

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



“Efecto de la temperatura en la eficiencia de crecimiento y respiración en bacterias marinas heterotróficas”

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera

Presenta:

Alejandrina Jiménez Mercado

Ensenada, B. C., Enero de 2004.

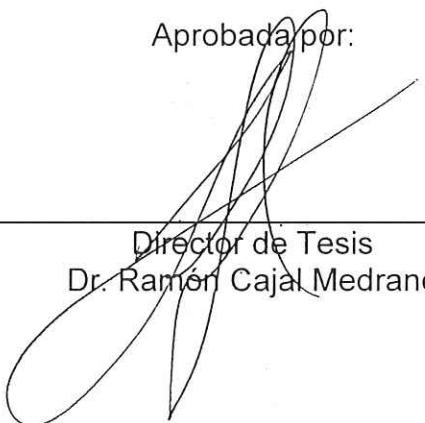
**“Efecto de la temperatura en la eficiencia del
crecimiento y respiración en bacterias marinas
heterotróficas”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA**

ALEJANDRINA JIMENEZ MERCADO

Aprobada por:



Director de Tesis
Dr. Ramón Caja Medrano



Sinodal
Dr. Helmut Maske Rubach



Sinodal
Dra. Roxana Rico Mora

R E S U M E N

Con la finalidad de estudiar el efecto de la temperatura en la eficiencia de crecimiento y la respiración bacteriana se realizaron experimentos con inóculos de poblaciones naturales de bacterias heterotróficas marinas, en un sistema de cultivo continuo del tipo turbidostato con 100 μM de glucosa, 182 μM de amonio, 43 μM de fosfato y 2 μM de hierro a diferente temperatura (10, 14, 18, 22 y 26 °C). Durante el estado estacionario se obtuvieron muestras de CO_2 total, O_2 disuelto, POC, PON, abundancia celular, células viables y abundancia viral tanto en el cultivo como en el medio de cultivo. En general la producción de CO_2 total y el consumo de oxígeno se incrementan con la temperatura, asimismo la tasa de crecimiento específico (28.16 a 62.5 d^{-1}) y la respiración por célula (10 a 350 $\text{fg CO}_2/\text{célula}$). La razón C/N presentó una relación inversa con la tasa de crecimiento específico, con la temperatura y con la eficiencia de crecimiento. La eficiencia de crecimiento observada varió entre 0.12 y 0.70 y se ubica dentro de un intervalo alto de los valores reportados en la literatura. Los valores altos de la eficiencia de crecimiento ocurrieron a las temperaturas y tasas de crecimiento específico más altas. En las condiciones de turbidostato (sin limitación de nutrientes) la tasa de crecimiento específico y la eficiencia de crecimiento se incrementan con la temperatura pero la tasa específica de respiración disminuye y por lo tanto los valores más altos de la eficiencia de crecimiento ocurren a las temperaturas mayores (22 y 26 °C). El efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento específico en nuestros datos y los de la literatura es el mismo. Sin embargo la relación positiva entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura en nuestros datos contrasta con algunos datos de campo reportados en los que se observa lo contrario. Esta discrepancia puede ser explicada por diferencias metodológicas ya que en otros juegos de datos de la literatura la relación negativa entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura no es consistente.

DEDICATORIA

A Jimena:

Al ser que le dio luz y sentido a mi vida, que me impulso a seguir y que juntas nos hemos fijamos metas para concluir las, porque estamos en la búsqueda continua de nuevos horizontes, compartiendo la palabra desafío, desde que ambas dejamos playas lejanas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Cajal Medrano, por su confianza, disposición y paciencia durante mi formación y capacitación académica y por considerarme ante todo una colega, mil gracias.

A mis sinodales, Dr. Helmut Maske Rubach, por sus sugerencias, paciencia y disposición y por todo su apoyo; Dra. Roxana Rico, por sus sugerencias y comentarios.

A los académicos de la Facultad de Ciencias Marinas, por su apoyo y en particular al Dr. Eduardo Santamaria del Angel por su tiempo.

A las Instituciones involucradas en mi formación academica:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) por su apoyo económico en mi periodo de becaria.
- Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas y el Instituto de Investigaciones Oceanologicas, por su apoyo educativo y formativo. Al proyecto #0267 de V Convocatoria de Investigación, UABC.
- Centro de Investigaciones Cientificas y Educacion Superior de Ensenada, por su apoyo en el uso del laboratorio de "Ecologia de Plancton Marino". Al proyecto #622247 por su apoyo económico.

A todas las grandes mujeres de Ensenada:

Dora Wauman R., Cathy Harris, Mayra Gonzalez, Dolores Martinez, Victoria Orozco, Lourdes Simental.

A todas las compañeras y amigas de la generación de maestría 2001-2003.

Y en especial a todos aquellos que ante la coincidencia del tiempo y el espacio, tuvimos un hilo de vida que compartir. Todos y cada uno se reconocerán.

A la familia, por que aún nos esperan.

INDICE

1.INTRODUCCION	1
1.2.- Antecedentes	6
1.3 Hipótesis y objetivos.....	11
2. METODOLOGÍA:	12
2.1 Diseño experimental.....	16
2.2 Cultivos en turbidostato.....	16
2.3 Variables a determinar en la fase estacionaria.....	17
2.3.1 Determinación CO ₂ total por titulación diferencial.....	18
2.3.2 Determinación de oxígeno disuelto por espectrofotometría.....	18
2.3.3 Uso de viales de centelleo.	19
2.3.4 Células viables.....	20
2.3.5 Virus	21
2.3.6 Carbón y nitrógeno orgánico particulado (POC, PON).	21
2.3.7. Procesamiento de datos	22
3. RESULTADOS.....	24
3.1 Desarrollo de turbidostatos.....	24
3.2 Tasa de crecimiento específico en el modo estático y en turbidostato.....	25
3.3 Células viables.....	28
3.4 Partículas virales	29
3.5 Efecto de la temperatura en las variables determinadas.....	31
3.5.1 Producción CO ₂ , consumo de O ₂ y cociente respiratorio.....	31
3.5.2 Tasa de crecimiento específico y la relación de Arrhenius.....	33
3.5.3. Comportamiento de la eficiencia de crecimiento.	34
3.5.4 Razón carbón: nitrógeno C/N.	36
3.5.5 Producción de carbón orgánico particulado.....	38
3.5.6 Biomasa bacteriana.....	39
3.5.7 Respiración bacteriana.	40
4. DISCUSIONES.....	42
4.1 Efecto de la temperatura en los ensayos en turbidostato.....	43
4.1.2 Células viables.....	43
4.1.3 Fagos.....	46
4.2.1 Consumo de O ₂ , producción de CO ₂	49
4.2.2 Tasa de crecimiento y Eficiencia de crecimiento.....	50
4.3 La razón celular C/N	53
4.4 Respiración específica y por célula.	54
4.5 Biomasa bacteriana.....	55
5. CONCLUSIONES.....	58
6. LITERATURA CITADA.....	59
7. ANEXOS.....	67
7.1 Tablas de datos de resultados.....	67
7.2 Análisis de la relación de la eficiencia de crecimiento y la temperatura reportada en literatura.....	77
7.2.1 Recopilación de datos.....	77
7.2.2 Procesamiento de datos.....	78
7.2.3 Resultado del análisis de datos.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figuras

1.- Descripción del sistema de cultivo.....	15
2.- Series de experimentos en turbidostato.....	25
3.- Comparación de las tasas específicas de crecimiento de los cultivos en los modos estático y turbidostato.....	27
4.- Células viables en los cultivos en turbidostato en la fase estacionaria.....	29
5.- Presencia de virus en los cultivos en turbidostato.....	30
6.- Mediciones de la respiración bacteriana en la fase estacionaria a diferentes temperaturas.....	32
7.- Tasa de crecimiento específico de los cultivos en turbidostato a diferentes temperaturas.....	33
8.- Tasa de crecimiento específico en función de la temperatura.....	35
9.- Eficiencia de crecimiento bacteriano.....	36
10.- Razón celular C/N en cultivos en la fase estacionaria en función de diferentes parámetros.....	38
11.- Biomasa producida en los cultivos en turbidostato.....	40
12.- Respiración bacteriana en cultivos en turbidostato.....	42

Anexos

13.- Resultado del análisis de datos eficiencia de crecimiento y temperatura de la literatura.....	83
--	----

INDICE DE TABLAS

1.- Detalle de las fechas de experimentación para los cultivos.....	16
2.- Características generales de los experimentos en turbidostato.....	28
3.- Determinación de la biomasa bacteriana.....	39
4.- Determinación de la respiración específica bacteriana.....	41

Anexos

1.- Experimentos en turbidostato.....	68
2.- CO ₂ y alcalinidad producida en cultivos en fase estacionaria.....	70
3.- O ₂ consumido en fase estacionaria.....	72
4.- Células viables y virus en cultivos en fase estacionaria.....	73
5.- Carbón orgánico particulado en fase estacionaria.....	74
6.- Eficiencia de crecimiento y respiración específica.....	75
7.- Respiración bacteriana.....	75
8.- Biomasa bacteriana en fase estacionaria.....	76
9.- comparación de datos de literatura de valores de contenido de carbón celular	77
10.- Comparación de métodos utilizados para calcular la eficiencia de crecimiento.....	82
11.- Intervalo de valores de eficiencia de crecimiento reportado en literatura.....	83

1. INTRODUCCION .

En las pasadas décadas, se ha confirmado la hipótesis de que el bacterioplancton marino tiene un papel importante en el reciclamiento de carbón y nitrógeno, siendo uno de los principales componentes en la dinámica del ecosistema total (Williams, 1981a; Azam *et al.*, 1983; Cole, 1988; Cho y Azam, 1988; Fuhrman *et al.*, 1989; Ducklow y Carlson, 1992). Se tiene reportado que la biomasa bacteriana generalmente excede a la del fitoplancton en océanos oligotróficos (Fuhrman *et al.*, 1989; Carlson *et al.*, 1996; Kirchman y Rich, 1997) y su contribución al metabolismo global es también muy grande (del Giorgio *et al.*, 1997). El conocimiento sobre el papel de las bacterias heterotróficas marinas en el uso de nutrientes orgánicos e inorgánicos, permite modelar más adecuadamente ciclos energéticos y flujos biogeoquímicos en el medio marino (Biddanda *et al.*, 1994; Fakuda *et al.*, 1998).

La concepción tradicional en ecología microbiana marina indicaba que el bacterioplancton únicamente obtiene sustrato para su crecimiento de heces de los herbívoros pelágicos y que las bacterias lo trasladan al bentos en forma de detritus (Steele, 1974). La nueva concepción del papel de las bacterias heterotróficas sugiere que las bacterias transfieren a otros niveles tróficos el nitrógeno inorgánico y orgánico liberado durante la descomposición de materia orgánica y el decaimiento del fitoplancton, ubicando a las bacterias heterotróficas en otro nivel de la cadena trófica. Este concepto se conoce como circuito microbiano, donde el papel de las bacterias es la transferencia de su biomasa bacteriana a los microdepredadores (Azam *et al.* 1983; Azam, 1998).

Este nuevo concepto ha surgido recientemente con los nuevos avances para cuantificar la biomasa y la actividad de las bacterias heterotróficas en el océano, confirmando que la actividad metabólica bacteriana es altamente

significativa y se ha cambiado el concepto sobre el papel de las bacterias en la transformación y flujos de carbón y nitrógeno en los ambientes marinos, pasando de ser simplemente mineralizadoras de partículas de detritus a recicladoras y competidoras por nutrientes orgánicos e inorgánicos junto con el fitoplancton (Zehr y Ward, 2002).

El bacterioplancton tiene la capacidad de tomar carbón disuelto del medio e incorporarlo en carbón orgánico particulado, formando de esta manera una reserva disponible para niveles tróficos superiores (Ducklow y Carlson, 1992; Revilla *et al.*, 2000).

En el océano el flujo de materia orgánica a través de las bacterias es una amplia vía donde en promedio una mitad de la producción primaria oceánica es conducida por las bacterias por el circuito microbiano. Todo este circuito microbiano involucra distintos procesos, como por ejemplo: lisis celular (Middelboe *et al.*, 1996; Agustí *et al.* 1998), consumo de células bacterianas (Nagata, 2000), transferencia de sustrato (Kirchman, 1990; Blight *et al.*, 1995). Sin embargo el efecto principal del consumo del carbón orgánico por el bacterioplancton es la producción de biomasa y CO_2 . La producción de cualquiera de estas 2 variables tiene una profunda influencia en el ciclo del carbón.

La asimilación de carbón orgánico disuelto es utilizada para satisfacer los requerimientos metabólicos de los microorganismos. El metabolismo está representado por la suma de 2 procesos fundamentales y complementarios: crecimiento y respiración. Ambos procesos son importantes para modelar el flujo de carbón a través del bacterioplancton. La evaluación reciente de estos procesos ha revelado su efecto en el ciclo global del carbón (Biddanda *et al.*, 1994). Se sabe que el consumo de carbón orgánico disuelto por bacterias marinas tiene dos destinos: la producción de biomasa y la mineralización de

carbón y nitrógeno orgánicos, el consumo total del sustrato es igual a la suma de la producción de la biomasa bacteriana (**B**) y la respiración (**R**).

$$Y = \frac{dB}{dB + dR} \quad (1)$$

De esta relación se observa que la variación de la respiración define la magnitud de la eficiencia de crecimiento bacteriano (**Y**).

La contribución de la respiración de la comunidad bacteriana a la respiración global del plancton en la columna de agua es del 40-70% (Williams, 1981) y según otros autores, puede exceder la productividad primaria en algunas regiones oceánicas (Del Giorgio y Cole, 2000). La eficiencia de crecimiento es entonces la clave para contestar las preguntas sobre el papel de las bacterias marinas en el ciclo del carbón en el océano.

El crecimiento bacteriano en el medio oceánico puede estar limitado por: la calidad de la materia orgánica disuelta (Kirchman, 1990; Carlson y Ducklow, 1996), nutrientes inorgánicos (Rivkin y Anderson, 1997; Thingstad *et al.*, 1997), temperatura (Barillier y Garnier, 1993; Danieri *et al.*, 1994; Shiah y Ducklow, 1994; Felip *et al.*, 1996; Kirchman y Rich, 1997; Pomeroy y Wiebe, 2001; Rivkin y Legendre, 2001), infecciones virales (Proctor y Fuhrman 1990; Middelboe *et al.*, 1996), micronutrientes (Church *et al.* 2000). Cada uno de estos factores puede limitar el crecimiento bacteriano de diferentes formas en escala espacio-temporal (Ducklow y Carlson, 1992).

Diversos trabajos han evaluado cómo la calidad de material orgánico afecta el crecimiento bacteriano en sistemas marinos y que la tasa de crecimiento y la eficiencia de crecimiento bacterianos dependen de la razón estequiométrica C/N, con relación al tipo de sustrato orgánico utilizado

(Kirchman, 1990; Williams, 1995; Ducklow y Carlson, 1996). El aporte y calidad de nutrientes inorgánicos puede influir en el crecimiento bacteriano, ya que las bacterias son efectivas competidoras con el fitoplancton por amonio, fosfatos y nitratos (Rivkin *et al.*, 1997; Zweifel, 1999; Zehr y Ward, 2002). La limitación de hierro afecta directamente al fitoplancton, con lo cual se restringe el flujo de carbón a las bacterias heterotróficas (Hurchins *et al.*, 1998; Church *et al.*, 2000).

Dentro de los factores reguladores del crecimiento y la fisiología de las bacterias marinas, el factor temperatura en particular ha sido estudiado por ser una variable que determina potencialmente el crecimiento bacteriano (Pomeroy y Wiebe, 2001).

El crecimiento bacteriano es una consecuencia de una serie de reacciones químicas estructuradas y complejas. El efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento refleja el efecto de la velocidad de las reacciones químicas celulares. La temperatura es una limítrofe potencial de crecimiento, por su participación en todos los procesos químicos y bioquímicos. Cada grupo de bacterias tiene una temperatura de crecimiento característica; mínima, máxima y óptima, llamadas temperaturas cardinales (Ingraham *et al.*, 1983). En el intervalo normal de temperatura se puede aplicar la cinética química normal y se obtiene una línea recta. Por arriba y por debajo de este intervalo de temperatura, la tasa de crecimiento es menor de lo que se deduce de la extrapolación de la relación de Arrhenius.

La ecuación de Arrhenius (Ingraham *et al.*, 1983) describe la relación entre la velocidad de la reacción química y la temperatura absoluta. Predice una relación lineal directa entre el logaritmo de la velocidad y el recíproco de la temperatura absoluta en la cual se sostiene las reacciones químicas simples.

$$\mu = A e^{E/RT} \quad (2)$$

Donde, A: constante de reacción; μ : tasa de crecimiento específico; R: constante universal de los gases, E: energía de activación y T: temperatura absoluta.

Al utilizar la tasa de crecimiento específico como una función de la temperatura, las formas de las gráficas son similares para casi todas las bacterias. En cierto intervalo de temperatura, comúnmente llamado el intervalo normal, el $\text{Log } \mu$ (tasa de crecimiento específico) es lineal cuando se grafica contra $1/T$. A temperaturas altas y bajas, la tasa de crecimiento decrece progresivamente. (Ingraham *et al.*, 1983). Las temperaturas de crecimiento cardinal varían ampliamente entre bacterias, pero la forma general de la gráfica de Arrhenius es típica para todas las bacterias estudiadas.

En el medio marino también existen evidencia de que la forma de la curva de Arrhenius es reproducible (Pomeroy y Wiebe, 2001). El efecto que tiene la temperatura en la tasa de crecimiento específico del bacterioplancton marino se traduce en una relación positiva entre la tasa de crecimiento y la temperatura. Existe evidencia de la interacción entre temperatura y la utilización del sustrato orgánico por las bacterias heterotróficas, de acuerdo a los datos de campo de Pomeroy y Wiebe (2001), donde se ha observado en el medio marino que generalmente las bacterias heterotróficas de ambientes tropicales funcionan cerca de la temperatura óptima de asimilación y crecimiento y también en ambientes templados por lo menos durante el verano. Sin embargo, para ambientes templados durante invierno operan cerca de la temperatura de crecimiento nulo con excepción de episodios con alta disponibilidad de sustrato (Pomeroy y Wiebe, 2001).

Felip y colaboradores (1996) sugirieron que la relación general entre el crecimiento bacteriano y la temperatura está dada por cambios en la concentración del sustrato hasta el punto en que la razón de crecimiento se estabiliza y no se incrementa más con la temperatura. Wiebe y colaboradores

(1993) demostraron que las bacterias requieren altas concentraciones de sustrato para activar el crecimiento a temperaturas mínimas. Por lo tanto es difícil separar el efecto del sustrato de la temperatura con datos de campo.

Los virus son conocidos como el componente numérico más abundante del plancton marino, con concentraciones del orden de 10^{10} virus por litro de agua de mar, excediendo en algunos casos la abundancia las bacterias (Noble y Fuhrman, 1998; Fuhrman, 1999). En investigaciones recientes se ha identificado el importante papel de los virus en la mortalidad del bacterioplancton heterotrófico, cianobacterias y fitoplancton (Proctor y Fuhrman, 1992; Suttle y Chen, 1992; Fuhrman y Noble, 1995) y se estima que la lisis viral del bacterioplancton no solamente remueve bacterias y controla la población bacteriana, sino que también provoca una pérdida de materia orgánica regenerando nutrientes a partir de las células lisadas. En las bacterias marinas una fracción significativa de su mortalidad (10-40%), es por infección viral (Fuhrman y Noble, 1995; Steward *et al.*, 1996). Otro papel importante de la lisis viral es en los ciclos biogeoquímicos y control de la diversidad de especies, al secuestrar material orgánico disuelto en el proceso de lisis bacteriana (Middelboe *et al.*, 1996; Fuhrman, 1999; Wilhelm y Suttle, 1999). La lisis viral del bacterioplancton puede controlar la comunidad bacteriana y la biomasa y cambiar la regeneración de nutrientes, provocando una reducción de la eficiencia de crecimiento bacteriana. Esto fue probado en los experimentos de Middelboe y colaboradores (1996), en donde la reducción de la biomasa bacteriana afectada por lisis viral redujo los valores de eficiencia de crecimiento en un 15-26%.

1.2 ANTECEDENTES

La eficiencia de crecimiento del bacterioplancton marino ha sido estudiada desde hace más de tres décadas (Williams, 1995; Iturriaga y Hoppe, 1977; Bjørnsen, 1986; Griffith *et al.*, 1990; Biddanda *et al.*, 1994). Como resultado

de estos estudios se ha observado una gran variabilidad en los valores obtenidos para la eficiencia de crecimiento (0.03 a 0.85). Dentro de esta variabilidad, los valores que han sido reportados con mayor frecuencia están comprendidos entre 0.30 y 0.60 (Cole y Pace, 1988). En general esta variabilidad se debe al cambio en el metabolismo como resultado del efecto de diferentes condiciones ambientales (nutrientes y temperatura), entre otros. Recientemente, Del Giorgio y Cole (2000) han sugerido que el valor de la eficiencia de crecimiento es menor a lo estimado anteriormente y sugieren valores de 0.16 y 0.30 para regiones oceánicas y costeras, respectivamente.

El uso de distintos valores de la eficiencia de crecimiento bacteriano en modelos de flujo de carbón en la región pelágica ha causado una confusión en la interpretación del papel de las bacterias. Si se considera que la eficiencia de crecimiento es baja y se compara con los valores de producción bacteriana observados, la demanda de sustrato en forma de carbón es sobrestimada. Por el contrario, si el valor usado es alto la demanda de carbón se satisface y las bacterias se convierten en un productor de biomasa importante. El problema inherente en la variabilidad es encontrar el valor de Y que debe ser aplicado en modelos y cálculos ecológicos y geoquímicos.

Desde el punto de vista fisiológico, se ha sugerido recientemente que la eficiencia de crecimiento es función de la tasa específica de crecimiento (Cajal-Medrano y Maske, 1999) o que guarda una relación lineal con la tasa de crecimiento bacteriano (Del Giorgio y Cole, 1999). Sin embargo, se desconoce aun el resultado de aplicar principios fisiológicos en los modelos de balance de masa. Eiler y colaboradores (2003) encontraron una covariación de la eficiencia de crecimiento y la tasa de crecimiento bacteriano cuando la misma fuente de carbón es adicionada a cultivos estáticos, siendo la eficiencia de crecimiento típicamente más baja en cultivos con tasas de crecimiento menores.

En el medio marino se ha observado que, en general las bacterias heterotróficas de ambientes tropicales funcionan cerca de la temperatura óptima de asimilación y crecimiento. En ambientes templados durante verano operan cerca de la temperatura óptima y cerca de la temperatura de no-crecimiento en invierno, con excepción en situaciones donde existe un alto contenido de sustrato, sin embargo en ambientes polares las bacterias operan lejos del óptimo de temperatura para crecimiento (Pomeroy y Wiebe, 2001).

Los trabajos sobre temperatura y limitación de carbón en el crecimiento del bacterioplancton marino han sido contradictorios y no están bien sustentados por los datos presentados. Por una parte se han encontrado correlaciones negativas entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura (Bjørnsen, 1986; Danneri *et al.*, 1994; Rivkin y Legendre, 2001), mientras que otros autores no encuentran relación alguna (Barillier y Garnier, 1993).

