

**Universidad Autónoma de Baja California**

**Facultad de Ciencias Marinas  
Posgrado en Oceanografía Costera**



**T E S I S**

Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**“Respuesta de la comunidad microbiana y de los procariotas heterotróficos a la adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  en muestras naturales de la Bahía Todos Santos”**

Presenta:

**Selene Estefanía Andrade Hernández**

Ensenada, Baja California, México. Enero 2023

## Resumen

El hierro disuelto ( $\text{Fe}_d$ ) y la vitamina  $\text{B}_{12}$  son micronutrientes esenciales en el metabolismo celular de eucariotas y procariotas. Intervienen en procesos como la fotosíntesis y respiración celular. En este último proceso el  $\text{Fe}_d$  interviene en la cadena de transporte de electrones y la  $\text{B}_{12}$  en el ciclo del ácido tricarboxílico. Estudios previos han demostrado que las adiciones de estos micronutrientes incrementan la biomasa fitoplanctónica y bacteriana. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el efecto que tienen en la actividad metabólica, como la respiración celular, particularmente en ambientes costeros. Este trabajo se enfocó en generar información sobre el efecto de las adiciones de  $\text{Fe}_d$  y  $\text{B}_{12}$  en comunidades naturales microbianas de la Bahía Todos Santos (BTS), un ecosistema ubicado en el sur del Sistema de la Corriente de California. De agosto del 2020 a abril del 2021, se realizaron 7 experimentos de incubación de corta duración (oscuridad,  $18^\circ\text{C}$ , 14 – 38 hrs) de muestras naturales bajo 4 tratamientos (control, +500 pM de  $\text{B}_{12}$ , +50 nM de  $\text{Fe}_d$  y + $\text{Fe}_d$ + $\text{B}_{12}$ ). En cada experimento, se cuantificó la abundancia bacteriana (AB) por microscopia de epifluorescencia y las tasas de respiración de la comunidad ( $R_{\text{com}}$ ) y de procariotas ( $R_{\text{pro}}$ ) utilizando optodos de oxígeno. Así mismo, se determinaron variables *in situ* como la clorofila *a*, temperatura e índices de surgencia costera (Bakun y BEUTI). Se mostró que las respuestas a la adición de micronutrientes de las comunidades microbianas marinas de la BTS son dependientes de las condiciones biológicas *in situ* (abundancia bacteriana y la clorofila). Además, presentaron señales de colimitación N- $\text{Fe}_d$  en su metabolismo respiratorio mientras que los procariotas heterótrofos tuvieron una mayor respuesta a la adición de estos micronutrientes cuando se presenta limitación por nitrógeno en comparación a cuando se tenía a toda la comunidad microbiana. Este estudio demuestra la compleja dinámica microbiana por los recursos ya que se observaron diferentes procesos como depredación bacteriana, competencia por micronutrientes y la interdependencia de los procariotas con otros miembros de la comunidad microbiana marina.

**Palabras clave:** procariotas; heterotrofia; metabolismo; respiración.

## Abstract

Dissolved iron ( $\text{Fe}_d$ ) and vitamin  $\text{B}_{12}$  are essential micronutrients in the cellular metabolism of eukaryotes and prokaryotes. They are involved in processes such as photosynthesis and cellular respiration. In this last process,  $\text{Fe}_d$  is involved in the electron transport chain and  $\text{B}_{12}$  in the tricarboxylic acid cycle. Previous studies have shown that additions of these micronutrients increase phytoplankton and bacterial biomass. However, little has been studied about the effect they have on metabolic activity, such as cellular respiration, particularly in Bahía Todos Santos (BTS). This work focused on generating information on the effect of  $\text{Fe}_d$  and  $\text{B}_{12}$  additions on natural microbial communities in BTS. Seven experiments were carried out from August 2020 to April 2021 with short-term incubations (dark,  $18^\circ\text{C}$ , 14 – 38 hrs) of natural samples under 4 treatments (control, +500 pM  $\text{B}_{12}$ , +50 nM  $\text{Fe}_d$  and + $\text{Fe}_d$ + $\text{B}_{12}$ ). Bacterial abundance (AB) was quantified by epifluorescence microscopy and respiration rates of the community ( $R_{\text{com}}$ ) and prokaryotes ( $R_{\text{pro}}$ ) using oxygen optodes. Likewise, *in situ* variables such as chlorophyll a, temperature, and coastal upwelling indices (Bakun and BEUTI) were determined. It was shown that the responses to micronutrient enhancement of the BTS marine microbial communities are dependent on the biological conditions *in situ* (bacterial abundance and chlorophyll). In addition, these communities present an N- $\text{Fe}_d$  colimitation in their respiratory metabolism, while heterotrophic prokaryotes have a better response to the reduction of these micronutrients when nitrogen limitation occurs. This study demonstrates the complex microbial dynamics for resources as different processes such as bacterial predation, competition for micronutrients and the interdependence of prokaryotes with other members of the marine microbial community are observed.

**Keywords:** prokaryotes; heterotrophy; metabolism; respiration.

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**Respuesta de la comunidad microbiana y de los procariotas heterotróficos a la  
adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en muestras naturales de la Bahía Todos Santos**  
TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA:

**SELENE ESTEFANÍA ANDRADE HERNÁNDEZ**

Aprobada por:



Dr. Josué Rodolfo Villegas Mendoza

Director de Tesis



Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre

Sinodal



Dra. Laura Gómez Consarnau

Sinodal



Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa

Sinodal

## **Dedicatoria**

*A todas las personas que han estado presentes en mi vida y que me han impulsado e  
inspirado a ser una mejor persona cada día...*

## **Agradecimientos**

A mi director de tesis el Dr. Josué Villegas Mendoza por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo de Microbios Marinos y Ecología de los Florecimientos Algales Nocivos (MicMar y EcoFAN). Por permitirme desarrollar este proyecto de investigación e introducirme en el mundo de los microbios marinos.

A la Dra. Laura Gómez Consarnau por aceptar ser parte de este comité de tesis, por su disponibilidad y atenciones. Así mismo le agradezco sus valiosos comentarios y sugerencias hacia este trabajo ya que ayudaron a mejorarlo.

A la Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre por compartir con nosotros su proyecto para poder llevar a cabo este trabajo. Por ser el pilar central en el laboratorio ya que sin usted las cosas no funcionarían como lo han hecho hasta hoy. Por último, por sus comentarios y retroalimentación al trabajo que me han permitido tener un mejor escrito.

Al Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa, gracias por todas las enseñanzas que me ha dejado desde mi licenciatura hasta este trabajo, por animarme a continuar creciendo en la ciencia y por su apoyo incondicional en todos estos años. Gracias por su colaboración con los datos proporcionados y por las aportaciones y correcciones a este trabajo.

