VII. Porcentaje de células CTC positivas en el tiempo para un cultivo de *Vibrio harveyi* creciendo en medio ZoBell diluido 500 veces (ZB 500) y otro creciendo en medio ZoBell diluido 250 veces (ZB 250).

Tiempo (h)	ZB 500	ZB 250
0	86	11
2	83	38
4	51	68
6	48	101
7	50	71
8	75	122
9	94	134
10	75	135

Aunque dicho fenómeno se observó también en las muestras de campo no obstante que para las muestras de los experimentos de laboratorio sí fueron tratadas con una doble tinción DAPI y CTC para la misma muestra en el mismo filtro. El desarrollo de células CTC positivas en el tiempo para los cultivos, corresponde al desarrollo natural de un cultivo donde una fracción relativamente pequeña, al inicio del mismo, se incrementa con el tiempo a medida que la división celular aumenta y crece la población. Sin embargo esta explicación no se aplica a los experimentos realizados con muestras de campo. El problema de la presencia de altos valores de células CTC positivas no debería deberse a algún efecto artificial de las longitudes de excitación y emisión usadas para el CTC ni al filtro óptico usado en el microscopio de epifluorescencia que son similares a lo que ha sido recomendado (Table of Fluorochromes, biotech.iastate.edu). Ahora bien, en ninguna de las preparaciones en las que se usó CTC, pudo ser eliminada la fluorescencia de fondo (incluso aplicando

el filter freeze transfer y observando sobre el portaobjetos) que presentan los filtros de policarbonato negros lo que podría estar causando las discrepancias en los conteos. Sin embargo el conteo directo a ojo de células CTC positivas y mediante imágenes y el software del microscopio no muestran diferencias significativas que indiquen que esto puede ser la causa del problema. Desgraciadamente por cuestiones de tiempo no fue posible hacer más pruebas para determinar el origen de los altos valores de células CTC activas que se presentaron tanto en los datos obtenidos de campo como en los obtenidos en laboratorio.

Como se describió anteriormente, en lo referente al consumo de oxígeno, se observó la misma tendencia a aumentar en función del tiempo en los resultados de campo (Fig. 11) y en los resultados de laboratorio (Figs. 16 y 19). Si bien se trata de un comportamiento similar entre ambos casos, los resultados de campo, son obtenidos con incubaciones a largo plazo (>1 día), donde el aparente consumo de oxígeno en realidad sería el reflejo de respiración continua de carbono orgánico disuelto mientras que en los experimentos en laboratorio se utilizaron incubaciones cortas donde únicamente se siguió el crecimiento bacteriano. En estos experimentos se observa el incremento concomitante de la abundancia celular y la tasa de consumo de oxígeno indicando que el proceso puede ser medido con buena exactitud en este tipo de bioensayos. Por ejemplo el comportamiento antes descrito para los experimentos de campo (estación Micmar) se observa mejor cuando se toma en cuenta la tasa de consumo de oxígeno por día en la que se observa que el consumo por parte de la comunidad planctónica finaliza alrededor del sexto día de incubación (Fig. 12) mientras que las tasas de consumo de oxígeno por hora obtenidas de los

experimentos de laboratorio muestran que el consumo de oxígeno se lleva a cabo durante todo el período de incubación, significativamente más corto (Figs. 16 y 19).

CONCLUSIONES

Es posible realizar la cuantificación de LDOC mediante bioensayos de crecimiento y respiración de bacterias marinas utilizando la medición del consumo de oxígeno en la oscuridad, tal como se realizó en los experimentos de campo y laboratorio. Las dificultades metodológicas que se presentaron en este trabajo fueron evaluadas. Las principales fueron, el reciclamiento de materia orgánica y el efecto del valor del cociente respiratorio (RQ) usado. Ambos problemas introducen un error considerable en la estimación de LDOC si no son evaluados. La distribución vertical del LDOC obtenida para la estación Micmar, parece congruente con la distribución esperada pero la cantidad exacta de LDOC que ha sido cuantificada necesita corroborarse con mediciones directas del RQ.

La cuantificación de células con actividad respiratoria utilizando el CTC no corresponde con la mayoría de los datos reportados en la literatura donde se documenta una proporción entre 5 y 10% de células activas en muestras oceánicas. No obstante lo anterior, en los experimentos de laboratorio realizados exclusivamente con bacterias marinas se presentaron patrones de actividad posibles que corresponden a células creciendo sin limitación en cultivos en lote.