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano también ha sido estudiado y algunos investigadores han reportado que más del 50% de la variabilidad del crecimiento bacteriano puede ser explicada por la temperatura, por ser ésta un factor limitante potencial que afecta tanto al catabolismo como al anabolismo en las bacterias (Pomeroy y Wiebe, 2001) y en consecuencia a la eficiencia de crecimiento.

Valencia y colaboradores (2003) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y la producción bacteriana estimada como la incorporación de leucina. Aun cuando consideran a la temperatura como un factor que influye en la producción bacteriana, en su trabajo este parámetro solo explica el 9% de la variación de producción bacteriana.

No obstante la gran variabilidad reportada para la eficiencia de crecimiento en el océano, Rivkin y Legendre (2001), con base en datos de campo, encuentran una relación empírica inversa entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura. Partiendo de esta observación proponen que es posible calcular la respiración mediante sensores remotos si se conocen la temperatura y la producción bacteriana. Este resultado es por sí solo sumamente interesante, sin embargo es necesario explicar la relación negativa entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura, puesto que los principios de cinética bioquímica y alometría predicen lo contrario (Gillooly *et al.*, 2001) y se desconoce la proporción relativa en que son afectados el catabolismo y anabolismo con los cambios de temperatura.

La temperatura de crecimiento puede afectar el estado fisiológico de las bacterias y en respuesta a la variación de la temperatura, éstas alteran la síntesis de proteínas, membranas y una variedad de otras estructuras celulares como resultado de adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Bayles *et al.*, 2000). Es claro por lo tanto, que los cambios en la tasa de crecimiento debidos a los ajustes metabólicos como respuesta a la temperatura deben de reflejarse en la eficiencia de crecimiento. La interpretación del efecto de la temperatura en la eficiencia de crecimiento es compleja. Algunos trabajos cuestionan el hecho que la relación sustrato-temperatura pueda ser definida de una manera simple y es probable que la interacción con el sustrato pudiera enmascarar la verdadera relación entre la producción bacteriana, la tasa de crecimiento y la temperatura (Felip *et al.*, 1996; Pomeroy y Wiebe, 2001).

El estudio de la regulación de la eficiencia de crecimiento se facilita bajo condiciones controladas en cultivos en turbidostato permite separar el efecto de la temperatura del efecto del sustrato, además facilita la medición de las tasas de respiración, de crecimiento y el cálculo de la eficiencia de crecimiento a partir de CO₂, O₂, biomasa y POC. La evaluación de estas

variables en campo es muy difícil si no es que imposible. Fundamentalmente es difícil separar el efecto del sustrato del de la temperatura y también la separación del bacterioplancton de autótrofos y particularmente de otros heterótrofos, en la determinación de la respiración. Aunque las mediciones de laboratorio han sido empleadas para reducir los problemas que se presentan en el campo, éstas también introducen a la vez varios problemas importantes como el de confinamiento y adición de sustrato no usado. Por el momento ninguno de estas dos aproximaciones para estimar la eficiencia de crecimiento (estimaciones de campo y de laboratorio) están libres de problemas y es posible que la poca consistencia de los datos sobre la eficiencia de crecimiento en la literatura se deba a las diferentes metodologías que han sido empleadas para estimarla. En general no existe una metodología única o común usada por los investigadores. Por el contrario es común el uso de factores de conversión diferentes, así como condiciones experimentales y ambientales diferentes. Esta inconsistencia en la medición y cálculo de la eficiencia de crecimiento sugiere que en parte el origen de la variabilidad de la eficiencia de crecimiento es metodológica y no biológica, y es necesario utilizar la metodología que permita la interpretación de los resultados de la manera más clara posible.

1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Las poblaciones naturales de bacterioplancton marino en cultivo continuo sin limitación de sustrato (turbidostato) pueden usarse para generar información sobre la variación de la eficiencia de crecimiento en función de la temperatura.

OBJETIVOS

Encontrar una relación entre la eficiencia de crecimiento de bacterias marinas heterotróficas y la temperatura.

Separar el efecto del sustrato de la temperatura para estudiar el comportamiento de la eficiencia de crecimiento bacteriana.

2. METODOLOGÍA:

Los medios de cultivo se prepararon inicialmente utilizando agua de mar natural, la cual se colectó fuera de la Bahía de Ensenada, en botellas de polietileno de 20 L. El agua de mar se almacenó en la oscuridad en un contenedor de plástico de 250 L, para evitar el crecimiento de fitoplancton. Se removió la materia orgánica disuelta, por medio de filtraciones continuas con filtros GF/F. El agua se envejeció en garrafones de vidrio para darles un tratamiento con ozono por más de 24 horas. Posteriormente se almacenó y se guardó en la oscuridad, en recipientes de cristal y policarbonato que fueron lavados con un detergente libre de fosfatos para quitar el carbón orgánico adsorbido a las paredes de los recipientes, así como para eliminar bacterias y partículas. El volumen de agua requerido para cada cultivo se transfirió a una botella de policarbonato de 20L a través de filtros de policarbonato (0.2 μm). El pH del medio se ajustó entre 6.5 a 7.0 agregando CO_2 en burbujeo lento por aproximadamente un minuto antes de esterilizar. El agua de mar se esterilizó a 121°C (15 pka) por una hora y se dejó enfriar por más de 12 horas. El pH resultante varió entre 7.8 - 8.2. El medio de cultivo se preparó con esta agua agregando los nutrientes siguientes: Glucosa 100 μM , Amonio, 182 μM , Fosfato, 43 μM y hierro, 2 μM .

Los experimentos con las poblaciones naturales de bacterias marinas iniciaron con un inóculo natural de bacterias marinas obtenidas en diversas ocasiones de la Bahía de Todos Santos. Las fechas de colecta estuvieron comprendidas entre mayo (6, 12, 19,28), junio (2, 10, 16,28) y julio (4,12) del 2003. Las muestras se colectaron en botellas de policarbonato oscuras y estériles.

Para tener un cultivo de respuesta rápida a las condiciones del turbidostato se utilizaron cultivos estáticos en volúmenes de 225 ml en botellas de policarbonato. La preparación de los cultivos estáticos consistió en filtrar el

agua de mar a través de filtros de policarbonato de 0.8 μm y 0.4 μm , para eliminar ciliados y flagelados. Para el inóculo se transfirió una alícuota de 10 ml con una jeringa estéril a una botella de policarbonato de 225 ml, conteniendo agua de mar filtrada por 0.2 μm y estéril. La botella de cultivo estático se mantuvo en un baño de agua en oscuridad. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, con una jeringa estéril se transfirió 10 ml a una botella de cultivo de teflón de 1 L de capacidad. La transferencia del inóculo se hizo en condiciones estériles frente al mechero y luz ultravioleta. Los cultivos permanecieron en oscuridad, sin agitación y sin adición de sustrato.

2.1 Sistema de cultivo en turbidostato.

Consiste en un garrafón de policarbonato de 20 L de capacidad (1), el cual tiene un tapón de silicón con una trampa de agua (3) en un bulbo de vidrio relleno de fibra de vidrio (4) para filtrar el aire (eliminando la humedad y manteniendo estéril la entrada de aire al medio de cultivo. En el mismo tapón se colocó una manguera de teflón que permitió la salida de medio por succión (2). La esterilidad del medio se comprobó adicionando un testigo de medio líquido ZoBell en un matraz Erlenmeyer de 50 ml cerrado con un tapón de silicón (6). Para restablecer el nivel de oxígeno en el medio de cultivo después de la esterilización por autoclave del garrafón se hizo pasar aire, al medio, conectándose un cartucho con lana de vidrio y con un filtro de 0.2 μm de poro (9). Se burbujeo lentamente por 24 horas, en forma aséptica, adaptando a la salida de la bomba un cartucho conteniendo algodón y carbón activo (11). Este cartucho se ajustó a la línea de aireación del garrafón de policarbonato del medio de cultivo.

La cámara de cultivo consistió en una botella de teflón (1 L de capacidad) tapada con un tapón de silicón (23) que presento 4 orificios (a.- entrada del medio de cultivo, b.- salida del efluente, c.- salida para muestras, d.-

entrada de aire, exclusivamente durante un muestreo). Esta botella se mantuvo a una temperatura constante en un baño de agua (20), que por medio de un termocirculador (22). El cultivo se agitó continuamente con un agitador magnético recubierto con una cápsula de vidrio. El volumen de aire dentro del cultivo se disminuye al mínimo para facilitar un rápido equilibrio entre los gases, llenando la botella al máximo de su volumen.

El sistema permaneció totalmente cerrado durante cada experimento. La cámara de cultivo se resguardo en la oscuridad, cubriéndola con una caja de madera. El medio de cultivo fue bombeado al cultivo mediante una bomba (15) colocada al final del sistema, para evitar la contaminación del cultivo y el medio. El efluente se colectó en una botella de plástico (~ 4L capacidad) que tuvo formol, para mantener el líquido desalojado estéril (16). Los cultivos de bacterias marinas se realizaron a 5 temperaturas diferentes: 10, 14, 18, 22 y 26 °C, intervalo que cubre las temperaturas de agua de mar usualmente registrados en la Bahía de Todos Santos, B.C.

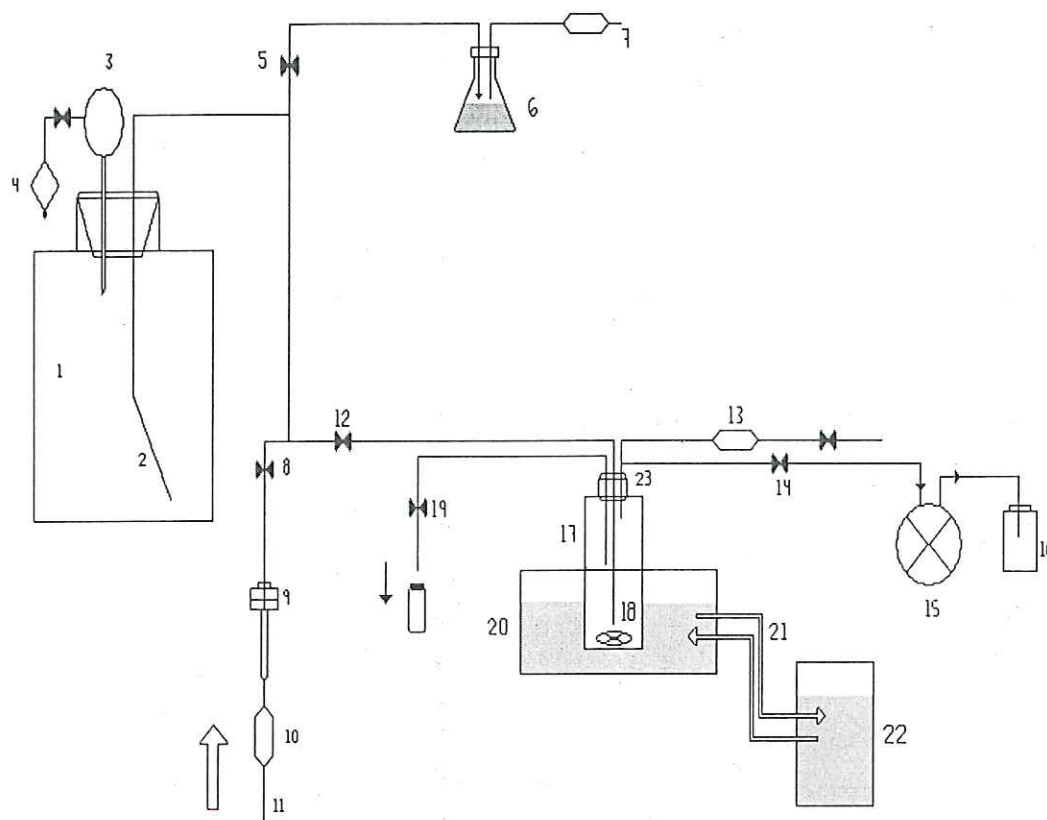


Figura 1.- Descripción del sistema de cultivo.

Descripción del sistema de cultivo

- | | |
|---|---|
| 1.- Medio de cultivo enriquecido estéril | 13.- Filtro para aire. |
| 2.- Tubo de teflón con terminal de cristal. | 14.- Salida del efluente |
| 3.- Trampa para vapor de agua. | 15.- Bomba para succión |
| 4.- Filtro para aire. | 16.- Botella de plástico para efluente. |
| 5.- Pinzas para controlar salida / entrada de líquido al testigo de medio ZoBell. | 17.- Botella de teflón 1 L, para cultivos |
| 6.- Matraz Erlenmeyer con medio ZoBell estéril. | 18.- Agitador de cristal |
| 7.- Entrada de aire al medio ZoBell. | 19.- Efluente con tubo de teflón para muestreo a un vial de centelleo |
| 8.- Pinzas | 20.- Baño de agua |
| 9.- Bulbo de cristal con fibra de vidrio | 21.- Mangueras del termocirculador |
| 10.- Filtro de membrana de 0.2 µm. | 22.- Termocirculador |
| 11.- Tubo de teflón para introducir aire para burbujeo. | 23.- Tapón de silicón de la botella de teflón de 1 L. |
| 12.- Pinzas para controlar salida / entrada de medio estéril a la botella de cultivo. | |

2.2 Diseño Experimental

Para cada temperatura se realizaron 2 experimentos en dos series diferentes. La primer serie de experimentos se realizó con muestras colectadas entre 7 de mayo al 4 de julio de 2003, a las temperaturas de colecta de 16.4 a 22.4°C. La segunda serie se realizó entre el 29 de mayo y el 14 de julio a una temperatura de colecta entre 16.1 a 21.4°C. En total se hicieron 10 experimentos de manera individual.

Tabla 1.- Detalle de las fechas de experimentación para los cultivos.

EXPERIMENTOS	TEMPERATURA ENSAYADA	FECHA EXPERIMENTO	DE TEMP. °C <i>IN SITU</i> DEL LUGAR DE COLECTA
Primer serie	10	20 de mayo	16.4
	14	14 de julio	16.8
	18	15 de mayo	22.4
	22	17 de junio	23.6
	26	7 de mayo	17.2
Segunda Serie	10	29 de mayo	21.4
	14	14 de julio	19.8
	18	3 de junio	18.3
	22	29 de junio	16.1
	26	11 de junio	19.7

2.3 Cultivos en turbidostato.

Los cultivos en turbidostato iniciaron cuando el inóculo alcanzó la densidad máxima (previamente establecida entre 3.0 a 3.5×10^7 células/ml.). A partir de ese momento empezó la dilución del cultivo, reduciendo la densidad celular aproximadamente a $3.0 - 5.0 \times 10^6$ células/ml, hasta que alcanzó el estado estacionario. Para hacer conteos directos de bacterias se tomaron

muestras del cultivo entre una y cada dos horas. Las muestras fueron preservadas con formol y se aplicó la técnica de determinación de abundancia bacteriana por conteos con microscopio de epifluorescencia. Una vez que se alcanzó el estado estacionario, se procedió a la toma de muestras de diferentes variables.

Para determinar abundancia bacteriana se realizaron conteos directos de muestras teñidas según la técnica de Turley y Huges (1992). Las muestras se colectaron (~ 20 ml de muestra) directamente en un vial de centelleo con formaldehído a una concentración final de 2%. Utilizando un filtro GF/F como soporte del filtro negro de policarbonato Nuclepore de 0.2 μm . La preparación se ajustó hasta obtener un número de células entre 20-40 células por campo (0.5 ml a 0.020 ml, según la densidad del cultivo). Se adicionó el colorante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol a una concentración de 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y se incubó por 5 minutos como mínimo, en oscuridad. Una vez filtrada la muestra se retiró el filtro y se montó sobre un portaobjetos con aceite de inmersión de baja fluorescencia encima y abajo del filtro. Se seleccionaron de 16 a 24 campos al azar y un total > 300 células bacterianas fueron contadas. El microscopio de epifluorescencia utilizado fue un Jena Lumar, que cuenta con un espejo dicróico 410 nm, con una longitud de onda de excitación de 365 nm y una de emisión de >390 nm.

2.4 Variables determinadas en la fase estacionaria.

La respiración bacteriana se determinó en la fase estacionaria mediante la producción de CO_2 y el consumo de O_2 . Ambas técnicas analíticas son las primeras en ser determinadas, para evitar el contacto con gases externos.

2.4.1 Determinación CO₂ Total por titulación diferencial

La determinación de CO₂ total como indicador de la actividad biológica en el agua de mar, se basa en el principio de una titulación diferencial de una muestra de agua de mar con HCl (1N) en un sistema cerrado. Para la determinación de CO₂ total se uso un titulador automático de alta precisión (Hernández-Ayón *et al.*, 1999 con modificaciones de Cajal-Medrano, 1999). La precisión de la titulación del CO₂ total y alcalinidad obtenida con este sistema en agua de mar natural se encuentra entre 0.15 a 0.40%. El reactivo HCl (0.1 N), se preparó por dilución de un volumen de una solución comercial DILUT-IT. El electrodo se calibró con soluciones amortiguadoras TRIS, preparadas con agua de mar (Fuhrman y Zirino, 1988). Las muestras para la titulación se colectaron por duplicado en botellas de cristal para BOD de 60 ml. Para evitar el intercambio de gases de la muestra a titular las botellas se llenaron lentamente (dejando derramar tres veces el volumen de la botella) y se cerraron rápidamente evitando la formación de burbujas. El CO₂T fue calculado de acuerdo a:

$$\text{CO}_2\text{T } (\mu\text{M}) = (V_2 - V_1) * N (\text{HCL}) / \text{Volumen de la muestra} * 1000. \quad (3)$$

V₁= volumen HCl consumido en el primer punto de inflexión.

V₂= volumen HCl consumido en el segundo punto de inflexión.

N = Normalidad HCl 1.

2.4.2 Determinación de oxígeno disuelto por espectrofotometría.

El oxígeno disuelto se determinó mediante el método Winkler utilizando el método espectrofotométrico propuesto por Roland y colaboradores (1999) quienes estandarizaron la técnica, corrigiendo por turbidez y color. La técnica detecta el complejo triyoduro formado finalmente por los reactivos del método Winkler, a 430 nm. Inicialmente se hicieron calibraciones por medio de titulaciones de oxígeno disuelto de acuerdo a la técnica Winkler según las

recomendaciones del manual de JGOFS (1994) con un titulador automático de alta precisión (Cajal-Medrano, 1999).

De manera similar a Roland y colaboradores (1999) se generó una curva de calibración mediante el uso de agua destilada saturada con aire a diferentes temperaturas (10, 15, 20,25 y 30 °C.). De esta manera se obtuvo una relación entre la concentración de oxígeno disuelto a saturación y la absorbancia. La concentración de oxígeno disuelto fue titulada con el polinomio de Weiss (1970) para determinar solubilidad en el agua de mar con lo cual se obtuvo valores de oxígeno disuelto teórico. El agua destilada saturada (en el intervalo de temperaturas indicado), se tituló con tiosulfato y se registró absorbancia en espectrofotómetro, simultáneamente a 430 y 750 nm. Se prepararon blancos de reactivos (BR) agregando los reactivos Winkler en sentido contrario y tomando una lectura en espectrofotómetro a 430 nm.

La ecuación resultante para calcular oxígeno disuelto con valores de absorbancia fue:

$$\text{DO (mg L}^{-1}\text{)} = 0.00738 \times \text{CA} - 0.562. \quad (4)$$

Donde CA = $(\text{Abs}_{430} \text{ MUESTRA} - \text{Abs}_{430} \text{ REACTIVOS} - \text{Abs}_{750} \text{ MUESTRA}) \times 1000$.

2.4.3 Uso de viales de centelleo para reducir el volumen de la muestra.

Se utilizaron viales de centelleo con tapón de fondo cónico porque permitió desplazar el líquido sin introducir aire y fueron útiles para fijar en ellos un volumen de muestra reducido (24 ml) del medio de cultivo y del cultivo. Se adaptó la técnica para utilizar viales de centelleo para sustituir a las botellas

de 60 ml de BOD. Con la reducción de volumen de la muestra a 24 ml se reduce también la cantidad de reactivo utilizado a 0.50 ml de la solución A, B y el H_2SO_4 . El resto de la técnica Winkler se mantuvo igual. Se dejaron reposar las muestras en la oscuridad por más de 6 horas hasta una máxima precipitación y se acidificaron con H_2SO_4 . Después de la acidificación se dejaron reposar 5 minutos y se transfirió la muestra a una celda de cuarzo y se registro el valor de absorbancia en el espectrofotómetro. La precisión del O_2 obtenido con esta modificación fue de 0.1% CV, similar a la indicada por Roland y colaboradores (1999) de 0.09% entre botellas.

2.4.4 Células viables

Se utilizó la técnica de Joux y LeBaron (1997), donde se incuban muestras a temperatura ambiente y en oscuridad con una mezcla de antibióticos para inhibir la síntesis de ADN y prevenir la división celular sin afectar el resto del metabolismo. Una vez preparada la mezcla de antibióticos, ésta se filtró a través de filtros, previamente estériles Anodisc de 0.2 μm de 25 mm de diámetro. Los reactivos utilizados para la mezcla de antibióticos y el sustrato del cultivo fueron: **Solución A:** 1gr Ácido Nalidixico ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$); 0.5 gr. Ácido Pipemidico ($\mu\text{g ml}^{-1}$); 0.5 gr. Ácido. Piromidico ($\mu\text{g ml}^{-1}$); en 50 ml sol NaOH 0.05 M. **Solución B:** 500 mg Cefalexin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) en 50 ml agua destilada; más 25 mg Ciprofloxacina ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y **levadura estéril** ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) como sustrato.

Para la preparación de los cultivos de células viables de cada experimento, se tomó una muestra de 9 ml en un vial de centelleo y se agregó asépticamente 1 ml de levadura, seguido de 10 μL de las soluciones de antibiótico A y B. La muestra se mantuvieron a temperatura ambiente para incubar el cultivo (en un tiempo no mayor de 22 horas). Para observar con el microscopio de epifluorescencia el alargamiento celular se tomó 1 ml de muestra del cultivo de células viables a las 2, 6, 12 y 20 horas. Las muestras

se fijaron con la técnica descrita anteriormente para conteo directo según Porter y Feig (1980). Los conteos se hicieron de manera diferencial (células normales y células alargadas) para cada muestra, buscando por lo menos 30 células elongadas contra más de 500 células normales enumeradas.

2.4.5 Virus

Los virus fueron estimados por la técnica de tinción de ácidos nucleicos descrita por Noble y Fuhrman (1998) en la cual, las muestras son fijadas con glutaraldehído 50% (0.5 ml por cada 5 ml de muestra) y refrigeradas a 4°C. Se usaron filtros Millipore de 25 mm de diámetro de fibra de vidrio como soporte para un filtro Anodisc de Al_2O_3 de 13 mm de diámetro de 0.02 μm , a través de los cuales se filtró la muestra hasta sequedad (20 kPa). El filtro se removió de la torre de filtración y se colocó sobre una gota de colorante ($< 50 \mu\text{L}$, con una concentración final 2.5×10^{-3} de SYBR I (Molecular Probes), con una dilución 1:10) y fue incubada en una caja de Petri cubierta en la oscuridad por 15 minutos. Al final de la incubación, la muestra se lavó cuidadosamente, con agua desionizada y estéril (0.02 μl). El filtro se montó sobre un portaobjetos con una gota de solución de glicerol al 50% con amortiguador salino de fosfatos (PBS, 0.05 M $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, 0.85% NaCl, pH 7.5) con p-fenilediamina. Se retiró el exceso de solución y una vez montadas las muestras en los portaobjetos se almacenaron en frío (-4°C), hasta su conteo. Se hicieron conteos al azar de 20 a 24 campos con un total de >200 virus contados. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss, con un objetivo de 100x, bajo excitación azul.