A mis viejos amigos Karely, Ricardo y en especial Tuky porque, aunque estemos lejos siempre están presentes en mis mejores y peores momentos. A mis amigas de carrera y vida Diana, Isabella, Isabela, Citlalli y Mariana por siempre estar presentes en cada momento importante. A mis roomies favoritas Damaris e Isabela por todas esas noches

de películas y chismes que me reinician la vida y por todo su apoyo en todos los momentos tan difíciles que les toco pasar junto a mí, las amo.

A mi hermana Andrea porque a pesar de la distancia siempre te siento muy cerca de mí. Por nunca dudar de mi y de lo que puedo lograr y siempre estar incondicionalmente cuando necesito de ti. Eres la mejor hermana que podría tener y me siento muy feliz de compartir un logro mas contigo.

A mi abuelita Lupita porque, aunque ya no estas conmigo cada logro de mi vida te lo dedico a ti por que gracias a ti soy quien soy. Siempre estarás en mi corazón y agradeceré cada uno de los días que tuve la oportunidad de estar alado de la mujer más noble y maravillosa.

A mi compañero de vida, Aaron, por apoyarme en todas mis decisiones y por ayudarme a lograr todo lo que me propongo. Por siempre estar presente en los mejores y peores momentos. Has sido mi apoyo incondicional tanto en mi vida personal como en la académica y siempre me impulsas a ser una mejor persona.

A todas las personas que directa e indirectamente estuvieron involucradas en este proyecto. A M.C Mauricio Reyes, M.C Ludwinka Méndez, M.C Ricardo Mendieta y M.C Humberto Alonso por su apoyo con la colecta de muestras de agua de mar. A la M.C Vanessa Torres Delgado y el MC. Ricardo Aaron Gutiérrez por la ayuda con la extracción de datos de hierro disuelto y clorofila a.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>5</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>13</b>
<b>2. Antecedentes.</b>	<b>16</b>
2.1 Importancia de los microorganismos en el ambiente marino. ....	16
2.2 Disponibilidad de Fe <sub>d</sub> .....	17
2.3 Disponibilidad de vitamina B <sub>12</sub> .....	18
2.4 Relación del Fe <sub>d</sub> y la B <sub>12</sub> con el metabolismo celular.....	20
<b>3. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivos particulares .....	23
<b>5. Justificación</b>	<b>24</b>
<b>6. Metodología</b>	<b>25</b>
6.1 Área de estudio .....	25
6.2 Estación de muestreo y recolecta de agua de mar. ....	26
.....	27
6.3 Cuantificación de la respiración de procariontes heterotróficos y de la comunidad microbiana. ....	28
6.4 Abundancia bacteriana y eficiencia de crecimiento bacteriana .....	31
6.5 Cuantificación de clorofila a.....	32
6.6 Análisis de Fe <sub>d</sub> .....	33
6.6 Índices de surgencia costera .....	34
6.7 Análisis estadístico .....	35

<b>7. Resultados</b>	<b>36</b>
7.1 Condiciones ambientales <i>in situ</i> de abundancia bacteriana, índices de surgencia costera y Fe <sub>d</sub> .....	36
7.2 Respuesta de la respiración celular de la comunidad microbiana y procariontas heterótrofos a la adición de Fe <sub>d</sub> y B <sub>12</sub> .....	41
7.3 Tiempo de inicio de la respiración de la comunidad microbiana y procariontas heterótrofos con la adición de Fe <sub>d</sub> y B <sub>12</sub> . ....	44
7.4 Cambios en la abundancia bacteriana en incubaciones de comunidades microbianas y procariontas heterotróficos con la adición de Fe <sub>d</sub> y B <sub>12</sub> . ....	46
7.5 Cambio de la abundancia bacteriana a lo largo del tiempo en incubaciones de comunidades microbianas y procariontas heterotróficos con la adición de Fe <sub>d</sub> y vitamina B <sub>12</sub> . ....	49
<b>8. Discusión</b>	<b>51</b>
8.1 Variables metabólicas <i>in situ</i> en la Bahía de Todos Santos.....	51
8.2 Variabilidad temporal de las respuestas metabólicas a la adición de Fe <sub>d</sub> y/o vitamina B <sub>12</sub> .....	57
8.3 Respuestas metabólicas a la adición de Fe <sub>d</sub> y/o vitamina B <sub>12</sub> y su relación con las variables ambientales <i>in situ</i> . ....	63
8.4 Cinética de crecimiento: depredación bacteriana, competencia por nutrientes y limitación por sustrato orgánico. ....	67
<b>9. Recomendaciones para futuras investigaciones</b>	<b>71</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>72</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>74</b>
<b>12. Material complementario</b>	<b>90</b>
Toxicidad celular por reactivo de múltiples elementos .....	90

## Índice de figuras

- Fig. 1.** Esquema general del proceso de respiración aeróbica donde se muestra en recuadros rojos la participación de la vitamina B<sub>12</sub> y en recuadros verdes la participación del hierro disuelto (Fe<sub>d</sub>). \_\_\_\_\_ **14**
- Fig. 2.** Mapa de ubicación. El punto rojo hace referencia a la estación en la cual se realizó la colecta de muestras que se encuentra en las coordenadas 31° 49.31' N y 116°44.36' O \_\_\_\_\_ **27**
- Fig. 3.** Condiciones *in situ* de (A) índice de surgencia de Bakun 1975 y BEUTI, (B) Fe<sub>d</sub> y (C) abundancia bacteriana. Los índices de surgencia costera representan la media de 3 días. \_\_\_\_\_ **39**
- Fig. 4.** Respiración celular *in situ* de procariotas heterotróficos (A) y de la comunidad microbiana (B) en muestras colectadas en la Bahía de Todos Santos en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021. \_\_\_\_\_ **40**
- Fig. 5.** Tasas de respiración celular de (A) procariotas heterótrofos y de la (B) comunidad microbiana bajo tres diferentes tratamientos de adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en la BTS durante el periodo de agosto del 2020 a abril 2021. \_\_\_\_\_ **43**
- Fig. 6.** Tiempo de activación de las tasas respiratorias bajo cuatro diferentes tratamientos en la BTS durante el periodo de agosto del 2020 a abril 2021 en: (A) incubaciones de procariotas heterótrofos y (B) incubaciones de la comunidad microbiana. \_\_\_\_\_ **45**
- Fig. 7.** Abundancia bacteriana de los experimentos de incubación bajo cuatro diferentes tratamientos durante el periodo de octubre del 2020 a abril 2021 en: (A) procariotas heterótrofos y (B) comunidad microbiana. \_\_\_\_\_ **48**
- Fig. 8.** Cambios en la abundancia bacteriana con respecto al tiempo durante el experimento de abril del 2021 en la BTS bajo cuatro diferentes tratamientos en: A) incubaciones de procariotas heterótrofos y B) incubaciones de la comunidad microbiana. \_\_\_\_\_ **50**
- Fig. 9** Respiración procariota (R<sub>pro</sub>) de la estación costera Flucar medida en octubre del 2015 reportada por Villegas-Mendoza et al., 2017, comparada con el promedio reportado en este estudio (BTS-Promedio) y el valor registrado para octubre del 2020 (BTS-Oct20). \_\_\_\_\_ **56**