Los bajos niveles de producción bacteriana obtenidos normalmente se asocian a condiciones oligotróficas sin embargo, los altos valores registrados para los controles indican fallas metodológicas que no permiten evaluar la exactitud del método. En cuanto a la determinación de la respiración bacteriana mediante la actividad del

sistema de transporte de electrones, las fallas metodológicas se asocian al pequeño volumen de muestra filtrado, posiblemente a la baja actividad metabólica encontrada y a los altos valores de los controles utilizados. Debido a esto es conveniente realizar más pruebas aumentando la cantidad de controles a uno por muestra en vez de uno por perfil y/o aumentar el volumen de muestra filtrado con el fin de aumentar la sensibilidad del método. Si bien, es posible utilizar las técnicas para determinación de respiración y producción bacterianas en campo aun se requiere hacer pruebas para mejorar tanto la sensibilidad como la exactitud de las mismas.

REFERENCIAS

- Ammerman, J. W., Fuhrman, J. A., Hagstrom, A. y Azam, F. (1984). Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Marine Ecology Progress Series*, 18, 31-39.
- Arístegui, J., y Montero, M. F. (1995). The relationship between community respiration and ETS activity in the ocean. *Journal of plankton research*, 17(7), 1563-1571.
- Arrieta, J. M., Mayol, E., Hansman, R. L., Herndl, G. J., Dittmar, T. y Duarte, C. M. (2015). Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science*, 348, 331-333.
- Bartosch, S., Mansch, R., Knötzsch, K., y Bock, E. (2003). CTC staining and counting of actively respiring bacteria in natural stone using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 75-84.
- Benner, R. y Amon, R. M.W. (2015). The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Annual Review of Marine Science*, 7, 185-205.
- Berggren, M., Lapierre, J. F., y del Giorgio, P. A. (2012). Magnitude and regulation of bacterioplankton respiratory quotient across freshwater environmental gradients. *The ISME journal*, 6(5), 984-993.

- Bhupathiraju, V. K., Hernandez, M., Landfear, D., & Alvarez-Cohen, L. (1999). Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 37(3), 231-243.
- Biddanda, B. A. (1988). Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. II. Microbial metabolism. *Marine Ecology Progress Series*, 42,89-95.
- Carlson, C. A., Ducklow, H. W. y Michaels, A. F. (1994). Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the north- western Sargasso Sea. *Nature*, 371, 405-408.
- Carlson, C. A., Hansell, D. A., Nelson, N. B., Siegel, D. A., Smethie, W. M., Khatiwala, S., Meyers, M. M. y Halewood, E. (2010). Dissolved organic carbon export and subsequent remineralization in the mesopelagic and bathypelagic realms of the North Atlantic basin. *Deep Sea Research Part II: Tropical studies in oceanography*, 57(16), 1433-1445.
- Cook, K. L., y Garland, J. L. (1997). The relationship between electron transport activity as measured by CTC reduction and CO₂ production in mixed microbial communities. *Microbial Ecology*, 34(3), 237-247.
- Créach, V., Baudoux, A. -C., Bertru, G., y Le Rouzic, B. (2003). Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 19-28.
- del Giorgio, P. A., y Scarborough, G. (1995). Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implications for estimates of bacterial growth and production rates. *Journal of Plankton Research*, 17(10), 1905-1924.
- del Giorgio, P. A., Prairie, Y. T. y Bird, D.F. (1997). Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes enumerated using CTC reduction and flow cytometry. *Microbial Ecology*, 34,141-154.