2.4.6 Carbón y nitrógeno orgánico particulado (POC, PON).

El principio de la técnica se basa en filtrar un volumen de agua (~300-400 ml) por un filtro de fibra de vidrio (GF/F) previamente calcinados, a 450°C 30 minutos y mantenidos en desecación hasta su uso. Se utilizó material de

cristalería (sistemas de filtración, viales de centelleo y botellas ámbar) calcinados a 450 °C por 2 horas. Las muestras en los filtros se acomodaron en viales de centelleo y se congelaron a -40° C. Posteriormente estos filtros se liofilizaron por 6 horas y se guardaron en desecador hasta que se trasladaron para su análisis con un analizador CHN del Laboratorio de Marine Science en la Universidad California en Santa Barbara.

2.4.7 Procesamiento de datos

Se calculó la tasa de crecimiento específico (μ hora⁻¹) y el tiempo de generación (g horas).

Cultivos estáticos:

$$\mu (h^{-1}) = \frac{\ln \frac{b_1}{b_0}}{\Delta t} \quad (5); \quad g (horas) = \frac{0.693}{\mu} \quad (6).$$

Cultivos en turbidostato:

$$\mu (h^{-1}) = \frac{\ln \frac{b_1}{b_0}}{\Delta t + \frac{F}{V}} \quad (7)$$

donde **b0** es la densidad celular (células/ml) al tiempo inicial y **b1** es la densidad celular al tiempo final para cada ensayo; Δt es la diferencia de tiempo final, menos tiempo inicial, en horas. F es volumen del efluente (ml); V es volumen del cultivo (ml).

Se calculó Eficiencia de crecimiento bacteriano a partir de los datos de carbón orgánico particulado y CO₂.

$$Y = \frac{\Delta POC}{\Delta POC + \Delta CO_2} \quad (9).$$

Se calculó la respiración específica a partir de los datos de CO₂, tasa específica de crecimiento y carbón orgánico particulado, considerando D= tasa de dilución (1/día):

$$r = \frac{\Delta CO_2 * D}{\Delta POC} \quad (10)$$

2.5 Desarrollo de cultivos en turbidostatos.

Al inicio de los cultivos en turbidostato, las curvas de crecimiento mostraron las fases de retardo y la fase exponencial. Una vez que se definió la fase de máxima densidad, los cultivos se diluyeron a más del 90% de su volumen y se inició el bombeo de medio fresco y estéril. Una vez que la botella de cultivo fue llenada con el medio y se inició al modo de cultivo turbidostato, la tasa de dilución continua, se estuvo ajustando manualmente, conforme se estimaban los conteos celulares de bacterias, buscando obtener el estado estacionario a una tasa de dilución suficiente para mantener una densidad del cultivo entre 3.0 a 5.0 x10⁶ células/ml, que corresponde aproximadamente al 10% de la máxima concentración. Se encontró que en todos los ensayos, los cultivos de bacterias iniciaban la fase de estado estacionario, con la concentración bacteriana deseada, después de unas 10 horas en promedio. En ninguno de los ensayos se observó que el volumen de dilución aplicado decreciera la densidad celular, indicando que no hubo evacuado de cultivo y las bacterias crecieron a una tasa cercana a la máxima de crecimiento.

3. RESULTADOS

3.1 Primera serie de experimentos.

Los experimentos a las temperaturas de 10°C y 14°C presentaron más de 20 horas en la fase de retardo y necesitaron más de 40 horas para alcanzar la densidad de dilución (2.92×10^7 y 2.04×10^7 células/ml, respectivamente), mientras que los experimentos a las temperaturas de 18-26 °C permanecieron entre 4 y 7 horas en la fase de retardo y necesitaron entre 23 y 29 horas en alcanzar la densidad de dilución entre $3.29-4.05 \times 10^7$ células/ml (Fig. 2 a).

3.1.2 Segunda serie de Experimentos.

A bajas temperaturas los cultivos (10°C y 14°C) tardaron más de 48 horas para llegar a la densidad de dilución (2.51×10^7 y 2.07×10^7 células/ml, respectivamente). Los experimentos duraron de 9 a 13 horas para alcanzar la fase estacionaria. El experimento a la temperatura de 14°C alcanzó una densidad de 2.48×10^6 células/ml, siendo la menor densidad reportada para la segunda serie de experimentos mientras que el experimento a la temperatura de 18°C se mantuvo en 6.51×10^6 células/ml (Fig. 2b).

Los experimentos a las temperaturas de 18°C a 26°C presentaron cerca de 4 horas de fase de retardo. El experimento a la temperatura de 18°C permaneció 17.25 horas en el modo estático y alcanzó una densidad de 4.19×10^7 células/ml antes de la dilución, siendo el valor de mayor densidad reportado para todos los experimentos. Los siguientes experimentos a las temperaturas de 22°C y 26°C, tuvieron densidades cercanas (3.85×10^7 y 3.81×10^7 células/ml, respectivamente).

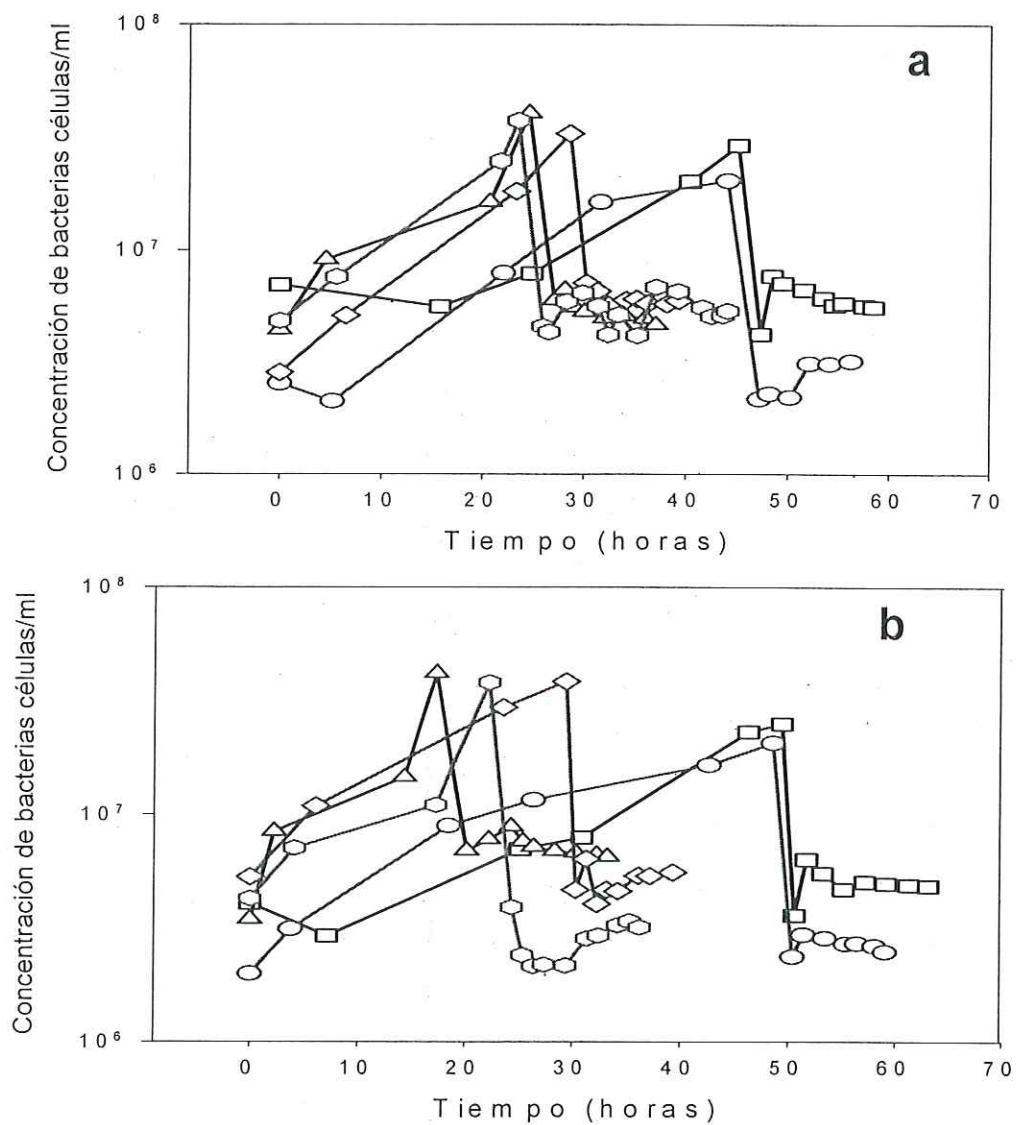


Figura 2. Series de experimentos en turbidostato. El cultivo inicia en modo estático (sin adición de medio) hasta alcanzar la densidad máxima. Posteriormente empieza el bombeo de medio de cultivo. a) primera serie de experimentos. b) Segunda serie de experimentos. Los símbolos son idénticos en ambas figuras ($\square = 10^\circ\text{C}$; $\circ = 14^\circ\text{C}$; $\Delta = 18^\circ\text{C}$; $\diamond = 22^\circ\text{C}$; $\times = 26^\circ\text{C}$).

3.2 Tasa de crecimiento específico en el modo estático y en turbidostato.

3.2.1. Primera serie de experimentos.

Los cultivos en el modo estático a las temperaturas de 10 y 14 °C tuvieron una tasa específica de crecimiento de 1.6 (hora⁻¹). Mientras que sus tasas de crecimiento específico en el modo turbidostato, se incrementaron con la temperatura, variando la tasa específica de 1.35 a 2.66 (hora⁻¹). El comportamiento general fue un incremento lineal de la tasa de crecimiento específico con respecto al incremento de la temperatura de los ensayos. La tasa de crecimiento específico, entre el modo estático y el turbidostato varió visiblemente, incrementando proporcionalmente con la temperatura de los ensayos en el modo de turbidostato, mientras que el modo estático no hay patrón aparente (Fig. 3).

3.2.2. Segunda serie de experimentos

En todos los experimentos se observó un incremento de la tasa de crecimiento específico con respecto a la temperatura, presentando un claro patrón y en general el comportamiento de la tasa específica de crecimiento para todos los ensayos en el modo turbidostato fue directamente proporcional al aumento de temperatura (28.16 a 57.81 μ día), según se aprecia en la figura 3 y Tabla 2.

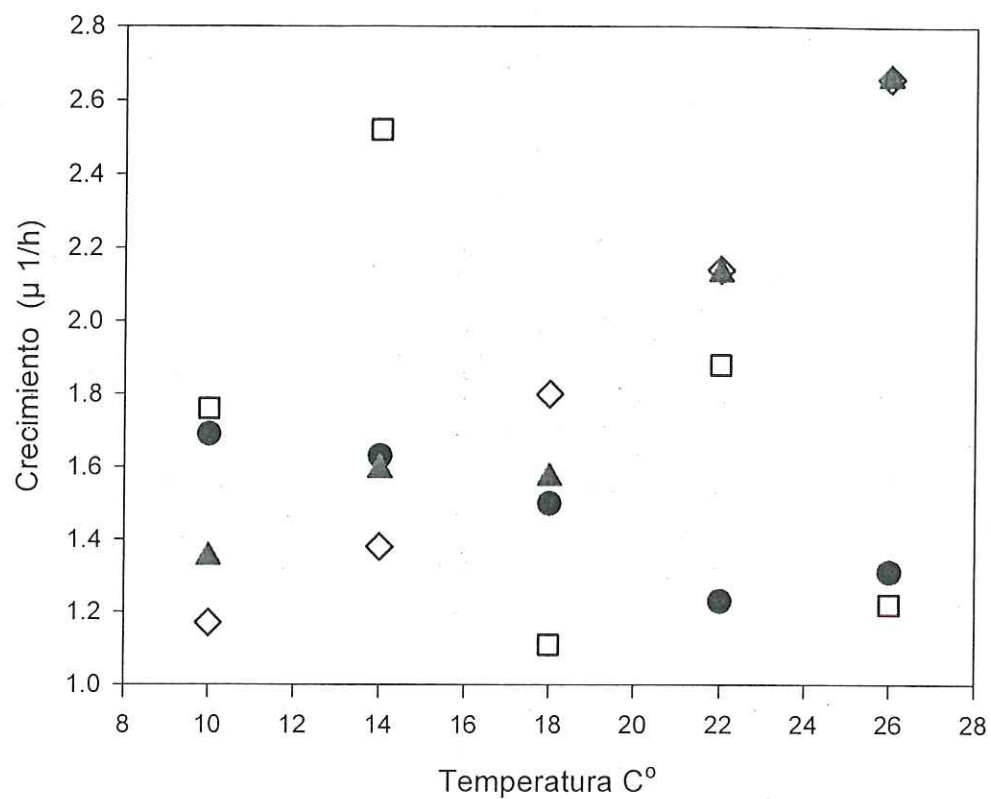


Figura 3.- Comparación de la tasa de crecimiento específico en los cultivos en los modos estáticos y en turbidostato. • Primer serie de experimentos modo estático. □ Segunda serie de experimentos en modo estático. ▲ Primer serie de experimentos modo turbidostato. ◇ Segunda serie de experimentos en modo turbidostato.

Tabla 2.- Características generales de los experimentos en turbidostato.

PRIMERA SERIE DE EXPERIMENTOS			
Temperatura de Experimentación °C	Fase de retardo duración hrs.	Duración del Estado Estacionario (hrs.)	Tasa de crecimiento específico de μ (1/hr ⁻¹)
10	25	10	1.35
14	23	9	1.59
18	5	11	1.57
22	6	9	2.13
26	6	7	2.66
SEGUNDA SERIE DE EXPERIMENTOS			
Temperatura de Experimentación °C	Fase de retardo duración hrs.	Duración del Estado Estacionario (hrs.)	Tasa de crecimiento específico μ (hr ⁻¹)
10	31	12	1.17
14	18	9	1.38
18	2	13	1.80
22	0	9	2.17
26	4	9	2.66

3.3 Células viables.

Los cultivos de células viables en todas las temperaturas ensayadas en la fase estacionaria resultaron con valores bajos de células elongadas en general. Después de 20 horas de incubación en antibiótico, los cultivos de células viables mostraron densidades por debajo de los conteos de células totales. En los experimentos a la temperatura de 10 °C se encontró el mayor número de células elongadas, con respecto al resto de experimentos. No se encontró una relación entre las células totales y las células viables (Fig. 4), resultando en general poco efectiva esta técnica.

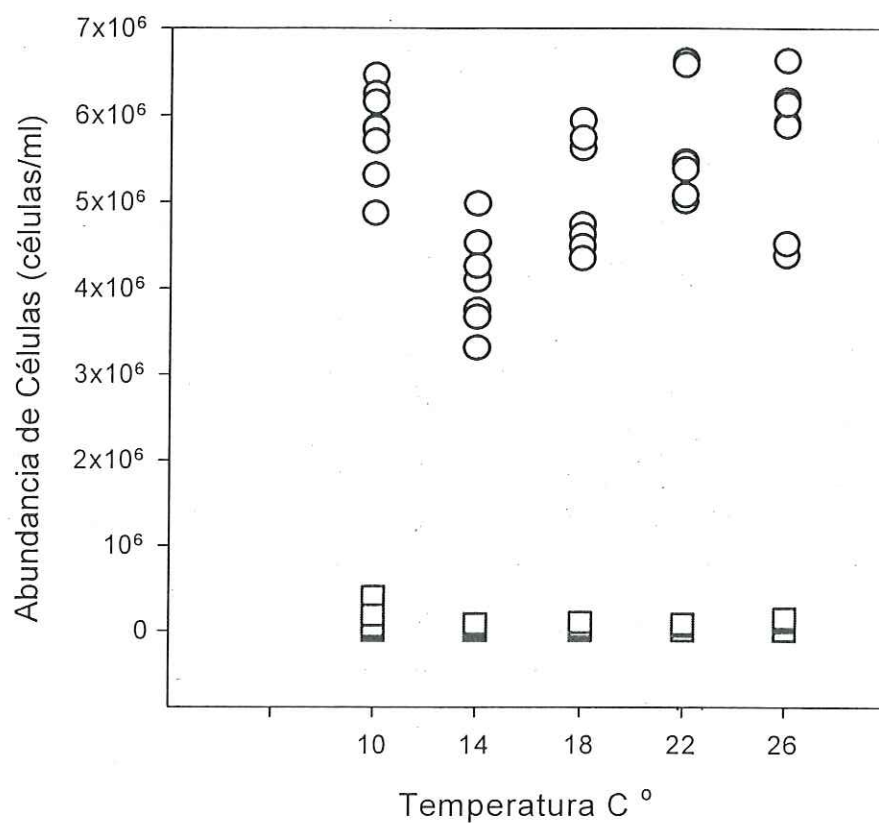


Figura 4.- Células viables en los cultivos en turbidostato en la fase estacionaria. (O Células totales. □ Células viables.)

3.4 Partículas virales

Se encontraron virus desde el inicio de muestreo en el modo turbidostato hasta la fase estacionaria, su número se incrementó a través del tiempo. Su presencia en los ensayos fue evidente presentando una relación lineal positiva con la temperatura ($R^2 = 0.82$, $n = 31$), según se muestra en la figura 5. En esta figura es evidente que los ensayos a 14 °C, además de que tuvieron bajos números de conteos, también mostraron bajos valores de

células virales en comparación con el resto de los ensayos. Sin embargo la tendencia de incrementar el número de partículas con el incremento de la temperatura es evidente. No se encontró una relación significativa entre relación la razón virus / bacterias y la temperatura de cultivo, el coeficiente de regresión lineal es $R^2 = 0.37$, $n = 31$, según se aprecia en la figura 5.

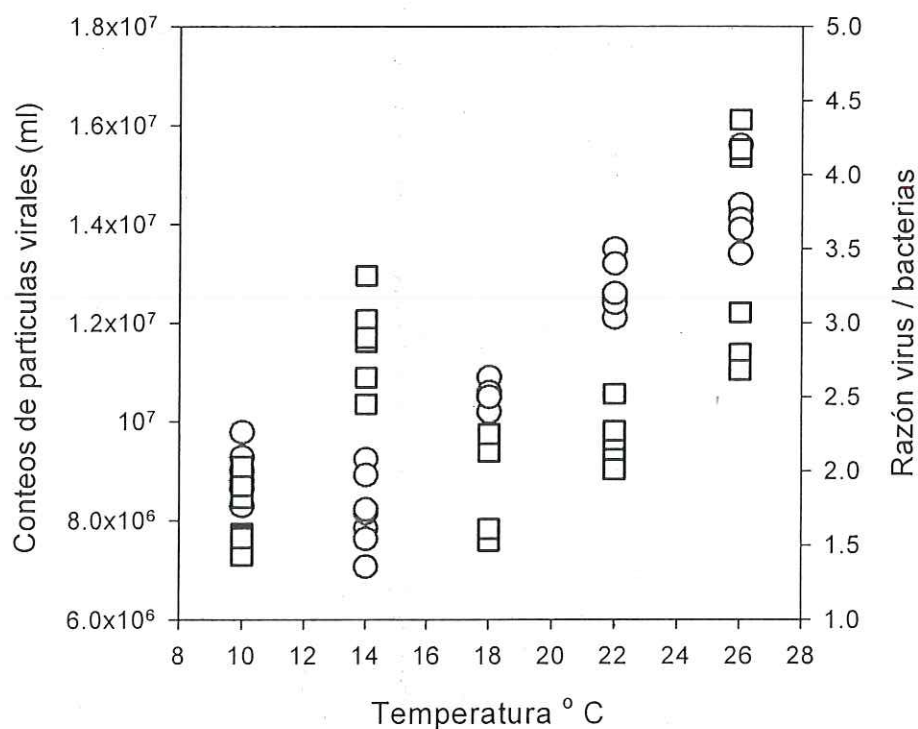


Figura 5.- Presencia de virus en los cultivos en turbidostato. Los conteos de virus con una $R^2 = .82$, $n = 31$, mientras que la razón virus / bacterias con una $R^2 = 0.30$, $n = 31$. (O Conteos de partículas virales. □ Razón virus/bacterias).

3.5 Efecto de la temperatura en las variables determinadas.

3.5.1. Producción de CO₂T, Consumo de O₂, y cociente respiratorio.

La producción del CO₂T generado en los experimentos en los turbidostatos y determinado en la fase estacionaria, resultó ser positiva y lineal ($R^2= 0.67$, $n=10$), lo cual se observa en la figura 6 a. Los cultivos creciendo a 22 °C presentaron un valor de 148.55 $\mu\text{M C}$ de producción, siendo el mayor valor producido, contra el valor de 27.6 $\mu\text{M C}$ que se registro en los cultivos a 10 °C. Los cultivos a la temperatura de 26°C redujeron sus valores de producción de CO₂T.

Los valores de O₂ consumido para los experimentos en el turbidostato, para la fase estacionaria, mostraron un patrón similar al encontrado con el CO₂T, una relación lineal positiva medianamente buena ($R^2= 0.59$, $n = 10$, Fig. 6b). Los experimentos a 14°C resultaron contrarios al patrón, y también fueron los valores más bajos (20.69 $\mu\text{M O}_2$ consumido), mientras que los ensayos realizados a 26°C presentaron valores de 64.63 $\mu\text{M O}_2$ consumido y fueron los mayores valores de oxígeno disuelto consumido. La tendencia fue que al incremento de la temperatura de los cultivos las bacterias presentaron un consumo mayor de oxígeno disuelto, que aquellas que crecen a bajas temperaturas.

El cociente respiratorio en general no varió con el incremento de la temperatura. Al graficarse el cociente respiratorio contra temperatura (Fig. 6 c), el mayor valor del cociente (4.0) se observó a la temperatura de 22°C y después de esta temperatura hubo un decremento del cociente respiratorio, similar comportamiento se presentó con el CO₂T, después de esta misma temperatura, pues la producción de CO₂T decreció a los 26°C.