**Fig. 10** Respiración de la comunidad microbiana ( $R_{com}$ ) de las estaciones Flucar y Antares comparadas con el promedio reportado en este estudio (BTS-Promedio). \_\_\_\_\_ **56**

**Fig. 11.** Eficiencia de crecimiento bacteriano (BGE) calculado a partir de un factor de 20 fgC Cel (Bell, 2018) en: (A) procariotas heterótrofos y (B) comunidad microbiana. \_\_ **62**

**Fig. 12.** Relación entre los incrementos con respecto al control de: A) respiración celular ( $R_{pro}$ ) y B) abundancia bacteriana ( $AB_{pro}$ ) en incubaciones de procariotas heterótrofos bajo la adición de hierro disuelto ( $Fe_d$ ) con la abundancia bacteriana *in situ*, presentando una correlación de Pearson estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) \_\_\_\_\_ **65**

**Fig. 13.** Relación entre los incrementos de la abundancia bacteriana en incubaciones de la comunidad microbiana ( $AB_{com}$ ) bajo la adición de hierro disuelto ( $Fe_d$ ) y la abundancia bacteriana *in situ*, presentando una correlación de Pearson estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ). \_\_\_\_\_ **66**

## Índice de tablas

- Tabla I.** Se aplicaron 4 diferentes tratamientos que consisten en tratamiento control (sin adición de nutrientes), tratamiento con  $Fe_d$  (+ $Fe_d$ ), tratamiento con vitamina  $B_{12}$  (+ $B_{12}$ ) y tratamiento compuesto de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  (+ $Fe_d+B_{12}$ ) en los meses de agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021 en muestras naturales de la Bahía de Todos Santos (BTS). \_\_\_\_\_ **29**
- Tabla II.** Variables físicas y químicas in situ durante la colecta de agua para los experimentos de adición con  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  disuelta ( $B_{12d}$ ) en la BTS en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021 . \_\_\_\_\_ **37**
- Tabla III.** Variables biológicas in situ de los experimentos de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  disuelta ( $B_{12d}$ ) en la BTS en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021. \_\_\_\_\_ **38**
- Tabla IV.** Resumen de la respuesta temporal de la respiración celular en ambos tipos de incubación (procariotas heterotróficos y comunidad microbiana) con las adiciones de  $Fe_d$  y  $B_{12}$ . \_\_\_\_\_ **42**
- Tabla V.** Resumen de la respuesta temporal de la abundancia bacteriana en ambos tipos de incubación (procariotas heterotróficos y comunidad microbiana) con las adiciones de  $Fe_d$  y  $B_{12}$ . \_\_\_\_\_ **47**
- Tabla VI.** Cuadro comparativo de los valores reportados de abundancia bacteriana por diversos estudios en las diferentes regiones del Sistema de la Corriente de California (SCC). \_\_\_\_\_ **52**
- Tabla VII.** Porcentaje de contribución de la respiración procariota ( $R_{pro}$ ) a la respiración comunitaria ( $R_{com}$ ) en los meses de agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021 en muestras naturales de la Bahía de Todos Santos (BTS). \_\_\_\_\_ **54**

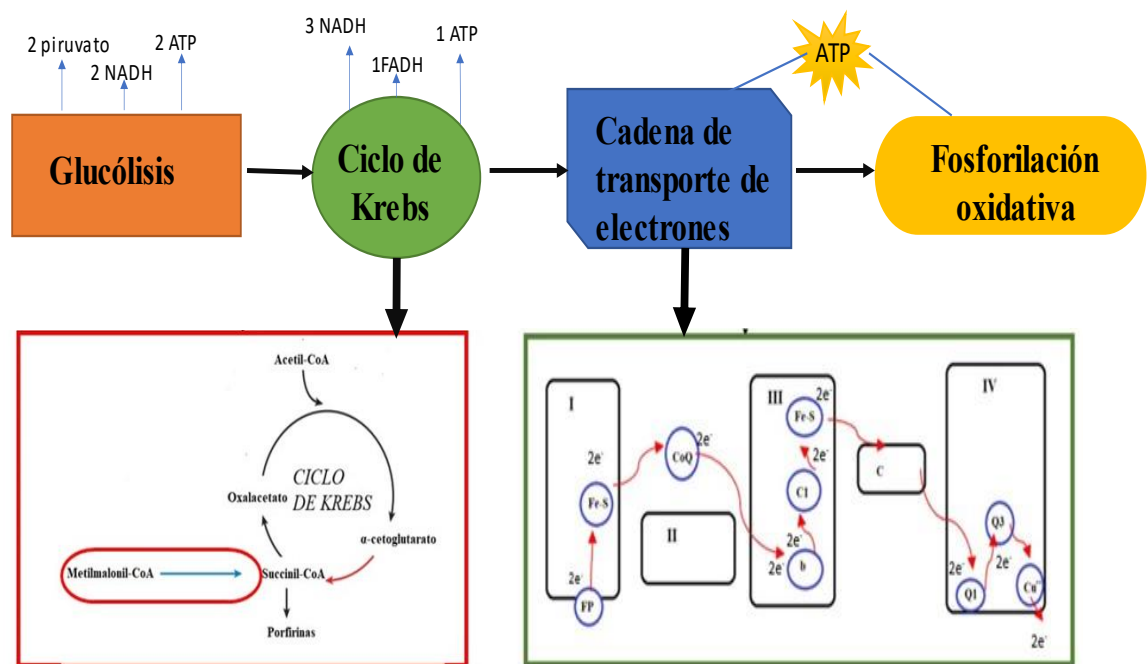
## 1. Introducción.