- del Giorgio, P. A. y Cole, J. J. (2000) Bacterial energetics and growth efficiency. En Kirchman D. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans* (289-325), Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, Ralph Mitchell, Series Editor.
- del Giorgio, P. A. y Davis, J. (2003) Patterns in Dissolved Organic Matter Lability and Consumption across Aquatic Ecosystems. En Findlay, S. y Sinsabaugh, R. L. (eds.) *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* (399-424). Academic Press.
- del Giorgio, P. A y Gasol, J. M (2008). Physiological Structure and Single-Cell Activity in Marine Bacterioplankton. En Kirchman, D. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition* (243-298). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, Ralph Mitchell, Series Editor.
- Ducklow, H. (2000). Bacterial production and biomass in the oceans. En Kirchman D. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans* (85-120), Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, Ralph Mitchell, Series Editor.
- Durazo, R. y Baumgartner, T. R. (2002). Evolution of oceanographic conditions off Baja California: 1997-1999. *Progress in Oceanography*, 54, 7-31.
- Espinosa-Carreón, T. L., Gaxiola-Castro, G., Robles-Pacheco, J. M. y Nájera-Martínez, S. (2001). Temperatura, salinidad, nutrientes y clorofila *a* en aguas costeras de la Ensenada del Sur de California. *Ciencias Marinas*, 27(3), 397-422.
- Field, C.B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. y Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281, 237-240.
- Fuhrman, J. A. y Azam, F. (1982). Thymidine Incorporation as a Measure of Heterotrophic Bacterioplankton Production in Marine Surface Waters: Evaluation and Field Results. *Marine Biology*, 66, 109-120.
- Gasol, J. M., Del Giorgio, P. A., Massana, R., y Duarte, C. M. (1995). Active versus inactive bacteria: size-dependence in a coastal marine plankton community. *Marine Ecology Progress Series*. 128(1), 91-97.

- Gasol, J. M. y Arístegui, J. (2007). Cytometric evidence reconciling the toxicity and usefulness of CTC as a marker of bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 46, 71-83.
- Hansell, D. A. (2013). Recalcitrant dissolved organic carbon fractions. *Annual Review of Marine Science*, 5, 421-445.
- Hall, N. S., Whipple, A., C. y Paerl, H. W. (2015). Vertical spatio-temporal patterns of phytoplankton due to migration behaviors in two shallow, microtidal estuaries: Influence on phytoplankton function and structure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1-15.
- Hatzinger, P. B., Palmer, P., Smith, R. L., Peñarrieta, C. T., y Yoshinari, T. (2003). Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 47-58.
- IOC (1994). Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements. *Manuals and Guides*, 29, 104-118.
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F. y Azam, F. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 593-599.
- Kaprelyants, A. S., y Kell, D. B. (1993). The use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualization of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. *Journal of Microbiol. Methods*, 17, 115-122.
- Karner, M. y Fuhrman, J. A. (1997). Determination of Active Marine Bacterioplankton: a Comparison of Universal 16S Probes, Autoradiography, and Nucleoid Staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1208-1213.
- Kirchman, D. (2001). Measuring Bacterial Biomass Production and Growth Rates from Leucine Incorporation in Natural Aquatic Environments. En Paul, J. H. (ed.) *Methods in Microbiology* (227-237). Elsevier Academic Press, San Diego, California.

- Lechtenfeld, O. J., Kattner, G., Flerus, R., McCallister, S. L., Schmitt-Kopplin, P., y Koch, B. P. (2014). Molecular transformation and degradation of refractory dissolved organic matter in the Atlantic and Southern Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 126, 321-337.
- Linacre, L., Landry M. R., Cajal-Medrano, R. Lara-Lara, J. R., Hernández-Ayón, J. M., Mouriño-Pérez, R. R, García-Mendoza, E. y Bazán-Guzmán, C. (2012). Temporal dynamics of carbon flow through the microbial plankton community in a coastal upwelling system off northern Baja California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 461, 31-46.
- Lynn, R. J., y Simpson, J. J. (1987). The California Current System: The seasonal variability of its physical characteristics. *Journal of Geophysical Research*, 92(12), 947-966.
- Macías-Carballo, M. (2010). *Variabilidad espacial de la forma espectral del fitoplancton y su relación taxonómica en abril 2008 en la zona occidental de Baja California*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, BC.
- Martínez-García, S., Fernández, E., Aranguren-Gassis, M. y Teira, E. (2009). In vivo electron transport system activity: a method to estimate respiration in natural marine microbial planktonic communities. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 459-469.
- Maske, H., Cajal-Medrano, R. y Jiménez-Mercado, A. (2007). Microbios heterótrofos en el ciclo del carbono oceánico en el Pacífico Mexicano. En Hernández-de-la-Torre, B. y Gaxiola-Castro, G. (eds.) *El carbono en Ecosistemas Acuáticos de México* (101-116). Instituto Nacional de Ecología/CICESE, México, D.F.
- Nielsen, J. L., Aquino de Muro, M. y Nielsen, P. H. (2003). Evaluation of the Redox Dye 5-Cyano-2, 3-Tolyl-Tetrazolium Chloride for Activity Studies by Simultaneous Use of Microautoradiography and Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 641-643.