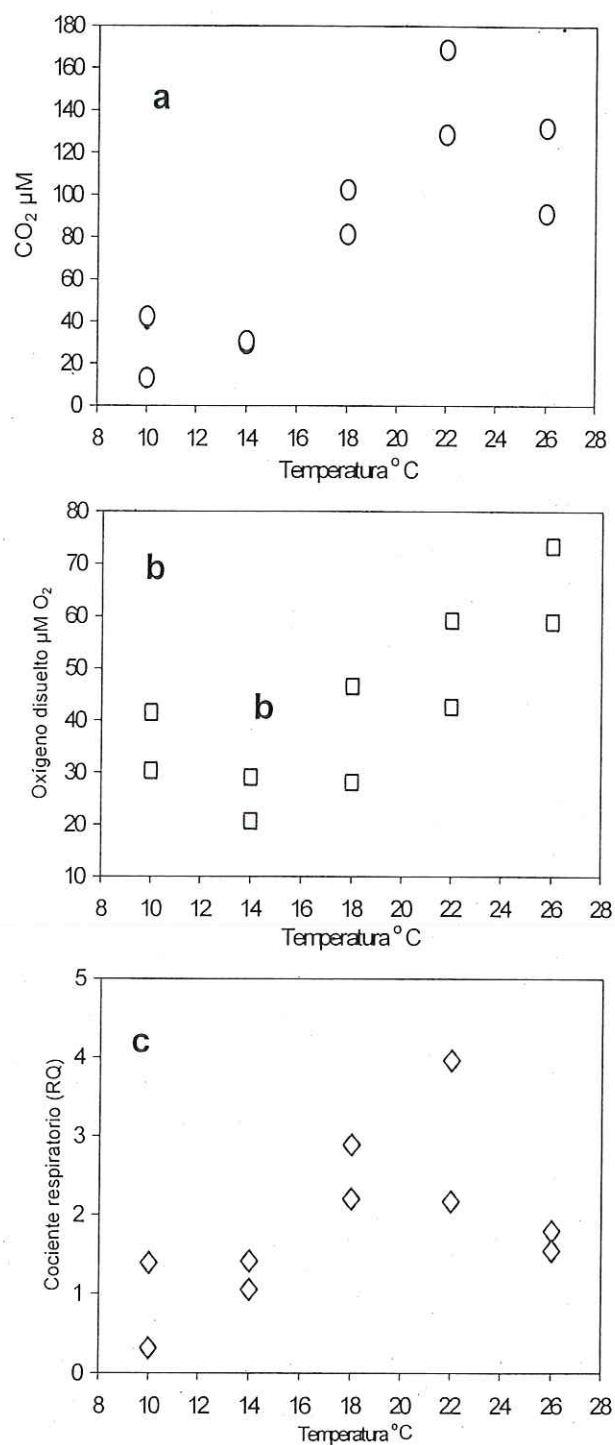


Figura 6.- Mediciones de la respiración bacteriana en la fase estacionaria a diferentes temperaturas. A) Producción de CO₂ en cultivos. B) Consumo de O₂ en cultivos. C) Cociente respiratorio CO₂/O₂ (RQ).

3.5.2 Tasa de crecimiento específico y la relación de Arrhenius.

El comportamiento encontrado para la tasa de crecimiento en la fase estacionaria del turbidostato, fue exponencial, directo y altamente significativo ($R^2 = 0.97$, $n = 10$, Fig. 7). Los experimentos a 10°C presentaron valores con una menor tasa de crecimiento ($30.4 \mu \text{ día}$), mientras que los experimentos a 26°C duplicaron la tasa de crecimiento, presentando valores hasta $60.16 \mu \text{ día}$.

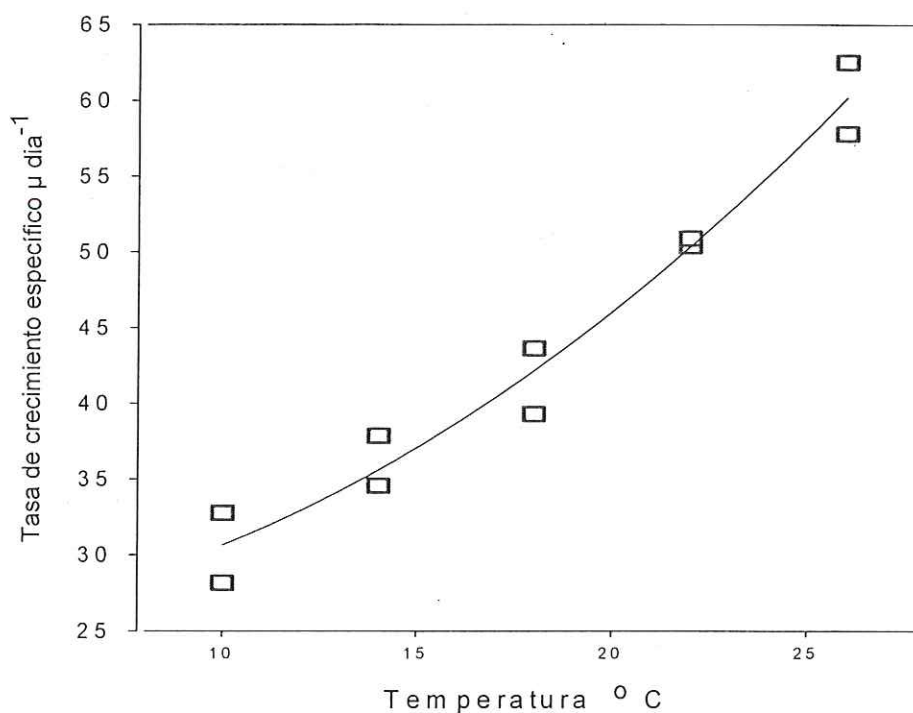


Figura 7.- Tasa de crecimiento específico en cultivos en turbidostato a diferentes temperaturas, con una $R^2 = 0.97$, $n=10$

La gráfica generada con la temperatura de cultivo expresada en grados Kelvin ($1000/T$ °K) contra la tasa de crecimiento μ día (Fig. 8 a), mostró una relación lineal negativa ($R^2 = 0.94$, $n=10$), lo cual era lo que se esperaba al haber encontrado la tasa de crecimiento positiva (Fig. 7). La gráfica de Arrhenius para los experimentos en turbidostato no muestra las temperaturas cardinales superior e inferior, pero se encuentra cerca de los límites reportados. Otra forma de visualizar cómo la tasa de crecimiento se ve afectada por la temperatura es graficar la información según propone por Ratkowski (1982), obteniendo la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento y graficando contra la temperatura ensayada en °C. En la figura 8 b se muestra la representación de Ratkowski y es evidente que el comportamiento es lineal positivo y altamente significativo ($R^2 = 0.95$, $n = 10$). Lo cual indica que la tasa de crecimiento de los cultivos de bacterias ensayados fue influenciada de manera directa por la temperatura.

3.5.3. Comportamiento de la Eficiencia de crecimiento.

La tendencia que se encontró en los datos de eficiencia de crecimiento calculada para los ensayos en turbidostato fue lineal y positiva, según se aprecia en la figura 9 a. La relación fue medianamente alta ($R^2 = 0.73$ $n=10$). En la primera serie de experimentos en turbidostato se presentaron 2 ensayos que no mostraron un incremento de la eficiencia de crecimiento con la temperatura (a 18°C y 22°C), pero los ensayos con los extremos de 10-14°C y 26°C, si presentaron un patrón de incremento de la eficiencia. Mientras que para los segundos experimentos en el turbidostato, solo el ensayo de 22°C no se ajustó en el patrón de incremento. Aun así, el comportamiento general de los ensayos fue el incremento de la eficiencia de crecimiento con la temperatura.

El comportamiento que presentó la eficiencia de crecimiento con la tasa de crecimiento específica fue exponencial y positivo ($R^2 = 0.837$, $n=10$), lo cual se aprecia en la figura 9b. Al incrementarse la tasa de crecimiento aumento

la eficiencia de crecimiento bacteriano para los ensayos. Solamente los ensayos a 22°C fueron los que no se ajustaron al patrón de linealidad y sus valores de eficiencia de crecimiento se presentaron por debajo (0.34 – 0.28) de los valores de los ensayos a 18°C (0.24 y 0.43).

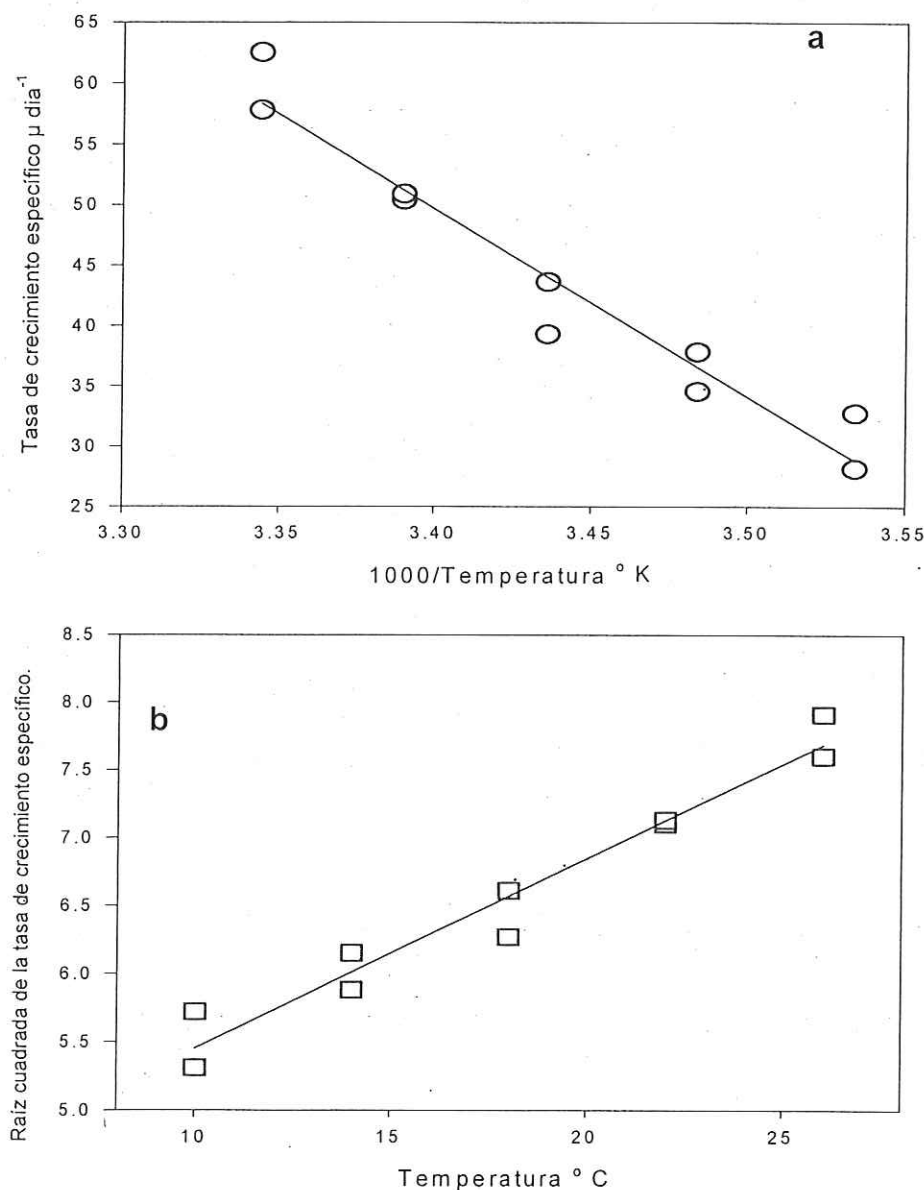


Figura 8.- Tasa de crecimiento en función de la temperatura. a) Muestra la representación de la relación de Arrhenius para los cultivos en turbidostato. b) Representación de Ratkowski (1982) para los cultivos en turbidostato.

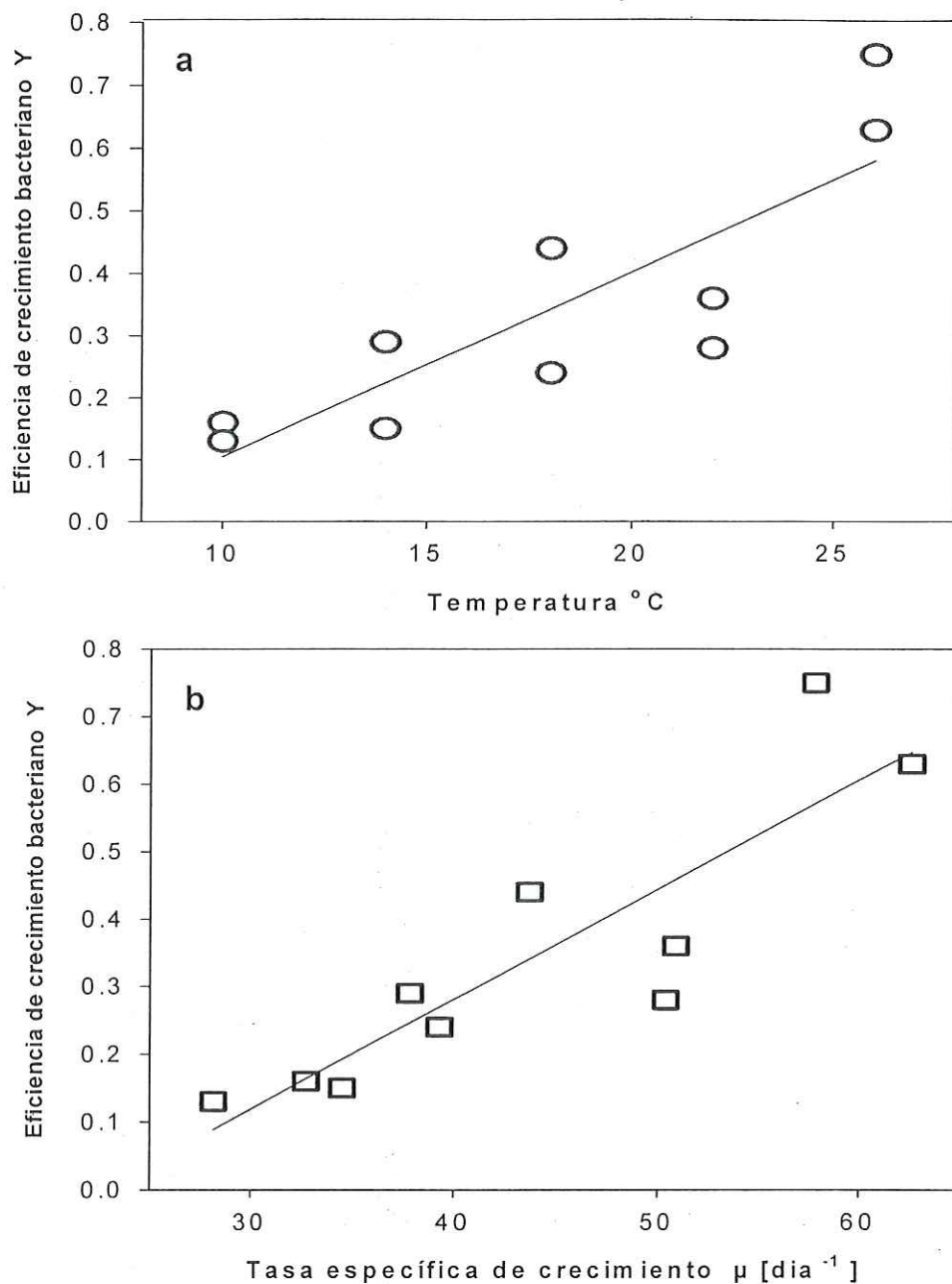


Figura 9.- Eficiencia de crecimiento bacteriano. a) Eficiencia de crecimiento en función de la temperatura de cultivo ($R^2 = 0.73$, $n=10$). b) Eficiencia de crecimiento en función de la tasa de crecimiento específico ($R^2 = 0.83$, $n=10$)

3.5.4 Razón Carbón: Nitrógeno (C/N) celular.

La influencia de la tasa de crecimiento específico y la temperatura muestra el mismo efecto en la razón C/N en los cultivos (figuras 10 a y b) donde la razón disminuye a las tasas de crecimiento específico y temperaturas más altas. La eficiencia de crecimiento muestra los valores más altos cuando la razón C/N de las células disminuye (figura 10 c).

En general el comportamiento de la razón de C/N encontrado en los cultivos en los turbidostatos, mostraron que los ensayos de 10°C y 14°C presentaban los mayores valores (12.64 y 20.85 en promedio respectivamente), mientras que el resto de los ensayos mostraron valores hasta 3 veces menores. El valor más bajo de 3.63 se presentó a la temperatura de 18°C (Fig. 10 b).

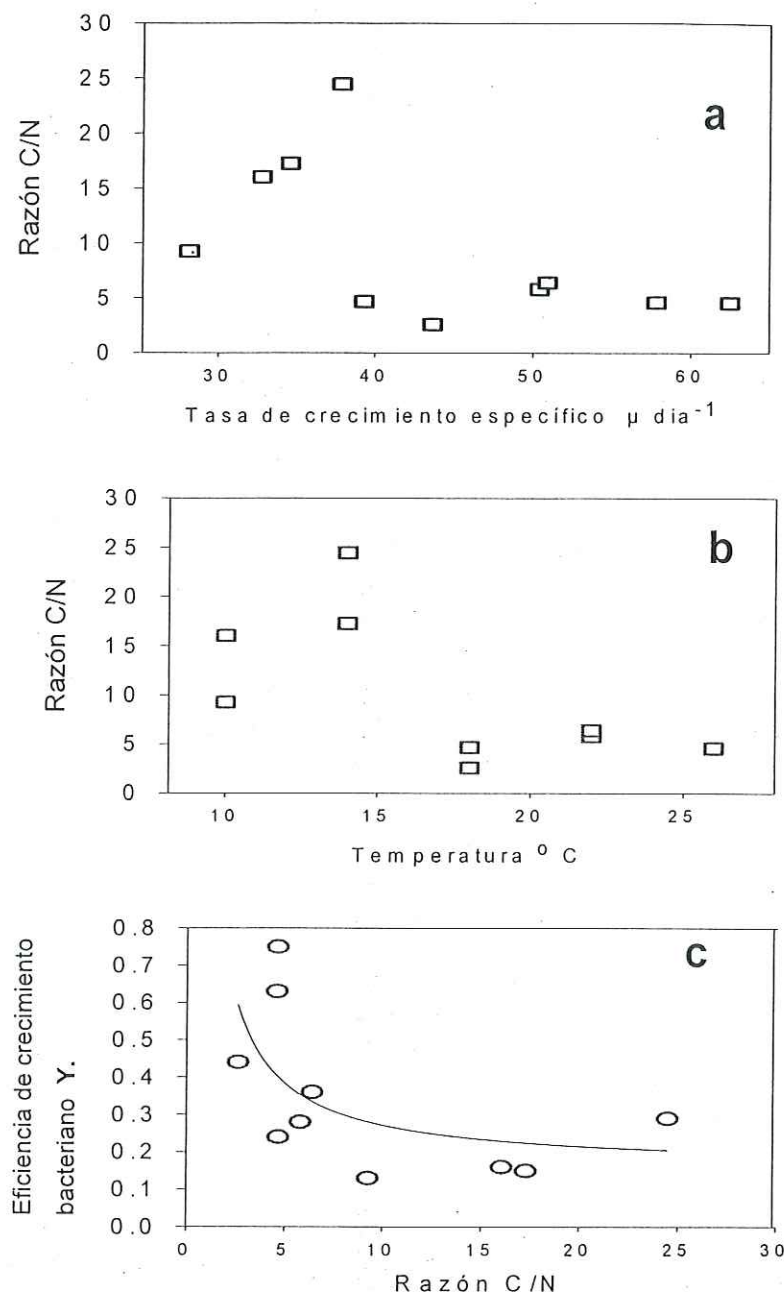


Figura 10.- Razón celular C/N en cultivos en fase estacionaria en función de diferentes parámetros. a) La razón C/N afectada por la tasa de crecimiento específico. b) La razón C/N afectada por la temperatura de cultivo. c) La eficiencia de crecimiento bacteriano afectada por la razón C/N celular

3.5.5 Producción de carbón orgánico particulado.

Se encontró un incremento del carbón orgánico particulado (ΔPOC), con tendencia exponencial positiva ($R^2 = 0.91$, $n = 10$) cuando la tasa de crecimiento específica se incrementa la. El patrón en ambos casos es que al incremento de la temperatura o de la tasa de crecimiento específica, la producción de POC es exponencial (Fig. 11 a, Tabla 3).

Tabla 3.- Determinación del contenido de carbón celular bacteriano en los ensayos en turbidostato en el estado estacionario. ($\Delta\text{POC} = \text{POC}_{\text{cultivo}} - \text{POC}_{\text{medio}}$).

Temp. °C	Tasa de crecimiento específico μ [día]	ΔPOC [μ m]	Abundancia bacteriana células/ml $\times 10^6$	Carbón /célula biomasa fg c-célula
10	32.77	2.46	5.58	5.28
10	28.16	6.43	4.83	15.99
14	37.85	11.76	3.20	44.10
14	34.56	5.46	2.48	26.41
18	39.30	32.41	4.66	83.46
18	43.64	62.63	6.51	115.45
22	50.4	66.87	5.97	134.41
22	50.9	73.33	5.55	158.56
26	62.52	227.04	5.38	506.40
26	57.81	277.20	3.18	1046.05

3.5.6 Biomasa bacteriana.

El contenido de carbón y nitrógeno celular en las bacterias mostró un incremento exponencial con la temperatura de cultivo, con un comportamiento exponencial positivo (Fig. 11 a y b, tabla 3), indicando que las células en los ensayos a 26°C tenían más contenido de carbón y nitrógeno por célula que las que estuvieron cultivadas a 10°C. Los valores de biomasa variaron de 5.28 a 1046.05 fg C-célula (10°C y 26°C, respectivamente). Los cultivos a 26°C en particular presentaron un incremento de carbón celular 5 veces más que el ensayo de la temperatura anterior (22°C). De igual forma la biomasa relacionada con la tasa de crecimiento específica mostró una tendencia exponencial positiva.

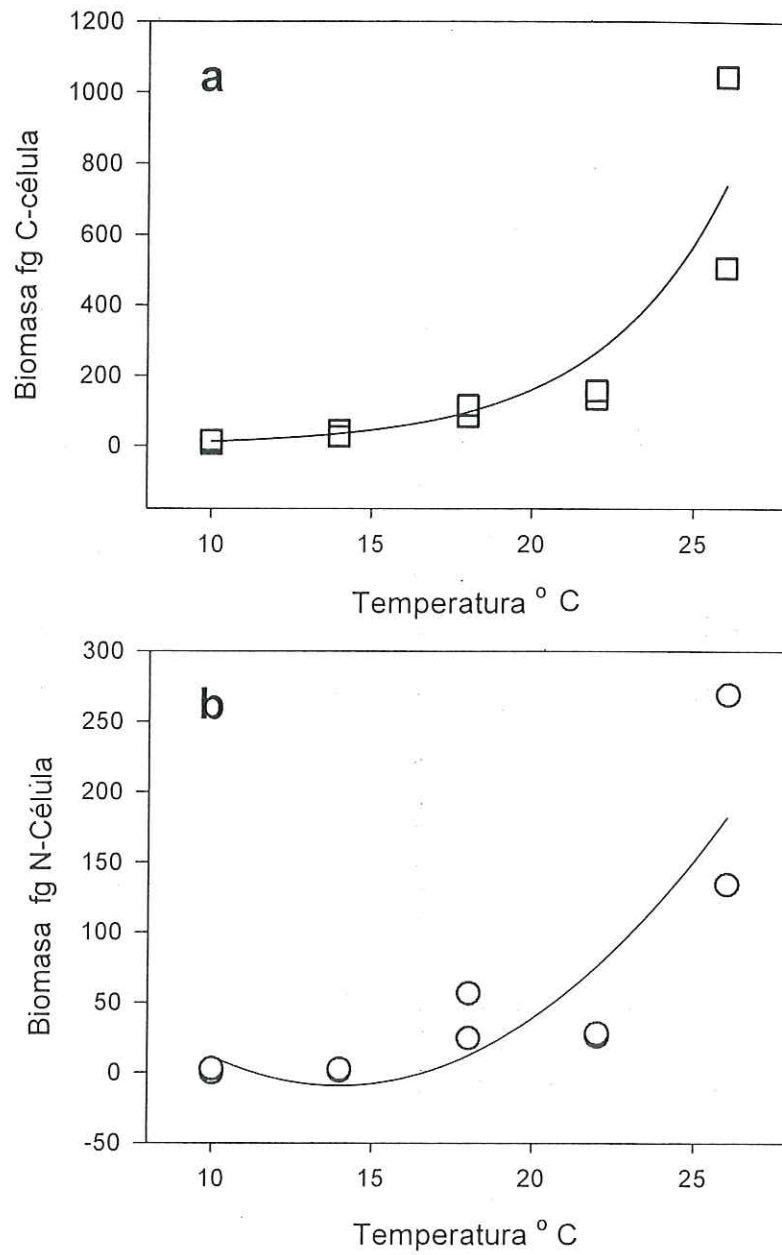


Figura 11.- Biomasa producida en los cultivos en turbidostato. a) Contenido de carbón celular ($R^2 = 0.92$, $n=10$). b) Contenido de nitrógeno celular ($R^2 = 0.73$, $n=10$).