El hierro disuelto ( $\text{Fe}_d$ ) y la vitamina  $\text{B}_{12}$  son considerados micronutrientes limitantes para la productividad primaria marina tanto en regiones oceánicas como costeras (Barbeau, 2006; Bristow et al., 2017; Browning et al., 2018; Lauderdale et al., 2020). El  $\text{Fe}_d$  es utilizado como cofactor enzimático en procesos metabólicos tales como la fijación de nitrógeno y carbono, síntesis de porfirinas, ficobiliproteínas y clorofila (Twining y Baines, 2013). En la fotosíntesis, el  $\text{Fe}_d$  se asocia en los fotosistemas I y II como componente esencial de los citocromos (Strzepek y Harrison, 2004).

La vitamina  $\text{B}_{12}$  es una co-enzima utilizada en reacciones centrales del metabolismo tales como la transmetilación, síntesis de metionina, así como en la regulación y síntesis del ADN (Monteverde et al., 2017; Rodionov et al., 2003). En la fotosíntesis, interviene mediante la síntesis de S-adenosilmetionina que son precursores de las filoquinonas las cuales son lasceptoras de electrones (Basset et al., 2016; Sennett y Rosenberg, 1981).

El  $\text{Fe}_d$  y la vitamina  $\text{B}_{12}$  son requeridos para la respiración celular, la cual es un proceso catabólico por el cual las células obtienen energía para realizar sus funciones (Bodyale-Juez et al., 2017; Koch et al., 2011; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Tortell et al., 1996). La respiración celular aeróbica se lleva a cabo a través de una secuencia de reacciones redox mediante una cadena de transporte de electrones para la oxidación del sustrato, en donde el oxígeno ( $\text{O}_2$ ) participa como el aceptor final de electrones (Bodyale-Juez et al., 2017; Fenchel et al., 2012). En este proceso el  $\text{Fe}_d$  interviene en la cadena de

transporte de electrones (Fig. 1), siendo parte de proteínas Fe-S cuya función es catalizar los pasos de oxidación de la materia orgánica (Bodyale-Juez et al., 2017; Fenchel et al., 2012). En algunas especies como *Escherichia coli* se ha observado que el 90% del hierro intracelular se encuentra en la cadena respiratoria, siendo este su mayor sumidero (Tortell et al., 1999). Por su parte, las enzimas metionina y metilmalonil CoA dependientes de la vitamina B<sub>12</sub> son esenciales en la respiración celular, especialmente en el ciclo del ácido tricarboxílico (Fig. 1), donde desempeñan funciones importantes en la síntesis de aminoácidos y reabastecimiento de carbono (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).



**Fig. 1.** Esquema general del proceso de respiración aeróbica donde se muestra en recuadros rojos la participación de la vitamina B<sub>12</sub> y en recuadros verdes la participación del hierro disuelto (Fe<sub>d</sub>).

Diversos autores han demostrado la importancia de la relación entre el Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> tanto en fitoplancton como en las bacterias heterotróficas (Bertrand et al., 2007, 2011; Browning et al., 2018; Koch et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de los experimentos se han llevado a cabo mediante estudios monoespecíficos o en regiones de alto contenido de nutrientes y baja clorofila HNLC (Bozzato et al., 2021; Fourquez et al., 2014, 2015; Kirchman et al., 2003). Hasta el momento no se tienen estudios que evalúen la respuesta de las adiciones de estos micronutrientes en comunidades microbianas marinas naturales. En consecuencia, se desconoce el efecto de las fertilizaciones naturales o antropogénicas de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en el metabolismo microbiano. Por ello, en este trabajo se pretende explicar los efectos de la adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> sobre la respiración y el crecimiento celular de la comunidad microbiana de una bahía de la porción sur del Sistema de la Corriente de California (SCC). De igual forma, analizar si las condiciones físicas, química y biológicas registradas *in situ* podrían jugar un papel importante sobre dicha respuesta metabólica.

## 2. Antecedentes.

### 2.1 Importancia de los microorganismos en el ambiente marino.

Los microorganismos son un componente esencial del ecosistema, son altamente diversos y tienen la capacidad para habitar diferentes ambientes (Jiao et al., 2010; Munn, 2019). Al conjunto de microorganismos se le conoce como comunidad microbiana, la cual esta compuestas por células tanto procariotas como eucariotas con diferentes capacidades metabólicas que permiten clasificarlos. Por ejemplo, con base en la fuente de carbono que requieren, los podemos clasificar como autótrofos, ya que pueden utilizar  $\text{CO}_2$  y transformarlo en compuestos orgánicos, y como heterótrofos que usan esos compuestos orgánicos sintetizados por los autótrofos (Munn, 2019).

Las comunidades microbianas marinas tienen un papel importante en el ciclo del carbono global. Son los principales protagonistas de la "bomba biológica del carbono", es decir del proceso de fijación de carbono inorgánico en materia orgánica durante la fotosíntesis y el transporte descendente de carbono orgánico particulado a las profundidades marinas (Ducklow et al., 2001; Herndl y Reinthaler, 2013). Además, se ha estimado que aproximadamente la mitad de la producción primaria neta en el océano ( $50 \text{ Pg de C año}^{-1}$ ) es transformada a materia orgánica disuelta (MOD) por procariotas heterotróficos (Calleja et al., 2018; Hansell y Carlson, 2014; Lalli y Parsons, 1997). La transformación del DOM se puede llevar a cabo a través de diversas rutas:

1. Transformación a su fracción particulada (materia orgánica particulada (MOP)).

2. Transferencia a niveles tróficos superiores en un circuito microbiano de bacterias-flagelados-microzooplancton conocido como lazo microbiano (Azam et al., 1983).
3. Producción de compuestos MOD recalcitrantes a través de la bomba microbiana del carbono (Hansell y Carlson, 2014).
4. Remineralización de MOD a sus constituyentes inorgánicos mediante el proceso de respiración celular (Hansell y Carlson, 2014; Lalli y Parsons, 1997).

Para llevar estas y otras funciones vitales, los microorganismos necesitan de nutrientes como el nitrógeno, carbono, fósforo, entre otros (Kirchman et al., 1994; Munn et al., 2019) pero también de micronutrientes como el  $Fe_d$  y la vitamina  $B_{12}$  (Koch et al., 2011; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014; Tortell et al., 1996).

## **2.2 Disponibilidad de $Fe_d$ .**

Las concentraciones de  $Fe_d$  en el océano están determinadas por sus fuentes y sumideros donde las escorrentías de ríos, el transporte atmosférico, las ventilas hidrotermales, los flujos de agua subterránea y la difusión desde los sedimentos, son las principales fuentes. Mientras que los principales sumideros son la adsorción a las partículas (scavenging) y la incorporación en el material biogénico (Libes, 2009).