- Packard, T. T. y Williams, P. J. le B. (1981). Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the northwest Atlantic. *Oceanologica Acta*, 4(3), 351-358.
- Packard, T. T: (1985). Measurement of electron transport activity of marine microplankton. En Williams, P. J. le B. y Jannasch, H. W. (eds) *Advances in Aquatic Microbiology* (207-261). Academic Press, Nueva York.
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K., y Ridgway, H. F. (1992). Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1801-1808.
- Romero-Kutzner V., Packard T.T., Berdalet E., Roy S.O., Gagné, Gómez M. Respiration quotient variability: bacterial evidence. *Marine Ecology Progress Series*, 519, 47-59.
- Segovia-Zavala, J. A., Delgadillo-Hinojosa, F., Huerta-Díaz, M. A., Muñoz-Barbosa, A., Galindo-Bect, M. S., Hernández-Ayón, J. M. y Torres-Delgado, E. V. (2013). Concentración de hierro disuelto en la zona del mínimo de oxígeno frete al umbral de San Esteban, golfo de California. *Ciencias Marinas*, 39(2): 231-237.
- Servais, P., Agogué, H., Courties, C., Joux, F., y Lebaron, P. (2001). Are the actively respiring cells (CTC+) those responsible for bacterial production in aquatic environments? *FEMS Microbial Ecology*, 35(2), 171-179.
- Serrano, D. (2012). La zona del mínimo de oxígeno en el Pacífico mexicano. En Zamorano, P., Hendrickx, M. E. y Caso, M. (eds.). *Biodiversidad y comunidades del talud continental del Pacífico mexicano* (106-119). SEMARNAT/Instituto Nacional de Ecología, México, D.F.
- Sherr, B. F., del Giorgio, P., y Sherr, E. (1999). Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology*, 18, 117-131.
- Smith, J. J. y McFeters, G. A. (1997). Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl

tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*, 29, 161-175.

Smith, E. M. (1998). Coherence of microbial respiration rate and cell specific bacterial activity in coastal planktonic community. *Aquatic Microbial Ecology*, 16, 27-35.

Simon, M. y Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51, 201-213.

Table of Fluorochromes:

<http://www.biotech.iastate.edu/facilities/flow/Fluorochromes.pdf>

Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H., Jeskulke, K., y Mehrens, M. (1996). Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2, 3-ditolylyl tetrazolium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4587-4593.

Ullrich, S., Karrasch, B. y Hoppe, H. -G. (1999). Is the CTC dye technique an adequate approach for estimating active bacterial cells? *Aquatic Microbial Ecology*, 17, 207-209.

Villegas-Mendoza, J., Cajal-Medrano, R. y Maske, H. (2015). INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-(Phenyl) Tetrazolium Chloride) Is Toxic to Prokaryote Cells Precluding Its Use with Whole Cells as a Proxy for In Vivo Respiration. *Microbial Ecology*, 1-8.

Villegas-Mendoza, J. (2015). *Producción de vitamina B₁₂ por procariotas marinos en condiciones de limitación de sustrato en cultivos continuos*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, BC.

Water Environment Federation (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.

Williams, P.J. le B. (2000). Heterotrophic bacteria and the dynamics of Dissolved Organic Matter. En Kirchman, D. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans* (153-200). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, Ralph Mitchell, Series Editor.

- Williams, P. J. y del Giorgio, P. A. (2005). Respiration in aquatic ecosystems: history and background. En del Giorgio, P. A. y Williams, P. J. (eds.) *Respiration in Aquatic Ecosystems* (1-17). Oxford University Press, Oxford.
- Yager, P. L., Connelly, T. L., Mortazavi, B., Wommack, K. E., Bano, N., Bauer, J. E., Opsahl, S. y Hollibaugh, J. T. (2001). Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures. *Limnology and Oceanography*, 46(4), 790-801.