3.5.7 Respiración bacteriana.

Los valores de la respiración por célula presentaron un incremento con respecto a la temperatura de cultivo y la tasa de crecimiento específico, según se aprecia en las figuras 12 a y b, mientras que la respiración específica decreció sus valores al aumento de la temperatura. Los valores más bajos se presentaron a 22°C y 26°C y los más altos estuvieron en los experimentos a 10°C. (Fig. 12 c y d, tabla 4).

Tabla 4.- Determinación de la respiración bacteriana en el estado estacionario de los cultivos en turbidostato.

Temp. °C	Abundancia celular células/ml $\times 10^6$	Tasa específica de crecimiento [día]	Δ POC [μ M]	Δ CO ₂ [μ M]C	Respiración específica * r[1/día]	CO ₂ /célula respirado fg C-célula
10	5.58	32.77	2.46	13.00	173.41	27.96
10	4.83	28.16	6.43	42.24	184.86	104.94
14	3.20	37.85	11.76	29.25	94.14	109.69
14	2.48	34.56	5.46	30.68	194.24	148.45
18	4.66	39.30	32.41	102.36	124.13	263.59
18	6.51	43.64	62.63	81.24	56.61	149.75
22	5.97	50.4	66.87	168.63	127.10	338.95
22	5.55	50.9	73.33	128.36	89.09	277.54
26	5.38	62.52	227.04	131.61	36.24	293.55
26	3.18	57.81	277.20	90.99	18.98	343.36

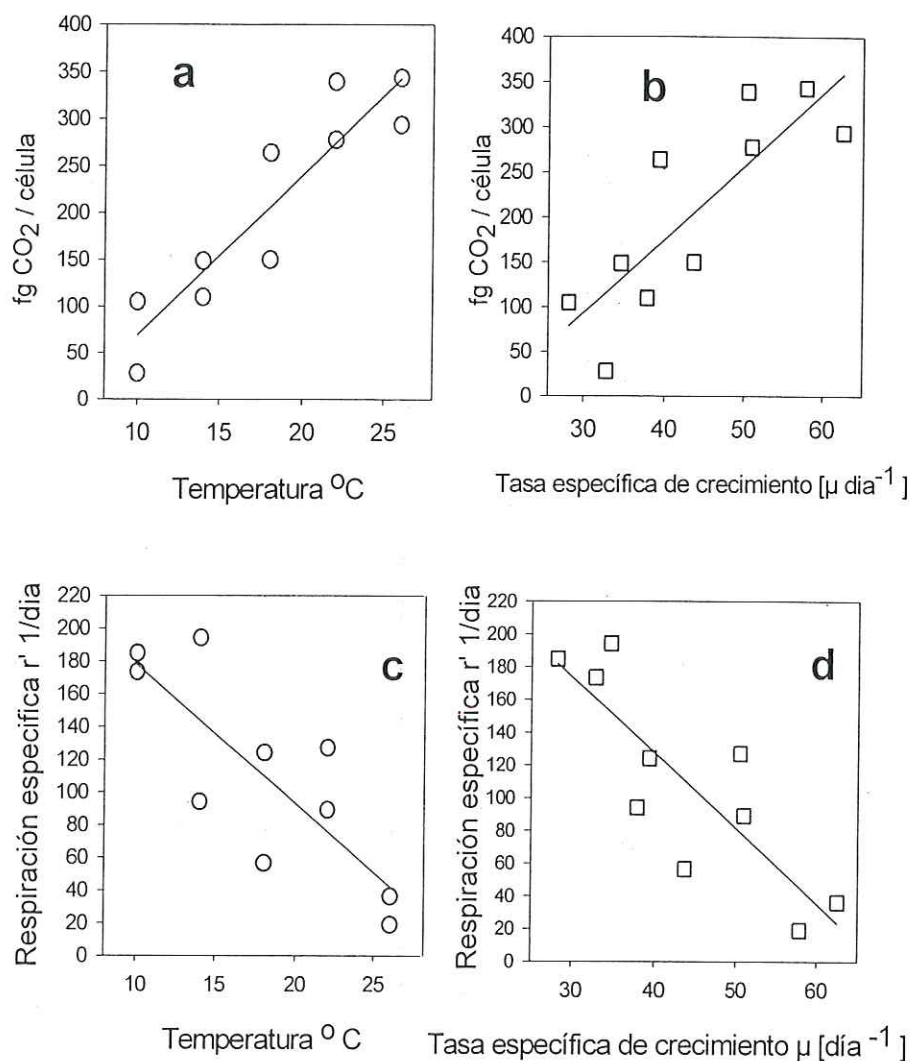


Figura 12.- Respiración bacteriana en cultivos en turbidostato. Respiración celular calculada a partir de CO_2 /Abundancia celular. a) Afectada por la temperatura ($R^2 = 0.84$, $n=10$). b) Afectada por la tasa de crecimiento específica ($R^2 = 0.69$, $n=10$). La respiración específica calculada a partir de $\Delta CO_2 / \Delta POC \cdot \mu$. c) Afectada por la temperatura ($R^2 = 0.66$, $n=10$). d) Afectada por la tasa de crecimiento ($R^2 = 0.70$, $n=10$).

4. DISCUSIONES

4.1.1 Efecto de la temperatura en los ensayos en turbidostato.

La respuesta de los cultivos en función de la temperatura esta evidentemente marcada en los 2 modos de cultivo: las temperaturas menores provocan fases de acondicionamiento más prolongadas, esto debido principalmente a que las bacterias presentan un grado de adaptación a un intervalo de temperatura óptimo. La transferencia de bacterias del medio natural para los inóculos y posterior ensayo genera una selección de bacterias, siendo las mejor adaptadas las que alcanzan la densidad máxima. Los resultados evidenciaron que la temperatura mínima redujo el metabolismo y el comportamiento en los cultivos se vio reflejado en un mayor tiempo de aclimatación, siendo el metabolismo microbiano más lento. La temperatura *in situ* de las poblaciones de bacterias heterotróficas en el medio natural difirió de la temperatura de cultivo ensayadas, siendo esto lo que sucedió con los cultivos de 10-14°C que tuvieron la fase de aclimatación muy extendida y el inicio del crecimiento exponencial más lentamente en comparación de aquellas que provenían de una temperatura *in situ* de 22-24°C.

Cuando las bacterias se encuentran por debajo de su temperatura óptima de crecimiento, adoptan mecanismos de protección de la membrana y de los procesos celulares implicados en el mantenimiento de funciones de la célula. Todo esto conlleva un desgaste energético y un periodo de aclimatación mayor para iniciar su fase de crecimiento exponencial (Atlung y Hansen, 1999). Posiblemente esto sea lo que sucedió en los cultivos estáticos a 10-14°C, en ambos experimentos, cuando la temperatura *in situ* en Bahía Todos Santos se encontraba entre 16-18°C para Mayo 2003 y entre 22-24°C para julio del mismo año, con una diferencia entre 4-8°C, entre el medio natural y las condiciones de cultivo de laboratorio. Esto podría implicar que en las fechas de muestreo las comunidades bacterianas con crecimientos óptimos entre 10-14°C, no estaban completamente representadas y que al

momento del inóculo solo aquellas que pudieron adaptarse al cambio de temperatura de aclimatación en los cultivos estáticos, sean las que representen a la comunidad.

La respuesta que tuvieron las bacterias que estuvieron en los cultivos a las temperaturas entre 10-14°C creciendo más lentamente, concuerda con los resultados de Felip y colaboradores (1996) quienes en cultivos estáticos encuentran que las bacterias cultivadas a bajas temperaturas (4°C) muestran una tasa de crecimiento más baja y con menor abundancia máxima que las mismas bacterias creciendo a 23 °C. Además encuentran que el enriquecimiento del medio de cultivo no promueve el crecimiento a bajas temperaturas.

Se ha reportado también que cuando las bacterias crecen alejadas de su temperatura óptima presentan una fase de aclimatación larga por la reducción del metabolismo aun cuando se cuente con cultivos enriquecidos (Pomeroy y Wiebe, 1993). La temperatura de crecimiento puede afectar profundamente el estado fisiológico de las bacterias y en respuesta a la variación de la temperatura, éstas alteran la síntesis de proteínas, membranas y una variedad de otras estructuras celulares como resultado de adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Bayles *et al.*, 2000). Esto también ha sido reportado por otros autores (Wouters *et al.*, 1999; O'Connell y Thomashow, 2000, O'Connell *et al.*, 2000), quienes concuerdan que las bacterias realizan complejas modificaciones estructurales y fisiológicas que les favorezca mantener la fluidez de la membrana celular.

Sin embargo en estos experimentos se utilizó un intervalo de temperaturas representativas de la zona donde se obtuvieron los inóculos y se considera poco probable que la situación anterior ocurriera. Por el contrario es claro que las bacterias en cultivo sin limitación de sustrato crecieron a tasas muy superiores a las del medio natural. Nedwell (1999) encontró a este respecto

que las poblaciones naturales están comúnmente sujetas a limitaciones extremas y con frecuencia están presentes concentraciones de sustrato con sub-óptimas concentraciones. Al comparar el comportamiento de bacterias en medios enriquecidos contra medios con mínimas concentraciones de sustrato, se ha observado, que las bacterias presentan tasas de crecimiento mayores cuando no están limitadas por sustrato a una misma temperatura de cultivo (Ingraham y Marr, 1996). Esto también se muestra en el trabajo de Felip y colaboradores (1996), donde los cultivos de bacterias con mínimo sustrato muestran tasas de crecimiento reducidas a cualquier temperatura del medio, en comparación con medios enriquecidos. Su modelo conceptual propone una estrecha relación entre la tasa de crecimiento, la temperatura y la limitación de sustrato, en este modelo a una mayor cantidad de sustrato, la tasa de crecimiento específica es superior a aquellas con menor cantidad de sustrato a la misma temperatura. Coincidiendo esta argumentación con lo propuesto anteriormente por Kirchman y colaboradores (1993) y por Shia y Ducklow (1994), donde ambos trabajos han sugerido que el efecto del sustrato en el crecimiento bacteriano es dependiente de la temperatura y que la tasa de crecimiento estaba afectada por la temperatura y las adiciones de material orgánico disuelto.

La tasa específica de crecimiento también se vio afectada por la temperatura en los experimentos en los cultivos en el modo turbidostato, donde se encontraron valores de tasa de crecimiento de 28.16 a 62.52 (día^{-1}), incrementando de manera lineal con la temperatura. Estas tasas son muy superiores a las reportadas para el medio natural y ligeramente más altas a las de Goldman y Denett (1991) en cultivos estáticos. La diferencia entre el efecto de la temperatura en nuestros cultivos y los cultivos estáticos es que el efecto del sustrato es eliminado por el tipo de cultivo empleado, de esta manera estamos observando el efecto neto de la temperatura en el metabolismo.

La relación entre la tasa de crecimiento específico y la temperatura y/o el sustrato ha sido documentada por diferentes autores, los cuales coinciden en que la tasa de crecimiento es controlada por uno o bien ambos parámetros (Felip *et al.*, 1996; Church *et al.* 2000). Bell y Ahlgren (1987) también encuentran una tasa de crecimiento específico influenciada directamente por la temperatura (0-20°C) en donde el incremento de la tasa específica es exponencialmente dependiente de la temperatura. De igual forma Montagnes y colaboradores (2003) mostraron que la razón de crecimiento para 74 especies de plancton incrementa linealmente con la temperatura. Otro trabajo bien documentado sobre la relación del efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento en el medio natural es el de Pomeroy y Wiebe (2001), los cuales con poblaciones naturales de bacterioplancton marino de diferentes ambientes y a diferentes concentraciones de sustrato presentan una relación positiva entre la tasa de crecimiento y temperatura.

4.1.2 Células viables

Los resultados de células viables de los cultivos en la fase estacionaria no mostraron una consistencia en los datos, que indicara una fracción significativa de células activas metabólicamente durante los experimentos. El porcentaje de células que respondió como se esperaba no excedió el 10% de los conteos totales de células bacterianas. Los incrementos de células elongadas resultantes de las incubaciones con la mezcla de antibióticos se estuvieron por debajo de los porcentajes de 7-44% encontrados por Joux y LeBaron (1997).

El método de conteo directo de células viables propuesto por Joux y LeBaron (1997) basado en la incubación de muestras con antibióticos, presenta limitaciones en su aplicación. Según los autores, cuando es aplicado a comunidades complejas, en las que se presenta bacterias resistentes a los antibióticos usados y que sean capaces de dividirse y de esta manera se

evita la formación de células elongadas. Nuestros resultados indicaron que las células bacterianas si son afectadas por el uso del antibiótico, ya que no incrementaron el número de células bacterianas en el tiempo de incubación y su número se mantuvo relativamente constante en el periodo de 24 horas de muestreo.

Es muy posible que en el desarrollo del conteo de células viables, existiera una combinación de factores (células bacterianas resistentes a los antibióticos, infección de fagos, células dañadas que no responden a los antibióticos que genero los reducidos conteos de las células viables y no es posible establecer una relación en los cultivos.

4.1.3 Fagos

La tasa de crecimiento específico y la eficiencia de crecimiento potencialmente están afectadas por la acción de fagos. Se ha encontrado que en cultivos estáticos la acción de los bacteriófagos impide observar las diferencias fisiológicas en los cultivos (González Galindo, 2003). Aunque el incremento de partículas virales en función de la temperatura quedo bien evidenciado en los cultivos en turbidostato, la razón de virus / bacterias tuvo una relación muy baja con la temperatura (entre 1.5 a 4.5). La abundancia de virus en aguas naturales se ha reportado 5 a 25 veces por encima de los valores de abundancia de bacterias (Fuhrman, 1999). Otros autores han reportado valores entre 5-400 (Wilcoxon y Fuhrman, 1994) o entre 8-50 (Middelboe y Lyck, 2002). En cultivos estacionarios se han reportado valores entre 5-100 (González-Galindo 2003). La razón baja (1.5 a 4.5) en este trabajo sugiere que los fagos tiene poca influencia en la dinámica del crecimiento bacteriano en turbidostato.

La remoción de volumen del cultivo, incluyendo la remoción de células bacterianas y partículas virales, afectó la relación de la concentración de

virus contra bacterias, lo que disminuyó las posibilidades de que los fagos encuentren posibles huéspedes para su infección, por el reducido tiempo para el contacto e infección. Esto concuerda con los trabajos de Middelboe y colaboradores (1996) quienes mencionan que la duración del proceso infeccioso y la concentración crítica de fagos dependen de la tasa de crecimiento bacteriano y correlacionan positivamente la tasa de lisis y la producción de nuevas partículas virales con la tasa de crecimiento, en la fase de estado estacionario para cultivos continuos.

Para que los fagos presentes en los cultivos sean potencialmente capaces de infectar y producir nuevos fagos a partir de células bacterianas deben cumplirse varias condiciones: especificidad y tiempo de contacto. Una de los primeros pasos de la infección viral depende de la concentración del fago y del hospedero específico, ya que los fagos son estrictamente específicos para su proceso de infección (Murray y Jackson, 1992; Fuhrman y Noble, 1995; Fuhrman, 1999).

Se ha reportado que los fagos tienden a desactivarse en un lapso de 5 a 6 horas de incubación si no encuentran al hospedero específico, provocando un decaimiento de su número y su posible infección en los cultivos (Middelboe *et al.*, 1996). En los cultivos estáticos las bacterias son más susceptibles de una infección viral, por el tiempo de contacto entre partículas virales y posibles células hospederas que incrementa las posibilidades de infección, causando que la relación virus / bacterias sea significativa e impactante, con la posibilidad de regular la población bacteriana de estos cultivos (González-Galindo, 2003). Este tipo de situación no se presentó en este trabajo, porque los experimentos se realizaron con cultivos en turbidostato y los datos sugieren que es poco probable que los fagos ejercieran un control de la población bacteriana en los cultivos continuos y en la eficiencia de crecimiento.

4.2.1 Consumo de O_2 , producción de CO_2 .

Para ambos procesos, se encontró una relación positiva con la temperatura, indicando que al incrementar la temperatura de los cultivos, las bacterias produjeron más carbón inorgánico y consumieron más oxígeno disuelto del medio, como consecuencia del incremento en la actividad metabólica de las bacterias. Esto ha sido ya reportado por Sherr y Sherr (1996) quienes mencionan que el incremento de la actividad respiratoria es consecuencia del aumento de la temperatura. Los productos de respiración son usados en principio para la síntesis de biomasa (anabolismo) y proveen energía para las actividades fisiológicas que mantienen la integridad de la biomasa celular. El CO_2 respirado se considera la mayor fracción procesada de la incorporación de sustrato a la célula y parte de este CO_2 soporta también, el mantenimiento celular y la biosíntesis (Pirt, 1975). Debido a que tanto la producción de CO_2 como el consumo de O_2 están involucrados en la respiración, el efecto de la temperatura es similar en ambas variables. Esta situación ha sido reportada por Pomeroy y colaboradores (1995) y en este estudio se observan tasas mayores de consumo a mayor temperatura.

El cociente respiratorio RQ entendido como la razón molar entre CO_2 producido y el O_2 consumido varía por la composición química del sustrato orgánico, el estado de reducción del mismo, el estado de oxidación de la fuente de nitrógeno y la biosíntesis de los compuestos celulares. En este caso la composición orgánica del medio de cultivo se mantuvo constante (glucosa), así como también la fuente de nitrógeno (NH_4^+) y el carbón orgánico natural se redujo por ozonificación y envejecimiento del agua usada como medio de cultivo. El RQ esperado estaría en el orden de 1, si se cumple la estequiometría de la oxidación de la glucosa y el amonio y si el efecto del carbón orgánico presente en el medio es despreciable. En nuestros experimentos tal situación se observó solamente a las tasas de

crecimiento específico mayores. Evidentemente si la composición de la biomasa sintetizada cambia también se modifican los valores de RQ. El efecto de la temperatura en la composición celular cambia poco según los estudios de Ingraham y Marr (1996). Por ejemplo la composición macromolecular de *E. coli* y *S. typhimurium* creciendo a 25°C, es la misma que a 37°C, si son mantenidas con el mismo medio de cultivo. Sin embargo el patrón de proteínas de *E. coli* cambia significativamente cuando crece fuera del intervalo normal de temperatura. Los datos de producción de CO₂ y consumo de O₂ contra la temperatura se ajustan bien a una recta excepto para los valores de temperatura en los límites extremos, sugiriendo que a estas temperaturas la degradación de sustrato orgánico (glucosa más DOC) tiene una estequiometría diferente al resto de los datos. Esto último podría indicar un cambio en el metabolismo inducido por la temperatura.

4.2.2 Tasa de crecimiento y Eficiencia de crecimiento bacteriano.

En el trabajo de Pomeroy y Wiebe (2001), con poblaciones naturales de bacterioplancton marino de diferentes ambientes y a diferentes concentraciones de sustrato se presenta una correlación negativa de la tasa específica de crecimiento y el inverso de la temperatura. Este mismo patrón fue encontrado en este trabajo, donde la correlación entre estas variables está ampliamente relacionada. El intervalo de temperaturas utilizadas en los experimentos entre 10-26°C, corresponde al intervalo de valores de temperatura encontrados en la plataforma continental este (31° 52' N) del trabajo de Pomeroy y Wiebe (citado anteriormente). Las deflexiones de la recta no son visibles en los experimentos realizados en los turbidostatos, porque no se ensayaron con temperatura más extremas. Ingraham y colaboradores (1983) afirman que cada especie de bacterias tiene una temperatura de crecimiento característica y en un intervalo normal de temperatura se puede aplicar la cinética química normal de reacciones fisiológicas. Por arriba y por debajo de este intervalo de temperatura, la tasa

de crecimiento es menor de lo que se deduce de la extrapolación de la relación de Arrhenius. La tasa de crecimiento específico resultante en los experimentos en turbidostato mostró aproximadamente el comportamiento que se esperaba de la relación de Arrhenius (Ingraham, *et al.*, 1983). Los datos de campo de Pomeroy y Wiebe, (1993) también muestran en mismo comportamiento que los experimentos en turbidostato.

La tasa de crecimiento específico y la temperatura guardan una relación positiva en la literatura (Pomeroy y Wiebe, 2001), así como en nuestros experimentos. Sin embargo la relación entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura según Rivkin y Legendre (2001) y Biddanda y Cotner (2003) guardan una relación negativa. Nuestros resultados indican claramente que en ausencia de limitación de sustrato, la relación entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura es positiva. Nuestra búsqueda en la literatura de datos recientes de eficiencia de crecimiento y temperatura no muestran ninguna relación, ni siquiera cuando los datos se separan por tipo de metodología empleada o ambientes de donde provienen las muestras (figuras 13 a-b, tabla 9 anexo B). El argumento que hasta la fecha se ofrece para explicar la relación inversa entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura es el efecto del sustrato (Rivkin y Legendre, 2001). Aparentemente en regiones de baja temperatura el sustrato no es limitante mientras que en las latitudes con altas temperaturas el sustrato si es limitante. Además se ha argumentado que las bacterias crecen menos eficientemente en verano que en invierno porque los costos de mantenimiento celular pueden ser más altos a temperaturas elevadas (Biddanda y Cotner, 2003).

Alternativamente puede ocurrir que parte de la variabilidad entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura es debida a las diferentes formas de calcular la producción bacteriana (**P**) y la respiración (**R**). Particularmente el cálculo

de P , involucra la conversión de la asimilación de ^3H -timidina y ^3H -leucina a producción de biomasa (B) por unidad de tiempo (t).

$$\text{Si consideramos que } P = \mu B \quad (11)$$

$$\text{y que } \mu = dB/dt (1/B) \quad (12).$$

Se observa que si bien la ecuación 11 es matemáticamente exacta, involucra la medición directa de P y no la medición de μ y B , por separado. Por lo tanto tiene un elemento de ambigüedad. En nuestro caso el uso de cultivos continuos nos permite separar el efecto del sustrato y medir μ directamente. El cálculo de la eficiencia de crecimiento es de acuerdo a $Y = \mu/\mu + r$, en las que se emplean la tasa de crecimiento (μ) y respiración específica (r), por lo que el cálculo de la eficiencia de crecimiento sólo sería equivalente al de la literatura si B , es la misma tanto en (11) como en (12).