El  $Fe_d$  se presenta en el agua de mar en dos principales estados de oxidación:  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  (Liu y Millero, 2002). Los productores primarios absorben preferentemente el  $Fe^{2+}$  (Gao et al., 2021). Sin embargo, debido a su baja solubilidad a  $\sim$ pH 8 se encuentra en concentraciones extremadamente bajas (Munn et al., 2019). Por lo que su captación biológica provoca un rápido agotamiento en las aguas superficiales (Barbeau, 2006;

Martin y Gordon, 1988; Twining y Baines, 2013). Por lo tanto, los organismos han tenido que desarrollar una variedad de mecanismos para hacer que estas formas de hierro estén biodisponibles (Gao et al., 2021) que van desde la producción de sideróforos hasta la utilización de enzimas como la ferriductasa (Munn et al., 2019).

En la Bahía Todos Santos (BTS) se han reportado concentraciones promedio de  $Fe_d$  de  $4.0 \pm 0.17$  nM, con mayores concentraciones en el interior y menores en el exterior de la bahía (Félix-Bermúdez, 2018). De igual forma, Sañudo y Flegal (1991) reportaron valores superficiales en una zona dentro de la BTS (Punta Banda) de 7.1 nM cercano a la costa y 0.32 nM a 15 km de la costa. El único estudio de variabilidad temporal de  $Fe_d$  que se ha realizado es el de Félix-Bermúdez (2018) quien reportó valores con relativa poca variabilidad (0.32 a 7.1 nM) debido a las condiciones anómalamente cálidas del periodo 2014-2015. En otras bahías dentro del SCC, como es la bahía de Monterey, se ha reportado estacionalidad de las concentraciones de  $Fe_d$ , con máximos en invierno y primavera, asociado a las lluvias invernales, mientras que los mínimos se han registrado en verano por el alto consumo biológico y el limitado aporte de las fuentes de  $Fe_d$  (Elrod et al., 2008).

### **2.3 Disponibilidad de vitamina B<sub>12</sub>.**

La vitamina B<sub>12</sub> se produce exclusivamente por algunos grupos de procariotas (Martens et al., 2002; Sañudo et al., 2014), mientras que una alta proporción de los procariotas (64%) y eucariotas (>50%) pueden ser auxotróficos debido a la ausencia de vías biosintéticas (Croft et al., 2006; Gómez-Consarnau et al., 2018; Helliwell et al., 2011;

Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Por ello, las fuentes exógenas de vitamina B<sub>12</sub> al ambiente marino son de gran importancia, ya que sin ellas el crecimiento de los organismos auxotróficos se vería comprometido impactando directamente en el funcionamiento del ecosistema (Sañudo-Wilhelmy et al. 2012).

En el océano las concentraciones de la vitamina B<sub>12</sub> disuelta varían en un intervalo de subpicomolar a picomolar (Barber-Lluch et al., 2021; Koch et al. 2013; Panzeca et al. 2009; Sañudo-Wilhelmy et al. 2012). Las bajas concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> juegan un papel muy importante en la producción y estructura de la comunidad fitoplanctónica (Glober et al., 2007), por ejemplo; favoreciendo el crecimiento de organismos auxótrofos de vitamina B<sub>12</sub> como los dinoflagelados (Koch et al., 2011). No obstante, el enriquecimiento y/o agotamiento de esta vitamina se rige por la presencia de algunas especies de fitoplancton predominantes (Sañudo-Wilhelmy et al. 2012) así como por la composición general de la comunidad microbiana o de las estrechas asociaciones entre algas y bacterias (Barber-Lluch et al., 2021; Munn et al., 2019).

La BTS ha sido poco estudiada en cuanto a la distribución espacial y temporal de vitamina B<sub>12</sub>. En un estudio realizado a lo largo de la costa de Baja California se encontraron concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> disuelta (B<sub>12d</sub>) de no detectable a 30 pM y, además, una asociación entre la concentración de vitaminas B y el origen de las masas de agua (Sañudo-Wilhelmy et al., 2012). Existen dos estudios en la BTS en los cuales se reportan concentraciones de 2 a 61 pM usando una técnica de HPLC (Panzeca et al., 2009) y de 0.49 a 1.34 pM haciendo uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, llamado ELISA (Méndez, 2021).

## 2.4 Relación del Fe<sub>d</sub> y la B<sub>12</sub> con el metabolismo celular.

La relación entre el Fe<sub>d</sub> y la vitamina B<sub>12</sub> es compleja. El Fe<sub>d</sub> es un micronutriente limitante para el crecimiento bacteriano, por lo cual su disponibilidad tiene implicaciones en las tasas de producción de vitamina B<sub>12</sub>. Debido a esto, cuando la disponibilidad de Fe<sub>d</sub> es baja, la absorción de vitamina B<sub>12</sub> por las bacterias puede aumentar (Bertrand et al. 2011); mientras que, si la disponibilidad de vitamina B<sub>12</sub> aumenta, el requerimiento de Fe<sub>d</sub> sería más bajo (King et al. 2011). Este hecho presenta la posibilidad de que durante un evento de fertilización de Fe<sub>d</sub> (ya sea natural o artificial) la producción de vitamina B<sub>12</sub> pueda aumentar y la demanda de vitamina B<sub>12</sub> bacteriana pueda disminuir, lo que da como resultado una mayor disponibilidad de B<sub>12</sub> para los organismos auxótrofos (Bertrand et al. 2011). Así, estas conexiones plantean la posibilidad de una forma de colimitación entre estos dos nutrientes, en la que la capacidad de absorber uno de los nutrientes puede depender de la disponibilidad del otro nutriente (Moore et al., 2013).

Estudios previos ha demostrado experimentalmente que las adiciones combinadas de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> estimulan el metabolismo celular. Ejemplo de ello es el incremento de la biomasa fitoplanctónica (Bertrand et al., 2007; Browning et al., 2018) así como de la abundancia bacteriana y las tasas de crecimiento de bacterias heterotróficas y de cianobacterias (Bertrand et al., 2011; Baltar et al., 2018; Fourquez et al., 2015; Joglar et al., 2020; Koch et al., 2011). Igualmente, se ha documentado que la adición de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> genera un aumento en las tasas de respiración de la diatomea *Chaetoceros cf. simplex*

(Bozzato et al., 2021) y de bacterias heterotróficas como *Alteromonas macleodii* (Fourquez et al., 2014).