En este momento ignoramos si la diferencia encontrada entre nuestros datos y los de la literatura está directamente relacionada con las diferentes formas de calcular la eficiencia de crecimiento. Es difícil encontrar razones para suponer que la fisiología de las bacterias en cultivos continuos cambie tanto como para poder explicar la diferencia entre los datos de Rivkin y Legendre (2001) y este trabajo. Por el contrario se desconoce cómo cambia la proporción entre el catabolismo y el anabolismo de las bacterias marinas con la temperatura. Los experimentos realizados en este trabajo indican que tanto la respiración por célula como el crecimiento específico se afectan positivamente con la temperatura (esto ha sido reportado ampliamente en la literatura), siendo el resultado que la eficiencia de crecimiento tiene una relación positiva con la temperatura.

De igual forma los resultados de este trabajo no muestran que a las temperaturas más altas empleadas (26°C) exista algún ajuste metabólico,

que pueda aumentar los costos de mantenimiento celular e indican que en condiciones de ausencia de limitación de sustrato la eficiencia de crecimiento es alta y aumenta con la temperatura en el intervalo normal de temperatura de crecimiento (10-26°C) considerado para las poblaciones bacterianas de Bahía Todos Santos.

4.3 La razón celular C/N

En el estado estacionario de nuestros cultivos encontramos una relación inversa entre la razón celular C/N y la tasa específica de crecimiento, la temperatura y la eficiencia de crecimiento. Es conocido que las bacterias mantienen una razón celular de C/N baja a altas tasas de crecimiento y en general tienden a mantener un valor cercano a 4.5 (Goldman, *et al.*, 1987). En general se ha encontrado que en ausencia de limitación por nitrógeno las bacterias mantienen una razón C/N cercana a 4.5 y en exceso de nitrógeno tienden a regenerar amonio para mantener su razón celular (Goldman, *et al.*, 1987)

La razón celular C/N resultante de los experimentos en turbidostato en la fase estacionaria mostró una relación inversa con la temperatura, como lo indicaba la literatura. Estas relaciones inversas de la temperatura, la eficiencia de crecimiento y la tasa de crecimiento específica con la razón C/N, han sido ya reportadas por Goldman y colaboradores (1987), Kroer (1993), Middelboe y Sondergaard (1992) y Biddanda y colaboradores (2001) quienes observaron una relación negativa entre la eficiencia de crecimiento y la razón C/N del sustrato.

La eficiencia de crecimiento mostró una disminución con el aumento de razón celular de C/N y se ubicó cerca del óptimo de la razón (C/N)_{celular} que es cercano a 4.0. En el océano el valor de C/N varía entre 5.2 y 8.3, en la

regiones oceánicas de 6.8 y 5.9 para zonas costeras (Billen, 1984). Este mismo autor ha sugerido que las bacterias regulan la razón C/N excretando nitrógeno para mantener la razón celular de C/N constante.

4.4 Respiración específica y por célula.

La respiración de las bacterias en cultivo se incrementó con el aumento en la temperatura. Asimismo el incremento de la eficiencia de crecimiento, con la temperatura produce un incremento en la biomasa bacteriana. Esto ha sido reportado anteriormente por Jensen y colaboradores (1990) quienes encontraron una correlación significativa entre la respiración y la producción bacteriana, pero esta relación es susceptible a cambiar con la composición y disposición del sustrato.

Algunos trabajos (Del Giorgio *et al.*, 1997; Cimbleris y Kalff, 1998; Toolan, 2001) han coincidido al encontrar una fuerte relación positiva entre la abundancia bacteriana y su respiración, así como la tasa de carbón bacteriano respirado. Otros trabajos en cambio no han encontrado esta relación entre la biomasa y la respiración (Jensen *et al.*, 1990; Ducklow y Carlson, 1992; Biddanda *et al.*, 1994).

En los experimentos en turbidostato se encontró que la respiración por célula y la respiración específica están relacionadas con los valores de POC obtenidos en los cultivos, los cuales incrementaron exponencialmente con la temperatura y la tasa de crecimiento específico. Se apreció que la respiración específica es menor a más altas temperaturas, mientras que la respiración por célula es mayor. Esta diferencia, posiblemente sea por la forma en que se calculó la respiración específica porque esta variable depende de los valores de POC, los cuales incrementaron notablemente con la temperatura. Los valores de respiración por célula indicaron, que a

mayores temperaturas las células a mayores temperaturas presentaron una mayor respiración.

4.5 Biomasa bacteriana

La estimación realizada de la biomasa celular a partir de los datos de carbón orgánico particulado, generó valores de C-celular entre 83.4-1046 fg C por célula, para los experimentos a las temperaturas de 18-26°C muy por encima de los reportados para aguas oceánicas (6.3-12.4 fg C-célula⁻¹) y para agua costeras (12.3- 30.2 fg C-célula⁻¹) para muestras oceánicas (Fakuda, *et al.* 1998). Se tiene unos datos extremos reportado un valor de biomasa de 200-260 fg C (Kroer, 1994), que están por encima de los valores encontrados en nuestros experimentos para los cultivos a 22°C. Sin embargo nuestros valores extremos para los experimentos a 26°C (506 y 1046 fg C), no han sido reportados anteriormente. (Ver a detalle valores reportados de contenido de carbón en la tabla 9, Anexo A). La mayoría de los reportes que no estiman directamente la biomasa la calculan a partir del cálculo de abundancia celular utilizando un factor de 20 fg de carbón por célula (Lee y Fuhrman, 1987). El valor de este factor ha variado en consideración a la incertidumbre generada por los criterios de medición y conversión del biovolumen a biomasa estimados generalmente en cultivos creciendo con medio artificial o usando bacterias no marinas, que ha causado estimaciones incorrectas de la biomasa bacteriana.

Para buscar explicaciones al por qué los cultivos a 26°C presentaron valores tan extremos se revisó la metodología para la obtención de los datos de POC con los cuales se determina los valores de biomasa debido a que recientemente se ha cuestionado explícitamente el uso adecuado de los filtros GF/F para las estimaciones de producción de DOC y POC (Maske-García, 1994; Karl *et al.*, 1998; Moran *et al.*, 1999). Estos trabajos

mencionan la alta capacidad de retener picoplancton, bacterias, virus y partículas coloidales incluidas en la fracción disuelta.

Para revisar esta posibilidad se consideró inicialmente la contaminación de los filtros GF/F utilizados o un inadecuado tratamiento de los mismos. Ambas situaciones no creemos sean la causa, ya que los valores de los filtros (blancos de referencia) no fueron mayores al 5% del contenido de total de POC y fueron calcinados por el tiempo establecido en el protocolo y almacenados 24 horas en condiciones adecuadas antes de su uso. Se descartó también la posibilidad de una interferencia de detritus bacteriano o algún tipo de contaminación de las botellas que sobreestimara el contenido de carbón y nitrógeno, porque esto se vería reflejado en las razones de C/N y los valores de las relaciones obtenidas de C/N para los experimentos no muestran este patrón. Las muestras obtenidas para obtener el POC fueron en un sistema continuo el cual el flujo de entrada y salida al cultivo esta en balance y no puede acumularse ningún material.

Otros trabajos han propuesto otros mecanismos por los cuales las bacterias incrementan de manera extrema los valores de carbón celular reportado. Øvreas y colaboradores (2003), trabajando con meso-cosmos en medio natural adicionados con excesos de nutrientes (glucosa, nitrato y fosfatos) encontraron bacterias grandes con bajo contenido celular de C/N, que tenían presentes inclusiones ricas de carbón como glucógeno y altos contenidos de ribosomas. Otra propuesta para considerar el incremento de carbón particulado ha sido la presencia de partículas transparentes de exopolimeros (TEP), aparentemente formado por polisacáridos exudados por las bacterias (Aldredge *et al.*, 1993; Passow, 2002), que forman la matriz de agregados como material particulado, coloidal y detritus y que tienen una razón C/N similar al medio. Dicho material ha sido previamente observado en la filtración de cultivos, donde son fácilmente detenidos cuando están cargados con coágulos de material particulado, pudiendo influir en las estimaciones de

carbón orgánico particulado. En este estudio no se cuantificó la presencia de TEP por lo que no se puede descartar la posibilidad de que los cultivos que mostraron muy alto contenido de POC puedan ser originados por algún proceso de producción alta de TEP en las fases de crecimiento mas altas a temperaturas mayores debido a alguna diferencia fisiológica.

Es posible entonces que una combinación de factores (diferencias fisiológicas del estado bacteriano, la inclusión de material orgánico no-bacteriano, exudaciones bacterianas), sean las causas de nuestros valores extremos de carbón orgánico particulado en los experimentos de 26°C.

5. CONCLUSIONES

Los resultados experimentales mostraron el efecto de la temperatura sobre las tasas de crecimiento específico, la respiración y la biomasa bacteriana de forma positiva, confirmando la teoría de Arrhenius.

Las células viables y la presencia de fagos no parecen haber sido factores que impactaron la abundancia bacteriana y con ello una posible variación de la eficiencia de crecimiento.

La eficiencia de crecimiento de poblaciones naturales de bacterias marinas en turbidostato muestra una relación positiva con la temperatura, lo cual difiere de algunos datos de la literatura.

Los datos experimentales de este trabajo, donde las condiciones fueron controladas permitieron mostrar la respuesta fisiológica esperada, al separar el efecto del sustrato.

Se desconoce hasta donde las diferencias metodológicas enmascaran la verdadera relación entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura de la revisión bibliográfica efectuada, donde los errores inherentes a la determinación de la producción de biomasa y la respiración generan un amplio intervalo de valores de eficiencia de crecimiento.

Se considera necesario obtener datos de eficiencia de crecimiento y respiración en condiciones controladas de laboratorio, así como en el campo donde se separe adecuadamente el efecto del sustrato, que permitan resolver esta controversia.

6. LITERATURA CITADA.

- Agustí S, Satta MP, Mura MP, Benavent E (1998). Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lyses: evidence of high phytoplankton lyses in the NW Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* 43:1832-1849.
- Allredge AL, Passow U, Logan BE (1993). The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research I.* 40(6): 1131-1140.
- Azam F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 208:694-696.
- Azam F., Fenchel T., Field FG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad (1983). The ecology role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23:99-106.
- Barillier A. and Garnier (1993). Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine River Water Batch Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5): 1678-1682.
- Bayles D, Tunick M, Foglia T, Miller AJ (2000). Cold shock and its effect on ribosomes and thermal tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10):4351-4355.
- Biddanda B, Opsahl S, Benner R (1994). Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. *Limnol. Oceanogr.* 39(6):1259-1275.
- Biddanda BA, Cotner JB (2003). Love handles in aquatic ecosystems: the role of dissolved organic carbon drawdown, resuspended sediments, and terrigenous inputs in the carbon balance of Lake Michigan. *Ecosystems* 5:431-445.
- Billen G. (1984). Heterotrophic utilization and regeneration of nitrogen. In Hobbie JE, Williams PJ (Eds.) *Heterotrophic activity in the sea*. Plenum Press. NY. pp 313-355.
- Bjørnsen PK (1986). Bacterioplankton growth yield in continuous seawater cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 30:191-196.
- Bjørnsen PK (1986). Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1199-1204.

Blight SP, Bentley TL, Lefevre D, Robinson C, Rodrigues R, Rowlands J, Williams P J leB (1995). Phasing of autotrophic and heterotrophic plankton metabolism in a temperate coastal ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 209:1-17.

Bell RT, Ahleng I, (1987). Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 32(2):476-482.

Bratbak G. (1985). Bacterial biovolumen and biomass estimation. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1488-1493.

Cajal Medrano R. (1999). Eficiencia de crecimiento del bacterioplancton marino en cultivos continuos y en el campo. Tesis Doctorado. CICESE. 100pp

Cajal-Medrano R. , H. Maske (2000). Growth efficiency, growth rate and the remineralization of organic substrate by bacterioplankton –revisiting the Pirt Model. *Aquat. Microb. Ecol.* 19:119-128.

Carlson CA, Ducklow HW (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic in the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 10:69-85.

Carlson CA, Ducklow HW, Sleeter TD (1996). Stock and dynamics of bacterioplankton in the northwestern Sargasso Sea. *Deep-Sea Res. Part II* 43:491-515.

Cho BC, Azam F (1988) Major role on bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332:441-443.

Church MJ, Hutchins DA, Ducklow HW (2000) Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:455-466.

Cole JJ, Findlay S, ML Pace (1988). Bacterial production in fresh and salt water ecosystems: A crosssystem over-view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43:1-10.

Cimbliris AC, Kalff J (1998). Planktonic bacterial respiration as a function of C:N:P ratios across temperate lakes. *Hydrobiologia* 348:89-100.

Daneri G, Riemann B, Williams leB P. (1994). In situ bacterial production and growth yield measured by thymidine, leucine and fractionated dark oxygen uptake. *J. Plankton Research.* 16(2):105-113.

- Del Giorgio P, Cole JJ, Cimblerist A (1997). Respiration rates in bacteria exceeded phytoplankton production in aquatic systems. *Nature* 385:148-151.
- Del Giorgio y Cole JJ (2000). In microbial ecology of the oceans. (Ed.) David. L. Kirchman. Wiley-Liss y Sons. Inc. Publication 289-235pp.
- Ducklow HW, Carlson CA (1992). Oceanic bacterial production. *Adv. Microbiol. Ecol.* 12:113-181.
- Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik L (2003). Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7):3701-3709.
- Felip M, Pace ML, Cole JJ. (1996). Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effects of temperature and resources. *Microbiol. Ecol.* 31:15-28.
- Fuhrman, JA. (1999). Marine viruses and their geochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.
- Fuhrman J.A., Noble, R.T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.* 40:1236-1242.
- Fuhrman JA, Sleeter TD, Carlson CA, Proctor LM (1989). Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57:207-217.
- Fuhrman R, Zirino A (1988). High-resolution determination of the pH of seawater with a flow-through system. *Deep-Sea Res.*, 35:197-208.
- Fakuda R, Ogawa H, Nagata T, Koike I (1998). Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *App. Environ. Microbiol.* 64:3352-3358.
- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Van M. Savage, Charnov EL (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 239:2248-2251.
- Griffith PC, Douglas DJ, Wainright SC (1990). Metabolic activity of size-fractionated microbial plankton in estuarine, nearshore and continental shelf water of Georgia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59:263-270.
- Goldman JC, Caron DA, Dannett MR (1987). Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ration. *Limnol. Oceanogr.* 32:1239-1252.
- Goldman J, Denett MR (1991). Ammonium regeneration and carbon utilization by marine bacteria growth on mixed substrates. *Mar. Biol.* 109:369-378.

Gonzalez-Galindo A. (2003). Sobre la interpretación de bioensayos con bacterias marinas heterotróficas: el posible efecto de fagos. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada. 131pp

Hernández-Ayón M, Belli, SL y Zirino A. (1999). pH, alkalinity and total CO₂ in costal seawater by potentiometer titration with a difference derivative readout. *Analytica Chemica Acta* 394:101-108.

Ingraham JL., Marr A.G. (1996). Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. Sinuaver Associates, Inc. Publisher. 240-247 pp

Ingraham J, Maaloe J, Neidhardt J. (1983). Growth of Cells and Cultures.. Sinuauer Associates, Inc. Publisher. 1570-1577pp

Iturriaga R, Hoppe HG (1977). Observation of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter. *Mar. Biol.* 40:101-108.

Jensen LM, Sand-Jensen K, Marcher S, Hansen M (1990). Plankton community respiration along a nutrient gradient in a shallow Danish estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61:75-85.

Joux F, LeBaron P (1997). Ecological implication of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3643-3647.

Kirchman DL (1990). Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the sub arctic Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62:47-54.

Kirchman DL, Rich JH (1997). Regulation of bacterial growth by dissolved organic carbon and temperature in the Equatorial Pacific Ocean. *Microb. Ecol.* 33:11-20.

Kroer N (1993). Bacterial growth efficiency on natural dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 38(6): 1282-1290.

Kroer N (1994.) Relationships between biovolumen and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13:217-224.

Kristansen K, Nielsen H, Reiman B, Fuhrman JA (1992). Growth efficiencies of freshwater bacterioplankton. *Microb. Ecol.* 24:145-160.

Karl DM, Hebel DV, Bjorkman K, Letelier RM (1998). The role of dissolved organic matter release in the productivity of the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 43:1270-1286.

Lee S, Fuhrman JA (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton, *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6): 1298-1303.

Leeme RL, Rochelle-Newall E, Van Wanbeke F, Pizay MD, Rinaldi P, Gattuso JP (2002). Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 29:227-237.

Maske H, Garcia-Mendoza E (1994). Adsorption of dissolved organic matter to the inorganic filter substrate and its implications for ^{14}C uptake measurements. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10):3887.

Middelboe M, Sondergaard M, Nielsen B (1992). Bacterial utilization of dissolved organic carbon (DOC) in coastal waters- determination of growth yield. *Archiv Hydrobiologie Bei. Ergebn. Limnol.* 37:51-61.

Middelboe M, Jorgensen NOG, Kroer N. (1996). Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfect marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6): 1991-1997.

Middelboe M, Lick PG (2002). Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat. Microb.* 27:187-194.

Montagnes DJS, Kimmance SA, Atkinson D. (2003). Using Q_{10} : can growth rates increase linearly with temperature? *Aq. Microbiol. Ecol.* 32:307-313.

Moran XAG, Gasol JM, Arin L, Estrada M (1999). A comparison between glass fiber and membrane filters for the estimation of phytoplankton POC and DOC production. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 187:31-41.

Murray AG, Jackson GA (1992). Viral dynamics: a model of the effects of size, shape, motion and abundance of single cell planktonic organism and other particles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 89:103-116.

Nagata T (2000). Production mechanisms of dissolved organic matter. In Kirchman DL (Ed) *Microbial ecology of the oceans*. Wileys-Liss, New York, 9 121-152.

Nedwell DB (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbial Ecol.* 30:101-111.

Noble R, Fuhrman J (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aq. Microb. Ecol.* 14:113-118.

O'Connell K., Gustafson Ann M., Lehmann M. D., Thomashow M. F. (2000). Identification of cold shock gene loci in *Sinorhizobium meliloti* by using a luxAB reporter transposon. Appl. Environ. Microbiol. 66(1): 401-405.

O'Connell K. and Thomashow M. F. (2000), Transcriptional organization and regulation of a polycistronic cold shock operon in *Sinorhizobium meliloti* RM1021 encoding homologs of the *Escherichia coli* major cold shock gene cspA and ribosomal protein gene rpsU. Appl. Environ. Microbiol. 66(1): 392-400.

Øvreas L, Bourne D, Sandaa RA, Casamayor EO, Benlloch S, Goddard V, Smerdon G, Haldal M., Thingstad TF (2003). Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. Aquat. Microb. Ecol. 31:109-121.

Passow U (2002). Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. Mar. Ecol. Progr. Ser. 236:1-12.

Pirt SJ (1975). Principles of microbes and cell cultivation. John Wiley & Sons. N. Y. 42-50 pp

Pomeroy Lawrence, W. J. Wiebe (2001). Temperature and substrate as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 23:187-204.

Porter K. and Feig Y. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic micro flora. Limnol. Oceanogr. 42:730-740.

Pradeep R, Nair S, Chandramohan D (2002). Bacterial growth efficiency in the tropical estuaries and coastal waters of Goa Shouthwest coast of India. Microb. Ecol. 45:88-96.

Proctor LM, Fuhrman JA (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. Nature 343:60-62.

Protocols for the joint global ocean flux study JGOFS core measurements (1994). Manual and Guide 29, Intergovernmental oceanographic Comission. UNESCO.

Revilla M, Itiarte A, Madariaga I, Orive E (2000). Bacterial and phytoplankton dynamics along a trophic gradiente in a shallow temperate estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 50:297-313.

Rivkin RB, Anderson MR (1997). Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. Limnol. Oceanogr. 42 :73740.

Rivkin R.B. y Legendre L. (2001). Biogenic carbon cycling in the upper ocean: effects of microbial respiration. *Science* 291:2398-2400.

Roland F., Caraco N., Cole J. (1999). Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity. *Limnol. Oceanogr.* 44(4):1148-1154.

Roland F, Cole JJ (1999). Regulation of bacterial growth efficiency in a large turbid estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* 20:31-38.

Shia FK, Ducklow HW (1994). Temperatura regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay. *Limnol. Oceanogr.* 39:1243-1250.

Steward G. J., Smith D.C., Azam, F. (1996). Abundance y production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131:287-300.

Steele JH (1974). In the structure of the marine Ecosystems. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

Suttle CA, Chen F (1992). Mechanisms and rates of decay or marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3721-3729.

Sherr EB, Sherr BF(1996). Temporal offset in oceanic production and respiration processes implied by seasonal changes in atmospheric oxygen: the role of heterotrophic microbes. *Aq. Microb. Ecol.* 11:91-100.

Teira E, Pazo MJ, Quevedo M, Fuentes MV, Niell FX, Fernandez E. (2003) Rates of dissolved organic carbon production and bacterial activity in the eastern North Atlantic Subtropical Gyre during summer. *Mar. Ecol. Prog Ser.* 249:53-67.

Thingstad TF, Hagstrom A, Rassoulzadegan (1997). Accumulation on degradable DOC in surface waters: is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnol. Oceanogr* 42:398-404.

Toolan T (2001). Coulometric carbon-based respiration rates and estimated of bacterioplankton growth efficiencies in Massachussetts Bay . *Limnol. Oceanogr.* 46(6):1298-1308.

Turley CM, Hughes D. (1992). Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep Sea Res.* 39:375-394.

Vrede K, Heldal M, Norlands S, Bratbak G. (2002). Elemental composition (C,N,P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2965-2971.

Wilcox RM, Fuhrman N (1994). Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 114:35-45.

Wilhelm SW, Suttle, CA (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea. *Biosciences* 49:781-788.

Williams P J leB (1981) Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kiel Meeresforsch* 5 :1-28.

Williams P JleB (1995). Evidence for the seasonal accumulation of carbon-rich dissolved organic material, its scale in comparison with changes in particulate material and the consequential effect on net C/N assimilation ratios. *Mar. Chem.* 51 :17-29.

Williams P, J le B (2000). Heterotrophic bacteria and the dynamic of dissolved organic material. In: *Microbial ecology of the oceans*. Ed. By David. L. Kirchman. Wiley-Liss y Sons. Inc. Publication 153-200.

Wouters JA, Rombouts FM, De Vos W, Kuipers O, Abee T (1999). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4436-4442.

Weiss, 1970. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep.-Sea Res.* 17:721-735.

Valencia J, Abalde J, Bode A, Cid A, Fernández E, González N, Lorenzo J, Teira E, Varela M (2003). Variation in planktonic bacterial biomass and production, and phytoplankton blooms off Coruña (NW Spain). *Scientia Marina*. 67(2): 143-157.

Zehr JP, Ward BB (2002). Nitrogen cycling in this ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1015-1024.

Zwifel UL (1999). Factors controlling accumulation of labile dissolved organic carbon in the Gulf of Riga. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 48:357-370.

7.1 Anexo A

7.1.1 Tablas de datos de resultados.

Tabla 1. Experimentos en Turbidostato

10°C-B					10°C- C				
t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hrs.	μ 1/hr	μ día	t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hrs.	μ 1/hr	μ día
0	7.02	0			0	4.06	0		
15.8	5.62	0	-0.01		7.12	2.92	0	-0.05	
24.8	7.90	0	0.04		25.12	7.03	0	0.05	
40.3	20.20	0	0.06		30.87	7.90	0	0.02	
45	29.20	0	0.08		48.22	23.10	0	0.06	
47.3	4.20	589.20	0.36		49.33	25.10	0	0.07	
48.4	7.68	736.76	1.27	17.68	50.55	3.59	855.22	0.82	
49.5	7.30	1156.42	1.09	27.75	51.63	6.33	1164.10	1.69	27.94
51.5	6.67	1556.42	1.52	37.35	53.12	5.49	964.64	0.87	23.15
53.4	6.20	1523.67	1.48	36.57	55.08	4.67	1204.30	1.12	28.90
54.5	5.69	1816.63	1.75	43.60	57.1	5.03	1211.10	1.25	29.07
55.4	5.81	1449.15	1.47	34.78	59.08	4.94	1193.10	1.18	28.64
57.5	5.60	1377	1.36	33.05	61.22	4.88	1161.60	1.16	27.88
58.4	5.58	1365.61	1.35	32.77	63.08	4.83	1173.20	1.17	28.16

14°C B					14°C C				
t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día	t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día
0	2.55	0			0	1.99	0		
5.17	2.12	0	-0.04		3.75	3.13	0	0.12	
22	7.94	0	0.08		18.42	8.92	0	0.07	
31.6	16.40	0	0.08		26.33	11.60	0	0.03	
44	20.40	0	0.02		42.58	16.50	0	0.02	
47.2	2.17	1300	1.17		48.5	20.70	0	0.04	
48.2	2.29	1497.12	1.55	35.93	50.37	2.36	1250	1.18	30
50.2	2.21	1561.25	1.54	37.47	51.35	2.95	1434.55	1.66	34.43
52.1	3.13	1244.21	1.42	29.86	53.35	2.85	1526.44	1.51	36.63
54.1	3.11	1547.69	1.54	37.14	55.33	2.69	1464.40	1.44	35.15
56.2	3.20	1576.96	1.59	37.85	56.35	2.70	1424.41	1.43	34.19
					58	2.63	1450.60	1.43	34.81
					59	2.48	1440.03	1.38	34.56

18°C B					18°C C				
t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día	t (hrs.)	Células/ ml $\times 10^6$	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día
0	4.42	0			0	3.45	0		
4.5	9.10	0	0.16		2.2	8.42	0	0.406	
20.6	16.40	0	0.04		14.25	14.60	0	0.046	
24.5	40.50	0	0.23		17.25	41.90	0	0.351	
27.1	6.00	883.20	0.14		20.12	6.93	1114	0.487	

28.1	6.69	1526.33	1.64	36.63	22.16	7.76	1456.93	1.512	34.96
29	5.58	2018.58	1.83	48.45	24.27	8.84	1031.81	1.094	24.76
30	5.33	1905.32	1.86	45.73	25.38	7.61	1958.17	1.823	46.99
32	4.99	1810.33	1.78	43.45	26.38	7.20	1815.46	1.76	43.57
34	5.11	1714.09	1.73	41.14	28.35	6.89	1785.72	1.763	42.85
36	4.97	1603.77	1.59	38.49	30.28	6.78	1774.18	1.766	42.58
37.1	4.66	1637.56	1.57	39.30	32.23	6.66	1803.62	1.794	43.28
					33.23	6.51	1818.18	1.795	43.63
22°C B					22°C C				
t (hrs.)	Células/ ml x10 ⁶	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día	t (hrs.)	Células/ ml x10 ⁶	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día
0	2.85	0			0	5.31E+06	0		
6.45	5.12	0	0.09		6.05	10.90	0	0.12	
23.3	18.30	0	0.07		23.5	29.90	0	0.06	
28.5	32.90	0	0.11		29.32	38.50	0	0.05	
30.2	7.17	1400	0.50		30.27	4.65	1900	-0.33	
31.3	6.59	1569.30	1.49	37.66	31.27	6.36	2005.60	2.32	48.13
32.4	5.72	1958.64	1.82	47.01	32.27	4.03	2251.35	1.80	54.03
34.2	6.01	2029.06	2.05	48.70	33.17	4.65	2151.91	2.31	51.65
35.2	6.08	2078.79	2.09	49.89	34.23	4.59	1999.14	1.99	47.98
36.3	5.81	2215.17	2.17	53.16	36.13	5.37	2057.57	2.14	49.38
38.1	5.77	2169	2.16	52.06	37.17	5.35	2105.90	2.10	50.54
39.3	5.97	2100	2.13	50.40	39.27	5.55	2121	2.14	50.90
26°C B					26°C C				
t (hrs.)	Células/ ml x10 ⁶	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día	t (hrs.)	Células/ ml x10 ⁶	Efluente ml/hr	μ 1/hr	μ día
0	4.85	0			0	0.42	0		
5.53	7.62	0	0.082		4.1	0.71	0	0.12	
21.7	24.90	0	0.073		17.22	1.10	0	0.03	
23.5	37.60	0	0.232		22.18	38.10	0	0.25	
25.9	4.59	433.6	0.414		24.35	39.00	2200	1.15	
26.5	4.33	578.56	0.481	13.89	25.35	2.40	2407.74	1.92	57.79
28.3	5.93	721.58	0.904	17.32	26.38	2.15	2103.51	2.00	50.48
29.8	6.48	1165.39	1.222	27.97	27.38	2.18	1492	1.51	35.81
31.4	5.66	1948.19	1.86	46.76	29.35	2.16	1979.65	1.97	47.51
32.4	4.21	1966.1	1.67	47.19	31.35	2.84	2040.63	2.18	48.98
33.4	5.17	2050.48	2.256	49.21	32.43	2.93	2239.72	2.27	53.75
35.2	4.17	1272.4	1.157	30.54	34.25	3.25	2239.70	2.30	53.75
37.1	6.87	1292.25	1.562	31.01	35.33	3.38	2310.45	2.35	55.45
39.2	6.57	1503.55	1.482	36.09	36.25	3.18	2408.74	2.34	57.81
41.6	5.56	1393.06	1.324	33.43					
42.5	5.08	2037	1.937	48.89					
43.6	5.13	2231.17	2.24	53.55					
44	5.38	2605	2.708	62.52					

Tabla 2.- CO₂ y Alcalinidad producida en cultivos en fase estacionaria.

EXP. 10°C =C					EXP 10°C B				
Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido		Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido	
cultivo1	2073.24				cultivo1	1836.02			
cultivo2	2079.74	2076.49	42.24		cultivo2	1803.52	1819.77	13	
medio1	2037.5				medio1	1813.27			
medio2	2031	2034.25			medio2	1800.27	1806.77		
Muestra	Alc. µeq/L	promedio	µ eq/L	pH final	Muestra	Alc µ eq/L	promedio	µ eq/L	pH final
cultivo1	2319.98			8.24	cultivo1	2017.37			8.19
cultivo2	2310.22	2315.10	40.68	8.21	cultivo2	2001.16	2009.27	17.91	8.21
medio1	2274.42			8.25	medio1	2001.13			8.18
medio2	2274.42	2274.42		8.24	medio2	1981.58	1991.36		8.18
Exp. 14°C B					Exp. 14°C C				
Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido		Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido	
cultivo1	2014.75				cultivo1	2021.25			
cultivo2	2001.75	2008.25	29.25		cultivo2	2063.49	2042.37	30.68	
medio1	1982.25				medio1	1998.50			
medio2	1975.75	1979			medio2	2024.87	2011.69		
Muestra	Alc µeq/L	promedio	µ eq/L	pH final	Muestra	Alc µeq/L	promedio	µ eq/L	pH final
cultivo1	2277.68			8.31	cultivo1	2271.17			8.15
cultivo2	2271.17	2274.42	-13.02	8.3	cultivo2	2245.14	2258.16	-23.90	8.04
medio1	2277.68			8.33	medio1	2229.87			8.18
medio2	2245.14	2261.41		8.31	medio2	2238.63	2234.25		8.18
Exp. 18°C B					18°C C				
Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido		Muestra	CO ₂ µM	promedio	µM CO ₂ producido	
cultivo1	2014.75				Cultivo1	2008.25			
cultivo2	1998.5	2006.62	102.40		Cultivo2	2037.5	2022.88	81.23	
medio1	1875.02				Medio1	1933.513			
medio2	1933.51	1904.26			Medio2	1949.761	1941.64		
Muestra	Alc µeq/L	promedio	µ eq/L	pH final	Muestra	Alc µeq/L	promedio	µ eq/L	pH final
cultivo1	2245.14			8.24	Cultivo1	2267.92			8.24
cultivo2	2196.33	2220.73	29.28	8.22	Cultivo2	2258.15	2263.04	17.89	8.21
medio1	2219.11			8.3	Medio1	2245.144			8.25
medio2	2163.79	2191.45		8.32	Medio2	2245.144	2245.14		8.24

EXP. 22°C B					EXP 22°C C				
Muestra	CO2 μ M	promedio	μ M CO2 producido		Muestra	CO2 μ M	promedio	μ M CO2 producido	
cultivo1	2011				Cultivo1	2118.74			
cultivo2	2005	2008	168.73		Cultivo2	2138.23	2128.48	128.36	
medio1	1832.77				Medio1	2147.98			
medio2	1845.77	1839.27			Medio2	1852.27	2000.12		
Muestra	Alc μ eq/L	promedio	μ eq/L	pH final	Muestra	Alc μ eq/L	Promedio	μ eq/L	pH final
cultivo1	2251.5			8.2	Cultivo1	2271.17			7.64
cultivo2	2005	2128.25	264.94	8.17	cultivo2	2232.12	2251.64	305.86	7.53
medio1	2391.56			8.27	medio1	2723.45			7.68
medio2	2394.82	2393.19		8.25	medio2	2391.56	2557.50		7.58
Exp. 26°C B					Exp. 26°C C				
Muestra	CO2 μ M	promedio	μ M CO2 producido		Muestra	CO2 μ M	Promedio	μ M CO2 producido	
cultivo1	2284.47				cultivo1	2089.49			
cultivo2	1966	2125.23	131.61		cultivo2	2115.49	2102.49	90.99	
medio1	2005				medio1	2005			
medio2	1982.25	1993.62			medio2	2018	2011.50		
Muestra	Alc μ eq/L	promedio	μ eq/L	pH final	Muestra	Alc μ eq/L	promedio	μ eq/L	pH final
cultivo1	2391.56			7.64	cultivo1	2225.62			8.07
cultivo2	2163.79	2277.67	117.14	7.53	cultivo2	2241.89	2233.75	-19.52	7.86
medio1	2173.55			8.11	medio1	2251.65			8.2
medio2	2147.52	2160.53		8.1	medio2	2254.9	2253.27		8.25

Tabla 3.- Oxígeno consumido en fase estacionaria.

EXP. 10°C B					EXP. 22°C C				
Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM	Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM
cultivo1	7.76				cultivo1	5.06			
cultivo2	7.83	7.80	1.33	41.55	cultivo2	5.01	5.04	0.53	16.63
medio1	9.14				medio1	5.60			
medio2	9.10	9.12			medio2	5.54	5.57		
Exp. 10°C C					Exp. 22° B				
Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	Δ O ₂	μ MO ₂	Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM
cultivo1	6.99				cultivo1	6.40			
cultivo2	6.86	6.92	0.97	30.34	cultivo2	6.44	6.42	0.88	27.46
medio1	7.94				medio1	7.32			
medio2	7.85	7.89			medio2	7.28	7.30		
Exp. 14°C B					Exp. 26°C B				
Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM	Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM
cultivo1	6.96				cultivo1	4.58			
cultivo2	7.03	7.00	0.66	20.69	cultivo2	4.66	4.62	3.82	119.36
medio1	7.54				medio1	8.43			
medio2	7.77	7.66			medio2	8.45	8.44		
Exp. 14°C C					Exp. 26°C C				
Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	f Δ	μ MO ₂	Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	Δ	μ MO ₂
cultivo1	6.59				cultivo1	4.86			
cultivo2	6.50	6.55	0.93	29.12	cultivo2	4.79	4.82	1.79	55.81
medio1	7.87				medio1	6.82			
medio2	7.09	7.48			medio2	6.40	6.61		
Exp. 18°C B					Exp. 18°C C				
Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μ M	Muestra	[O ₂] mg/L	promedio	ΔO ₂	μM
cultivo1	6.34				cultivo1	6.07			
cultivo2	6.32	6.33	1.49	46.52	cultivo2	5.66	5.87	0.90	28.14
medio1	7.80				medio1	6.75			
medio2	7.83	7.82			medio2	6.78	6.77		

Tabla 4.- Células viables y virus en cultivos en fase estacionaria

Células viables				Virus			
				bacterias	Virus	Razón	
Temp. °C	Tiempo	Células Totales x10 ⁶	Células viables x10 ⁵	Temp. °C	células/ml	ml x10 ⁶	virus/bact
10	0	6.46	0	10	5.69E+06	8.99	1.58
10	2.10	5.86	1.83	10	5.81E+06	8.30	1.43
10	4.20	5.83	1.60	10	5.65E+06	8.80	1.56
10	12.10	5.86	2.18	10	5.58E+06	8.65	1.55
10	18.40	6.25	4.01	10	4.94E+06	9.01	1.82
10	0	6.15	0.00	10	4.88E+06	9.28	1.90
10	2.150	5.85	0.38	10	4.83E+06	9.79	2.03
10	5.20	5.70	0.61	14	3.13E+06	9.24	2.95
10	16.42	5.31	0.53	14	3.11E+06	8.92	2.87
10	21.50	4.87	1.83	14	3.20E+06	7.84	2.45
14	0	4.98	0.00	14	2.69E+06	7.07	2.63
14	3.50	4.53	0.61	14	2.70E+06	8.15	3.02
14	19.40	4.10	0.68	14	2.63E+06	7.63	2.90
14	0	4.26	0.00	14	2.48E+06	8.23	3.32
14	2.30	3.75	0.45	18	5.11E+06	10.90	2.13
14	6.30	3.67	0.73	18	4.97E+06	10.60	2.13
14	18.50	3.31	0.82	18	4.66E+06	10.50	2.25
18	0	4.74	0.00	18	6.66E+06	10.20	1.53
18	3.32	4.62	0.36	18	6.51E+06	10.50	1.61
18	16.10	4.49	0.55	22	5.81E+06	12.10	2.08
18	0	5.94	0.00	22	5.77E+06	12.50	2.17
18	5.20	5.62	0.35	22	5.97E+06	12.40	2.08
18	14.50	5.74	0.45	22	5.35E+06	13.50	2.52
18	21.50	4.35	0.99	22	5.55E+06	12.60	2.27
22	0	5.47	0.00	22	6.57E+06	13.20	2.01
22	3.10	5.45	0.30	26	5.08E+06	15.60	3.07
22	14.50	5.01	0.68	26	5.13E+06	14.30	2.79
22	21.10	5.08	0.84	26	5.38E+06	14.40	2.68
22	0	6.63	0.00	26	3.25E+06	13.40	4.12
22	2.45	6.58	0.57	26	3.38E+06	14.10	4.17
22	19.25	5.38	0.80	26	3.18E+06	13.90	4.37
26	0	5.91	0.00				
26	2.25	5.88	0.34				
26	10.30	4.38	0.57				
26	20.40	4.52	0.91				
26	0	6.63	0.00				
26	8.20	6.18	1.03				
26	19.40	6.13	1.49				

Tabla 5.- Carbón orgánico particulado en fase estacionaria.

EXP	Vol. F (L)	Datos originales		Datos Corregidos Blanco				C/N	Δ POC μ C	Δ PON μ M N
		C μ g	N μ g	C μ g/ml	N μ g	C μ M C	N μ M N			
10_B	0.34	40.20	3.60	0.09	0.01	7.30	0.50	16.0	2.46	0.00
10=C	0.51	73.20	9.40	0.12	0.02	10.20	1.10	9.30	6.43	1.01
14_B	0.32	67.10	4.10	0.18	0.01	14.70	0.60	24.50	11.76	0.30
14=C	0.42	70.60	5.50	0.14	0.01	12.00	0.70	17.30	5.46	0.44
18_B	0.56	288.60	70.90	0.49	0.12	40.90	8.80	4.70	32.41	8.22
18=C	0.54	460.50	203.90	0.82	0.37	68.70	26.50	2.60	62.63	26.32
22_B	0.24	280.40	55.80	1.09	0.22	90.70	15.60	5.80	66.87	11.10
22=C	0.22	288.70	52.10	1.23	0.22	102.20	15.90	6.40	73.33	11.10
26_B	0.34	1002.50	254.30	2.87	0.73	239.00	52.20	4.60	227.04	51.61
26=C	0.42	1467.90	369.80	3.40	0.86	283.70	61.50	4.60	277.20	61.15
MEDIO										
10_B	0.58	43.50	5.10	0.06	0.01	4.81	0.46	10.50		
10=C	0.42	29.30	2.00	0.05	0.00	3.81	0.10	37.66		
14_B	0.52	28.40	3.60	0.03	0.00	2.90	0.30	9.65		
14=C	0.34	37.30	2.60	0.08	0.00	6.56	0.25	26.03		
18_B	0.46	57.40	4.90	0.10	0.01	8.52	0.53	15.94		
18=C	0.31	33.10	2.10	0.07	0.00	6.09	0.16	37.22		
22_B	0.52	160.80	35.00	0.29	0.06	23.80	4.54	5.24		
22=C	0.51	187.50	36.10	0.35	0.07	28.82	4.83	5.97		
26_B	0.39	66.90	4.60	0.14	0.01	11.95	0.58	20.59		
26=C	0.22	27.70	2.40	0.08	0.00	6.54	0.31	21.22		

Tabla 6.- Eficiencia de crecimiento y respiración específica.

Cálculos de eficiencia de crecimiento y respiración específica							
Temp. °C	Tasa de crecimiento μ día ⁻¹	Eficiencia de crecimiento				Respiración	
		Δ POC μ M	Δ CO ₂ μ M C	$(\Delta$ POC/ Δ POC+CO ₂) Y	$\mu/(\mu+r^*)$ Y	Δ CO ₂ * u/ Δ POC [1/día]	$r=\mu/Y-\mu$ [1/día]
10	32.77	2.46	13	0.16	0.16	173.41	173.41
10	28.16	6.43	42.24	0.13	0.13	184.86	184.86
14	37.85	11.76	29.25	0.29	0.29	94.14	94.14
14	34.56	5.46	30.68	0.15	0.15	194.24	194.24
18	39.30	32.41	102.4	0.24	0.24	124.13	124.13
18	43.64	62.63	81.24	0.44	0.44	56.61	56.61
22	50.4	66.87	168.6	0.28	0.28	127.10	127.10
22	50.9	73.33	128.4	0.36	0.36	89.09	89.09
26	62.52	227.04	131.6	0.63	0.63	36.24	36.24
26	57.81	277.20	90.99	0.75	0.75	18.98	18.98

Tabla 7.- Respiración bacteriana

Temp.	Abundancia celular	Δ CO ₂	CO ₂ /célula	tiempo generación	
	células/ml x10 ⁶	μ M C	Respirado fg C-célula	g [día]	(fgCO ₂ /célula/generación)
10	5.58	13.00	27.96	0.02	2.33
10	4.83	42.24	104.94	0.02	8.75
14	3.20	29.25	109.69	0.02	9.14
14	2.48	30.68	148.45	0.02	12.37
18	4.66	102.4	263.59	0.02	21.97
18	6.51	81.24	149.75	0.02	12.48
22	5.97	168.6	338.95	0.01	28.26
22	5.55	128.4	277.54	0.01	23.13
26	5.38	131.6	293.55	0.01	24.46
26	3.18	90.99	343.36	0.01	28.61

Tabla 8.- Biomasa bacteriana en fase estacionaria.

Temp. °C	Δ POC μ M C	Abundancia celular células/ml $\times 10^6$	Biomasa fg /célula
10	2.46	5.58	$5.283E^{-15}$
10	6.43	4.83	$1.599E^{-14}$
14	11.76	3.20	$4.410E^{-14}$
14	5.46	2.48	$2.641E^{-14}$
18	32.41	4.66	$8.346E^{-14}$
18	62.63	6.51	$1.154E^{-13}$
22	66.87	5.97	$1.344E^{-13}$
22	73.33	5.55	$1.586E^{-13}$
26	227.04	5.38	$5.064E^{-13}$
26	277.20	3.18	$1.046E^{-12}$

Tabla 9.- Comparación de datos de literatura de valores de contenido de carbón celular bacteriano. (S.d. =: sin datos registrado; n.d. = no determinado)

Contenido de Carbón fg/célula	Tasa de crecimiento (μ día ⁻¹)	Condiciones de crecimiento	Tamaño celular μ m ³	Referencia
6.3 -12.4	s.d.	In situ, aguas oceánicas	n.d	Fakuda et al., 1998.
12.3 – 30.2	s.d.	In situ, aguas costeras.	n.d.	Fakuda et al., 1998.
80 - 220	s.d.	Cultivos estáticos enriquecidos	1.78 ± 0.17	Gundersen et al., 1994.
149 ± 8	s.d.	Cultivos estáticos, fase exponencial	1.78 ± 0.17	Vrede et al., 2002.
39 ± 3	s.d.	Cultivos estáticos, fase estacionaria	0.45 ± 0.06	Vrede et al., 2002.
106 - 214	s.d.	Cultivos estáticos, medio enriquecido	n.d.	Bratbak, 1985
26 – 84	s.d.	Cultivos estáticos medio enriquecido	n.d.	Bjorsen, 1986
200 - 260	s.d.	In-situ, agua de cultivo	n.d.	Kroer, 1994
19.8 ± 0.8	s.d.	Cultivos estáticos, fase estacionaria	0.38 ± 0.05	Lee y Fuhrman, 1987.
83.4 - 1046	30 - 60	Cultivos continuos, fase estacionaria	n.d.	Este trabajo

7.2 Anexo "B"

7.2.1 Análisis de la relación de la eficiencia de crecimiento y la temperatura reportada en literatura.

7.21 Obtención y procesamiento de información bibliográfica.

Se hizo una recopilación de literatura publicada entre 1986-2003 se obtuvieron datos de eficiencia de crecimiento bacteriano (Y) determinados a partir de experimentos en laboratorio y muestreo de campo de bacterias marinas, con información adicional de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) del cultivo o *in situ*. Las publicaciones seleccionadas incluían estas variables: temperatura en grados centígrados y eficiencia de crecimiento, determinada directamente por los autores o calculadas a partir de información directa de las publicaciones. Se incluyó publicaciones de trabajos donde se utilizaran los isótopos radioactivos para determinar producción bacteriana tales como ^3H -Leucina, ^{14}C Carbono, y Timidina. Valores de eficiencia de crecimiento superiores a 0.8, no fueron utilizados por considerarlos extremos.

Tiera et al. (2003).