Se ha descrito que en ciertas áreas de la región transicional de la porción sur del SCC se pueden encontrar condiciones de limitación por  $Fe_d$  (Biller y Bruland, 2014; King y Barbeau, 2011). Sin embargo, dentro de la BTS las concentraciones de  $Fe_d$  se encuentran entre 0.32 a 7.1 nM (Félix-Bermúdez, 2018) las cuales son mayores que en otras regiones dentro de la influencia del SCC consideradas limitadas por este micronutriente (0.3 a 4.1 nM cercano a la costa y <0.1 nM a 0.5 alejando de la costa; Biller y Bruland, 2014). Adicionalmente, en experimentos con muestras de agua de mar de la BTS (filtradas por 200  $\mu$ m) enriquecidas con 48 y 10 nM de  $Fe_d$  (en otoño y primavera respectivamente), no se encontró un cambio en la concentración de clorofila con la adición de este micronutriente (Félix-Bermúdez, 2018). Sin embargo, hasta el momento, no se ha abordado la respuesta metabólica que pueden tener los procariotas heterótrofos a la adición de  $Fe_d$  y/o  $B_{12}$ , así como en la comunidad microbiana marina, por ejemplo, sobre la respiración celular aeróbica.

### 3. Hipótesis

Las adiciones de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en muestras naturales de la Bahía Todos Santos, favorecen la respiración y el crecimiento bacteriano. La magnitud de la respuesta es dependiente de las condiciones ambientales físicas (temperatura y condiciones de surgencia), químicas (concentración *in situ* de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub>) y biológicas (clorofila a y abundancia bacteriana).

## 4. Objetivo general

Evaluar experimentalmente el efecto de las adiciones de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  sobre el metabolismo celular de muestras naturales de procariotas heterotróficos y de la comunidad microbiana marina de la Bahía Todos Santos bajo condiciones de surgencia moderada.

### 4.1 Objetivos particulares

- Cuantificación de las tasas respiratorias de procariotas marinos heterotróficos de muestras naturales de la Bahía Todos Santos bajo condiciones de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ .
- Cuantificación de las tasas respiratorias de la comunidad microbiana marina de muestras naturales de la Bahía Todos Santos bajo condiciones de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ .
- Cuantificación de la abundancia bacteriana de muestras naturales de la Bahía Todos Santos bajo condiciones de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ .
- Relación de los índices de surgencia costeros con las tasas de respiración de la comunidad microbiana marina y de procariotas marinos heterotróficos, así como con la abundancia bacteriana de muestras naturales de la Bahía Todos Santos bajo condiciones de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ .

## 5. Justificación

Varios estudios han mostrado que la adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> favorece el incremento de la abundancia bacteriana (Baltar et al., 2018; Bertrand et al., 2011; Joglar et al., 2020; Kirchman et al., 2000) y el metabolismo respiratorio (Bozzato et al., 2021; Fourquez et al., 2012, 2014; Kirchman et al., 2003). La mayoría de los estudios se han realizado en regiones HNLC o zonas oceánicas, mientras que los experimentos de respiración se centran en la respuesta a la adición de Fe<sub>d</sub> en *Alteromonas macleodii*, *Vibrio harveyi* y *Chaetoceros cf. simplex*. Sin embargo, se requiere información de la respuesta a la adición de estos micronutrientes en las comunidades microbianas de regiones costeras. Estas regiones son altamente dinámicas, diversas y su productividad es fundamental para el desarrollo de actividades económicas en el sistema marino. En este trabajo se evaluó el efecto de las adiciones de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> en el crecimiento y tasas respiratorias de procariotas heterotróficos y comunidades microbianas marinas de la BTS.

## 6. Metodología

### 6.1 Área de estudio

La BTS se encuentra ubicada en la costa oeste de Baja California y está directamente conectada con el océano Pacífico por medio de dos entradas, una que se encuentra al norte, entre San Miguel y las islas Todos Santos, y otra al sur, entre Punta Banda y las islas (Mateos et al., 2009). Tiene un área aproximada de 180 km<sup>2</sup> y una profundidad promedio de 50 m con un máximo de 400 m en el cañón submarino, ubicado entre Punta Banda y la Isla Todos Santos (Mateos et al., 2009). El clima de la región es seco de tipo mediterráneo con lluvias en los meses de noviembre a abril (Pavía y Graef, 2002).

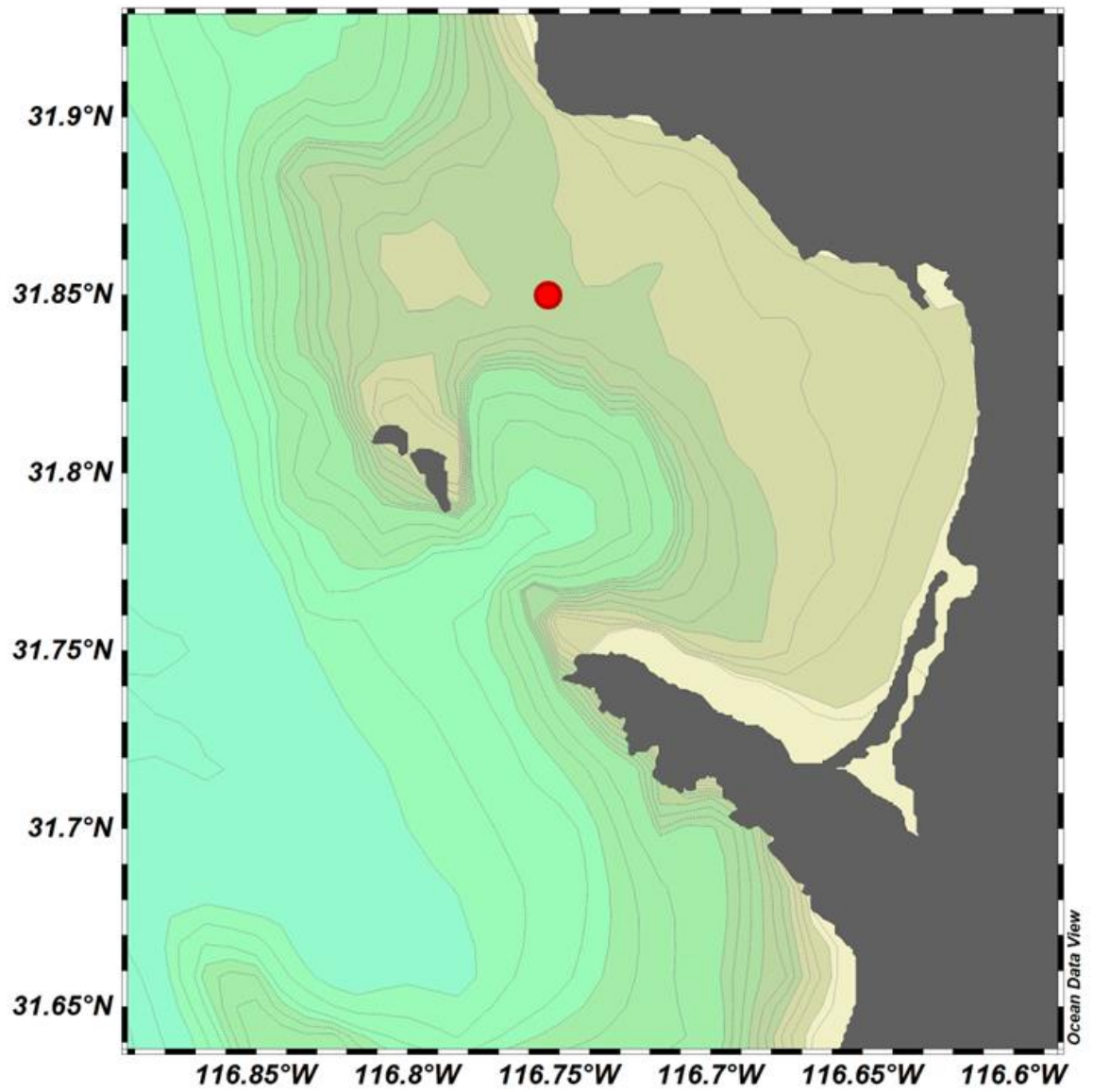
Esta bahía se encuentra al sur del SCC, el cual se distingue por la presencia de la Corriente de California, un flujo de agua hacia el sur que recorre la costa oeste de norteamérica y que transporta aguas frías, de baja salinidad y con alto contenido de oxígeno (Durazo, 2015). El SCC se considera uno de los ecosistemas más productivos del mundo, debido a las condiciones de surgencia que traen consigo un transporte activo de nutrientes (Cepeda-Morales et al., 2017). Las surgencias más intensas se presentan en épocas de primavera, mientras que en verano hay un debilitamiento de los vientos favorables para las surgencias (Cepeda-Morales et al., 2017). Este fenómeno tiene impacto importante sobre los procesos biológicos y la composición química de la bahía. Por ejemplo, Delgadillo-Hinojosa et al. (2015) reportaron que las concentraciones de clorofila a (Chla) y la relación Cd/PO<sub>4</sub> presentaron valores altos en primavera y bajos en otoño e invierno, lo cual fue atribuido a su estrecha relación con las surgencias.