Datos de razones de POC, DOC y producción bacteriana se obtuvieron en 8 estaciones del Giro del Atlántico Norte en agosto 1998. Se estimaron perfiles verticales para determinar estructuras en la columna de agua. Los datos de temperatura se encuentran en la **figura 2 A, B**. La producción bacteriana se estimó con la incorporación de timidina y las estimaciones de POC y DOC se determinaron por incubaciones de ^{14}C . Estos valores (POC, DOC y PB) se tomaron de la **tabla 1**. Se obtuvieron 6 datos

Eiler et al. (2003).

Cultivos estáticos de bacterias, para determinar el efecto de la fuente de carbón en la biomasa, el crecimiento bacteriano, la eficiencia de crecimiento y la composición de la comunidad. Los cultivos se mantuvieron a la temperatura fija de 20°C . Se determinó biomasa a partir del número de células por flujo citométrico y conteo directo con naranja de acridina y los resultados se encontraban en la **figura 2B**. Se obtuvieron 7 datos.

Lemee et al. (2002).

Reporte anual de estudios de respiración bacteriana, producción bacteriana, biomasa y eficiencia de crecimiento en el NW Mar Mediterráneo (2000). Con muestreo a 5 profundidades (5, 20, 50, 90 y 130 m). Los datos de temperatura se obtuvieron de perfiles verticales con CTD (**figura 2 A**). La Abundancia celular la determinaron de conteos directos con DAPI y la biomasa transformando a contenido de carbón y estos datos se encuentran en la **figura 3 A**. La producción bacteriana se estimó de la razón de leucina incorporada, encontrándose estos datos en la **figura 3B**. Con Incubaciones de oxígeno se

determinó la razón de respiración, estos datos se encuentran en la **figura 3D**. Se obtuvieron un total de 65 datos.

Pradeep (2002).

Estudio comparativo entre un estuario y la zona costera en el Mar Árabe y el estuario de Zuari de enero-mayo. Se buscó determinar la influencia de la temperatura en la eficiencia de crecimiento por incubaciones por 24 horas de las muestras de campo a tres temperaturas (18,28 y 38°C). Se determinó el consumo de oxígeno disuelto por el método Winkler. La biomasa bacteriana la estimaron a partir de la incorporación de ^{14}C -leucina. Los datos se encontraron en la **tabla 3**. Se utilizó los valores mínimo, máximo y el promedio. Se obtuvieron 9 datos.

Biddanda y Cotner (2002).

Muestreos en el lago Michigan (invierno 99 y verano 2000), para examinar las dinámicas del flujo de carbón. Trabajaron en 9 estaciones y registraron 4 temperaturas (2, 4,12 y 14 °C). Determinaron respiración bacteriana por incubaciones de O_2 . Realizaron conteos directos con naranja de acridina. La producción bacteriana la estimó con la incorporación de leucina. La respiración la estimaron a partir del consumo de oxígeno disuelto. Se encontró 12 datos en la **tabla 1**.

Toolan (2001).

Estimaciones de las razones de respiración y producción bacteriana en agua superficial de la Bahía de Massachussets, (de sep. 93 a dic. 94) .Se hicieron incubaciones en bolsas conteniendo agua de mar de la bahía a temperatura in situ (2-20°C). Se hicieron mediciones de CO_2T por coulometría con la técnica de Johnson y colaboradores (1993), para determinar la razón de respiración, La producción bacteriana la estimaron a partir de la transformación de los conteos directos de naranja de acridina a carbón. Los datos de eficiencia de crecimiento se encuentran en la **tabla 3**. Solo se utilizó 4 datos, que indicaban la temperatura específica de las incubaciones in situ para la fecha de muestreo indicada.

Revilla et al. (2000).

Datos de biomasa, producción, tasa específica de crecimiento, eficiencia de crecimiento bacteriano, fueron procesados por 9 meses (junio a octubre 1996 y febrero a mayo de 1997) en una sección longitudinal en el Estuario Urdarbai, España. Se recabaron datos de 3 estaciones (1,3,7) y 2 profundidades (fondo y superficie). La abundancia celular se estimó a partir de los conteos directos con DAPI que se transformaron a C-célula. La producción bacteriana se determinó a partir de timidina incorporada que se obtiene directamente de la **figura 5B**. La razón de respiración se estimó de los datos de oxígeno disuelto determinado por incubaciones en oscuridad, que aparece en la **figura 6**. Se obtuvieron 41 datos.

Roland y Cole 1999.

Trabajaron con cultivos estáticos enriquecidos con nutrientes, utilizando agua del río Hudson. Ensayaron a 5 temperaturas (5, 10, 15, 25, 30). Determinaron abundancia por medio de conteos directos con naranja de acridina. Determinaron producción bacteriana a partir de la razón de leucina incorporada y la respiración bacteriana por consumo de oxígeno disuelto, determinado por espectrofotometría. Los datos de eficiencia de crecimiento se encontraron en la **figura 4** y se obtuvieron 5 datos.

Zweifel (1999).

Para determinar la biolabilidad del DOC en el Golfo de Riga, Estonia, durante la primavera-verano de 1996, para 4 estaciones a 4 profundidades 2.5, 5, 10, 20 m. Con incubaciones utilizando agua de mar del Golfo, libre de predadores, variaron la concentración de carbón de 70-600 μM al agua y enriquecieron con N y P. En la **tabla 1**, se encuentran los valores de las temperaturas in situ. La abundancia bacteriana la estimaron de conteos directos con naranja de acridina y la producción bacteriana con la incorporación de Timidina y Leucina. Con estimaciones de POC y DOC se determinó biovolumen usando el factor de conversión propuesto por Simon y Azam, 1989. Estos valores se encontraron en la **tabla 4**. Se obtuvieron 10 datos.

Cajal Medrano (1999-2003).

Cultivos continuos de bacterias heterotróficas en quimiostato, variando la tasa de dilución. Los cultivos permanecieron a 22°C de forma constante. Se hicieron mediciones de CO_2T y determinaciones de POC. En la **tabla 1** se encuentran los valores de CO_2T y POC. Se tuvo un total 30 datos.

Carlson y Ducklow 1996.

Utilizando cultivos estáticos con agua de mar del Mar de los Sargazos, se examinó el crecimiento bacteriano y la utilización de carbón orgánico disuelto, donde variaron la concentración y el tipo de sustrato en los experimentos. Se hicieron conteos directos con naranja de acridina para la abundancia celular y se determinó biovolumen (Baldwin y Bankston 1988, Watson *et al* 1977; Ducklow y Carlson 1992). Los cultivos estuvieron en el intervalo de 19-25°C (**tabla 1**). La producción bacteriana se determinó de la leucina incorporada (Carlson *et al* 1995). El carbón orgánico disuelto lo estimaron de muestras filtradas y tratadas en un analizador de carbón a alta temperatura. Los resultados de eficiencia de crecimiento se encuentran en la **tabla 3**. En total se encontraron 11 datos.

Biddanda *et al.* (1994).

Los autores hicieron un muestreo en el Norte del Golfo de México, para evaluar flujos de carbón a través del bacterioplancton, estimando razones de crecimiento y respiración. Mediciones de la respiración bacteriana (por oxígeno consumido por incubaciones en oscuridad, y producción bacteriana (por incorporación de

timidina y leucina), se efectuaron en superficie y profundidad. Las mediciones de temperatura fueron *in situ* entre 21.9-24.5 (**Tabla 1**). Los datos de eficiencia de crecimiento los reporta en la **tabla 5**.

Middelboe y Sondergaard (1993).

Cultivos estáticos inoculados con poblaciones naturales de agua de lago, que se mantuvieron a 18°C. Se obtuvo biomasa y producción bacteriana, así como POC. La respiración se calculó del oxígeno consumido. Esos datos se encuentran en la **figura 2** y los datos de eficiencia de crecimiento se ubican en la **figura 3a**.

Barillier y Garner (1993).

Hicieron mediciones en río Sena y cultivos estáticos de poblaciones naturales de bacterioplancton donde variaron la concentración del sustrato. Estimaron la producción bacteriana por la incorporación de timidina, mientras que la respiración la determinaron por el consumo de oxígeno disuelto con un electrodo. El intervalo de temperatura encontrado en los muestreos fue de 8-25°C, mientras que los cultivos estáticos los mantuvieron constantes a 20°C.

Kristiansen *et al.* (1992).

Cultivos continuos de agua dulce enriquecida a una temperatura de 10°C, donde se calculó eficiencia de crecimiento. Los datos de eficiencia de crecimiento y tasa específica de crecimiento fueron tomados directamente de su **tabla 4**. Se utilizaron 8 datos.

Goldman y Denett (1991).

Cultivos en sistema estático de agua de mar colectada en la bahía de Woods Hole, la cual se enriqueció con diferentes sustratos (aminoácidos) para determinar las razones de asimilación C/N. Los experimentos se realizaron de 1989-1990, a una temperatura constante de 24°C. Se determinó carbón particulado de muestras filtradas en GF/F y analizadas a 240°C en un analizador. Los datos de la eficiencia de crecimiento se encontraron en la **tabla 3**. Se obtuvieron 15 datos.

Bjorsen (1986).

Cultivos continuos en agua de mar filtrada del estuario de Roskilde, Dinamarca en marzo, abril y julio 1985. El agua de mar presentaba un reducido contenido de carbón inorgánico. Se midió la producción de CO₂ (respirado) y la producción neta por material particulado. Se mantuvieron los cultivos en 3 temperaturas (6,10,15 °C). Determinó DIC y POC, en un analizador de TOC. Estimo el número de células por conteos directos con naranja de acridina. En las figuras 2B, se encuentra la eficiencia de crecimiento para cada uno de las temperaturas ensayadas. Se obtuvieron 30 datos.

7.2.2 Procesamiento de datos.

La base de datos de la recopilación de información de la literatura dio un total de 252 juegos de datos: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y eficiencia de crecimiento (Y , sin unidades). Se separaron los datos en: 1) De cultivos experimentales en laboratorio, 2) De muestreos directamente in situ. 3) Por intervalos de temperatura ($0 - 9^{\circ}\text{C}$; $10 - 14^{\circ}\text{C}$; $15 - 19^{\circ}\text{C}$; $20 - 24^{\circ}\text{C}$; $25 - 29^{\circ}\text{C}$; $> 30^{\circ}\text{C}$), 4) Por metodologías: isótopos y factores de corrección o por parámetros del metabolismo (O_2 , CO_2 , DOC).

VII 7.2.3 Resultado de análisis de datos.

Los datos de temperatura reportados en la literatura mostró un gran intervalo desde >3 a $<40^{\circ}\text{C}$. El intervalo de temperatura que con el mayor número de datos el de $20-24^{\circ}\text{C}$ (70 datos). Los datos en general tienen una amplia distribución espacio temporal, cubriendo lagos, ríos y mares eutróficos y oligotróficos.

Tabla 10.- Comparación de métodos utilizados para calcular la eficiencia de crecimiento.

Autor	Temp.	Calculo (Y)	Reporte (Y)	Localización
Bjorsen (1986)	24	$Y = \text{POC}/\text{POC}+\text{DIC}$	0.11 - 0.28	Fiordo Roskilde, Dinamarca
Goldman y Denett (1991)	10	$Y = \text{POC}/\text{DOC}$	0.36 - 0.65	WoodHole, Massachussets
Kristiansen <i>et al.</i> (1992)	10	$Y = \text{POC}/\text{POC}+\text{DIC}$	0.12 - 0.47	Atlántico Norte
Barillier y Garnier 1993	8-25	$Y = \text{PB f1} / \text{PB f1}+\text{RQ1}$ O_2	0.03 - 0.55	Rió Sena, Francia
Middelboe y Sondergaard. (1993)	18	$Y = \text{POC}/\text{POC}+\text{DIC RQ2}$	0.35	Pacífico del Norte
Biddanda <i>et al.</i> (1994)	21-24	$Y = \text{PB f2} / \text{PB f2} + \text{RQ1}$ O_2	0.19 - 0.55	Golfo de México
Carlson y Ducklow (1996)	19-25	$Y = \text{B f4} / \text{DOC}$	0.04- 0.30	Mar de los Sargazos NW
Cajal y Maske (1999)	22	$Y = \text{POC}/\text{POC}+\text{CO}_2$	0.05 - 0.70	Ensenada, B.C
Roland y Cole (1999)	5-30	$Y = \text{PB f8} / \text{PB f8} + \text{RQ1}$ O_2	0.12 - 0.42	Rió Hudson
Zweifel (1999)	3-18	$Y = \text{POC}/\text{DOC}$	0.05 - 0.27	Golfo de Riga, Estonia
Revilla <i>et al.</i> (2000)	10-25	$Y = \text{PB f10} / \text{PB f10 RQ1}$ O_2	0.19 - 0.79	Estuario Urdaibai, España
Toolan (2001)	11-19	$Y = \text{BV f5} / \text{BV f6} + \text{TCO}_2$	0.14 - 0.69	Bahía de Massachussets
Biddanda y Cotner (2002)	2-14	$Y = \text{PB f6} / \text{PB f6} + \text{RQ1}$ O_2	0.16 - 0.43	Lago Michigan
Lemee <i>et al.</i> (2002)	12-24	$Y = \text{PB f7} / \text{PB f7} + \text{RQ1}$ O_2	0.05 - 0.40	Mar Mediterráneo NW
Pradeep <i>et al.</i> (2002)	18-38	$Y = \text{PB f8} / \text{PB f8} + \text{RQ1}$ O_2	0.05 - 0.08	Mar Árabeto
Cajal y Maske (2003)	22	$Y = \text{POC}/\text{POC} + \text{CO}_2$	0.05 - 0.60	Ensenada, B.C
Eiler <i>et al.</i> (2003)	20	$Y = \text{Bm f9} / \text{Bm f9} + \text{CO}_2$	0.04 - 0.09	Lago Lindhurtsgolen
Teira <i>et al.</i> (2003)	24-25	$Y = \text{DOC f 11}/\text{POC f12}$	0.21 - 0.40	Giro Atlántico Norte
Jiménez (2004) este trabajo	10-26	$Y = \text{POC}/\text{POC}+\text{CO}_2$	0.23 - 0.72	Ensenada, B.C

BV = biovolumen

DOC (μ M)= Carbón orgánico disuelto medido HTCO = Combustión a alta temperatura

f1= 1.89×10^{18} cel/mol timidina producida

f2 = 1.89×10^{18} cel/mol timidina

f3 = 2.3 Kg. C/mol leucina⁻¹

f4 = 120 fg C μ m⁻³

f5 = 15 fg C cel⁻¹

f6 = 2.3 Kg. C/ mol leucina⁻¹

f7 = 1.5 Kg. C /mol leucina⁻¹

f8 = 3.1 Kg. C/ mol leucina⁻¹

f9 = mb= $935V^{0.86}$

f10 = 2×10^{18} cel/mol timidina⁻¹

f11 = 1.18×10^{18} cel/mol ¹⁴C

f12 = 12 fg C-célula (mgC m⁻²)

DIC (μ M) = Concentración total de carbón inorgánico medido por un analizador infrarrojo de gas.

O2 (μ M) = cambio de la concentración de oxígeno disuelto.

POC(μ M)= Carbón orgánico particulado medido por un elemental CHN

RQ= CO2/CO2; RQ1= 1.0; RQ2= .82; RQ3= .7

Los datos de campo agrupados de 3-9°C presentaron su valor máximo de eficiencia de crecimiento a 0.26. Las siguientes agrupaciones de temperatura 10-14°C y 20-25°C presentaron la mayor dispersión de datos entre 0.003-0.72. Mientras que las agrupaciones de datos entre 15-19°C y 25-30°C, mostraron un intervalo mas reducido (0.04-0.42) figura 13a

La comparación de datos de eficiencia de crecimiento contra temperatura, con las agrupaciones de datos de campo y laboratorio, no mostraron una tendencia con respecto a la temperatura y no existió ninguna correlación entre estas variables. La literatura reportó valores de eficiencia de crecimiento en un amplio intervalo (0.03-0.79), que se mantuvo muy cercano tanto para los datos de laboratorio como para los datos de campo. (Tabla 11). De igual forma los datos de eficiencia calculados de forma más convencional contra los que se calculan a partir de isótopos radioactivos tampoco presentaron una tendencia de los datos con respecto a la temperatura. La dispersión de valores de eficiencia de crecimiento para la agrupación de temperatura de 10-30°C presentó en general un intervalo más amplio (0.02-0.79) en comparación de la agrupación de datos entre 5-9°C que mostró valores de eficiencia de crecimiento de 0.05-0.5.

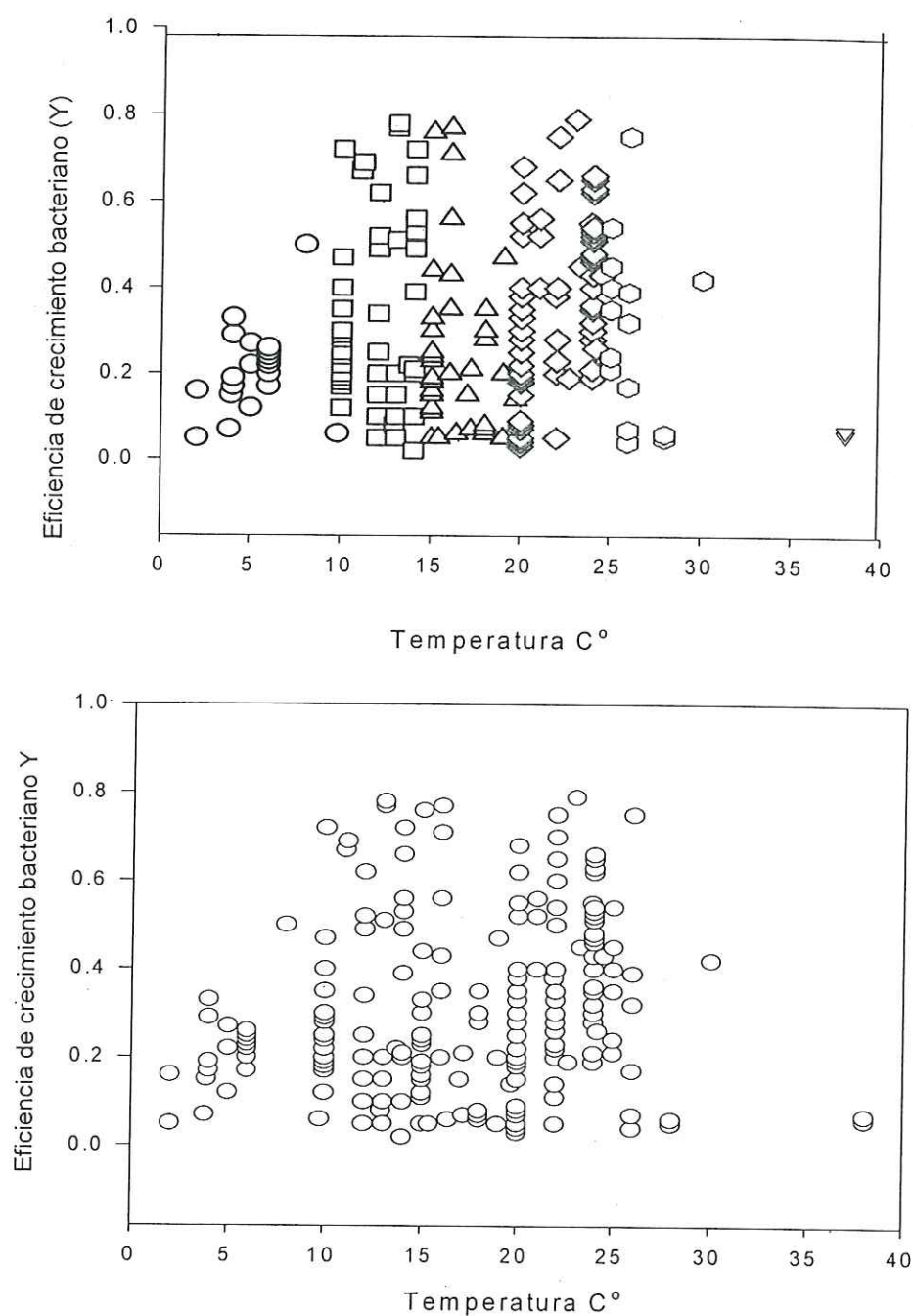


Figura 13.- Eficiencia de crecimiento reportado en publicaciones. a) Eficiencia de crecimiento agrupado por intervalos de temperatura. Los símbolos representan diferentes intervalos de temperatura (O 3-9°C; □ 10-14°C; Δ 15-19°C; ◇ 20-24°C; ⊠ 25-30°C; ▽ >30°C). b) Eficiencia de crecimiento sin agrupaciones).

Tabla 11. Intervalo de valores de eficiencia de crecimiento reportados en literatura. (L* = ^3H -leucina, ^3H -timidina; R = respiración).

Temperatura	Eficiencia de crecimiento					
	Campo	Laboratorio	Normales	L*,T*	R medida	R calculada
0-9	0.05-0.5	0.12-0.26	0.06-0.27	0.05-0.5	0.05-0.5	0.17-0.26
10-14	0.05-0.72	0.12-0.72	0.08-0.69	0.05-0.78	0.02-0.72	0.17-0.28
15-19	0.05-0.77	0.06-0.35	0.05-0.35	0.02-0.75	0.03-0.75	0.11-0.35
20-24	0.05-0.79	0.03-0.70	0.04-0.70	0.03-0.79	0.03-0.75	0.05-0.65
25-29	0.21-0.75	0.04-0.42	0.32-0.39	0.04-0.75	0.05-0.75	0.04-0.54
>30	sd	0.06-0.07	sd	0.06-0.07	0.06-0.42	sd
Prom.	0.18	0.14	0.14	0.17	0.33	0.26
Min.	0.05	0.03	0.04	0.02	0.02	0.05
Máx.	0.79	0.72	0.7	0.79	0.75	0.65

La eficiencia de crecimiento de los datos de literatura no mostró ningún patrón con el incremento de temperatura. Los valores extremos de temperatura $<5^{\circ}\text{C}$ y $>30^{\circ}\text{C}$, presentaron los valores más bajos de eficiencia de crecimiento, mientras que los del intervalo de temperatura $3-9^{\circ}\text{C}$, se encuentra con valores de crecimiento mas frecuentes de 0.27 (Figura 13 B). Los resultados obtenidos a partir de procesamiento de datos de la literatura para corroborar lo reportado por Rivkin y Legendre (2001) quienes suponen una relación empírica inversa entre la eficiencia de crecimiento y la temperatura. Con una base datos recientes y con una amplia variedad de regiones, no mostró dicha relación negativa y ninguna en particular. Con el objetivo de dar más peso a la revision y procesamiento de la base de datos, se hicieron agrupaciones considerando datos de campo y laboratorio, metodologías de obtención de biomasa y metodologías de obtención de datos de respiración. Ninguna de estas agrupaciones mostró alguna relaciones significativas. La dispersión de los valores de eficiencia de crecimiento con respecto a la temperatura, nos indica que no es posible determinar por medio de una relación tan simple, un hecho tan complejo como es la eficiencia con la cual las bacterias transforman el sustrato en carbón celular, por que ignora los principios de cinética bioquímica y alometría que predicen una relación positiva entre la temperatura y las tasas metabólicas (Gilloly *et al.*, 2001), desconociendo además la proporción relativa que es afectada por la temperatura en el catabolismo y anabolismo celular.