Predominan los vientos del noroeste con una intensidad promedio de 4 m/s, presentando mayor variabilidad en su dirección en los meses de otoño e invierno (Castro y Martínez, 2010). Durante los meses de octubre a marzo se tiene la presencia de vientos Santa Ana, con intensidades de hasta 80 km/h. Dichos vientos son de especial importancia debido a que modifican el campo de corrientes superficiales y además favorecen la aportación de polvos al mar (Navarro-Olache et al., 2021), lo cual puede tener especial importancia en los niveles superficiales de  $Fe_d$  en el sur del SCC (Félix-Bermúdez et al., 2017).

La circulación de la BTS se encuentra caracterizada por la presencia de remolinos ciclónicos y anticiclónicos formados por la geometría en forma de U de la bahía y el desprendimiento de las corrientes en las salientes (Mateos, 2009). La presencia de remolinos promueve un mayor tiempo de residencia de agua en el interior de la BTS (Mateos et al., 2009) ocasionando que se comporte como un sistema retentivo caracterizado por una diferencia de temperatura de hasta 3°C con respecto a la zona adyacente a la bahía durante la primavera y el verano (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015).

## **6.2 Estación de muestreo y recolecta de agua de mar.**

Se colectó agua de mar en una estación ubicada en el interior de la BTS durante siete campañas oceanográficas en los meses de agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021. La estación de muestreo fue ubicada en las coordenadas 31° 49.31' N y 116°44.36' O (Fig. 2) a una profundidad de 20 metros. La colecta se realizó utilizando una botella Niskin mientras que para las muestras de  $Fe_d$  se llevó a cabo con una botella Niskin-X. Todas las muestras se mantuvieron en frío hasta su llegada al laboratorio.



**Fig. 2.** Mapa de ubicación. El punto rojo hace referencia a la estación en la cual se realizo la colecta de muestras que se encuentra en las coordenadas 31° 49.31' N y 116°44.36' O.

### **6.3 Cuantificación de la respiración de procariontas heterotróficos y de la comunidad microbiana.**

Para cuantificar las tasas de respiración de procariontas heterotróficos y de la comunidad microbiana, así como el efecto de las adiciones de  $\text{Fe}_d$  y vitamina  $\text{B}_{12}$ , se realizaron incubaciones en oscuridad con temperatura controlada ( $18.2 \pm 0.34^\circ\text{C}$ ). La cuantificación de la respiración de procariontas heterotróficos requirió que las muestras se filtraran con filtros de fibra de vidrio GF/F (tamaño nominal de poro:  $0.7 \mu\text{m}$ ) mientras que la de la comunidad microbiana se incubó sin filtrar. Las incubaciones se realizaron en botellas DBO de 120 mL, las cuales se esterilizaron previamente con peróxido de hidrógeno al 2% por 24 horas. El diseño experimental consideró 4 diferentes tratamientos (los cuales se realizaron por triplicado), incluyendo un control (muestra natural), la adición de  $\text{Fe}_d$  o vitamina  $\text{B}_{12}$  y la adición de  $\text{Fe}_d$  más vitamina  $\text{B}_{12}$  (Tabla I). La adición de los diferentes tratamientos se llevó a cabo en campo estéril para evitar su contaminación, y se dejó que se alcanzara el equilibrio térmico. Se tomaron mediciones de oxígeno cada hora (mínimo de 12 horas) empleando una técnica de optodos y haciendo uso del equipo PreSens Fixbox 4 trace. El instrumento está equipado con un polímero de fibra óptica y posee parches sensibles al oxígeno (SP-PSt6-NAU, PreSens, Germany) instalados al interior de las botellas BOD. El límite de detección del método es de 15 ppb de oxígeno disuelto.

Para calcular las tasas de respiración celular se realizó un gráfico de dispersión donde el eje X representó el tiempo y el eje Y la concentración de  $\text{O}_2$  en la muestra, generando una curva. Se tomó la parte lineal de dicha curva, es decir, donde el  $\text{O}_2$  de la

muestra comenzó a decrementar linealmente y se calculó la pendiente de la recta, la cual representa la tasa de consumo de oxígeno. Así mismo, se consideró como el tiempo de inicio del del metabolismo, a la primera lectura que correspondió al inicio de la línea recta.

**Tabla I.** Se aplicaron 4 diferentes tratamientos que consisten en tratamiento control (sin adición de nutrientes), tratamiento con Fe<sub>d</sub> (+Fe<sub>d</sub>), tratamiento con vitamina B<sub>12</sub> (+B<sub>12</sub>) y tratamiento compuesto de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> (+Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub>) en los meses de agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021 en muestras naturales de la Bahía de Todos Santos (BTS).

Mes	Tratamiento	Nutriente Incluido	Concentración natural*	Adición*	Concentración final*
Agosto	Control	-	-	-	-
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>	1.31	74x10 <sup>3</sup>	74x10 <sup>3</sup>
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	1.76	10.25	12.01
		B <sub>12</sub>	1.31	74x10 <sup>3</sup>	74x10 <sup>3</sup>
Septiembre	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>	0.94	74x10 <sup>3</sup>	74x10 <sup>3</sup>
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	6.41	10.25	16.66
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	6.41	10.25	16.66
		B <sub>12</sub>	0.94	74x10 <sup>3</sup>	74x10 <sup>3</sup>
Octubre	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>	1.24	500	501.24
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.69	50	52.69
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.69	50	52.69
		B <sub>12</sub>	1.24	500	501.24

Noviembre	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>	2.08	500	502.08
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.66	50	52.66
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.66	50	52.66
		B <sub>12</sub>	2.08	500	502.08
Febrero	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>		500	
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.30	50	52.30
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	2.30	50	52.30
		B <sub>12</sub>		500	
Marzo	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>		500	
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	1.18	50	51.18
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	1.18	50	51.18
		B <sub>12</sub>		500	
Abril	Control	-			
	B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>		500	
	Fe <sub>d</sub>	FeCl <sub>3</sub>	1.69	50	51.69
	Fe <sub>d</sub> +B <sub>12</sub>	FeCl <sub>3</sub>	1.69	50	51.69
		B <sub>12</sub>		500	

\*Las concentraciones expresadas en esta tabla se encuentran en unidades de pM para la B<sub>12</sub> y nM para el FeCl<sub>3</sub>.

## 6.4 Abundancia bacteriana y eficiencia de crecimiento bacteriana

Se colectaron muestras (10 mL) al inicio y término de todas las incubaciones, las cuales fueron preservadas con una concentración final del 2% de formaldehído y almacenadas a 5°C. Para cuantificar los procariotas presentes en las incubaciones de la comunidad se filtraron las muestras (con un filtro GF/F) antes de ser preservadas.

En la muestra colectada en el mes de abril del 2021 se evaluó el crecimiento celular bacteriano para todos los tratamientos mediante la cuantificación de la abundancia bacteriana de manera continua, durante un intervalo de tiempo de 23.6 horas.

El análisis de la abundancia bacteriana se realizó mediante la metodología propuesta por Porter y Feig (1980), este método de microscopia de epifluorescencia utiliza como colorante fluorescente el 4-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para la cuantificación se tomó 1 mL de muestra y se agregó 10 µL de DAPI incubando por 10 minutos en oscuridad, enseguida se filtró con un filtro de policarbonato negro con un tamaño de poro de 0.2 µm. Posteriormente, el filtro fue montado en un portaobjetos y se agregó una gota de aceite de inmersión teniendo cuidado de evitar burbujas de aire al momento de colocar el cubreobjetos. Para su lectura se utilizó un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss equipado con un objetivo de 100 x y una lámpara de mercurio (Zeiss mbq 52 ac). Se contaron aproximadamente 30 campos al azar hasta llegar a un total de 300 células y se empleó la siguiente fórmula para calcular la abundancia bacteriana:

$$Cel\ mL^{-1} = \frac{(PCM * F)}{V}$$

*Dónde:*

*PCM* = el promedio de células por campo en la muestra.

*F* = coeficiente entre el área superficial del filtro y el área de la cuadrícula de conteo.

*V*= volumen de muestra filtrado.

Con la finalidad de calcular la cantidad de carbono demandado para la producción bacteriana se estimó la eficiencia de crecimiento bacteriana (BGE) utilizando la ecuación propuesta por Dolan, 2018 considerando un factor de conversión de 20 fgC Cel (Bell, 2018):

$$BGE = \frac{PB}{PB + Rpro}$$

*Dónde:*

*PB*=producción bacteriana (*tasa de crecimiento celular por la biomasa bacteriana*)

*Rpro*=tasa de respiración procariota

## **6.5 Cuantificación de clorofila a**

Para evaluar la biomasa fitoplanctónica se utilizó como proxy la clorofila a. En cada uno de los meses de experimentación se filtró aproximadamente 1 litro de muestra de agua de mar. Para determinar la biomasa de células > 0.7 µm la filtración se realizó con ayuda de un filtro GF/F, mientras que, para células > 5 µm se utilizaron filtros de membrana de policarbonato. Los filtros se almacenaron en un portafiltros a -20°C en oscuridad hasta su análisis. Posteriormente, los pigmentos fotosintéticos de los filtros fueron extraídos con acetona al 90% por 24 horas manteniéndolos en fresco y total oscuridad y se cuantificó con un espectrofotómetro Cary-50 UV-visible. Las células >0.7 µm corresponden a la

biomasa total de fitoplancton y las  $>5 \mu\text{m}$  a las células grandes. La diferencia entre ambas representa las células pequeñas que están entre  $0.7$  y  $5 \mu\text{m}$ .

## 6.6 Análisis de $\text{Fe}_d$

En la recolecta y análisis de  $\text{Fe}_d$  se utilizaron materiales de polietileno de baja densidad y teflón para prevenir cualquier problema de contaminación de los recipientes contenedores. Estos materiales pasaron por un proceso de limpieza riguroso que consiste en lavar y mantener con jabón Micro-90<sup>®</sup> al 3% durante una semana. Al término de ese período se colocó en un contenedor con HCl grado reactivo al 1.2 M, donde permaneció por un mes. Es importante mencionar que entre cada paso se realizó enjuagues con agua destilada y/o desionizada ( $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) y al final se dejó secar en una campana de flujo laminar.

Con el objetivo de obtener la fracción disuelta, las muestras de agua de mar fueron filtradas a través de filtros de policarbonato Nuclepore con un diámetro de  $47 \text{ mm}$  y un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ , mediante un sistema de filtrado compuesto por conos de polisulfona y una bomba de vacío. El agua de mar filtrada se almacenó en botellas de polietileno de baja densidad y fue acidificada a un  $\text{pH} < 2$  con  $\text{HNO}_3$  ultrex.

Los análisis de  $\text{Fe}_d$  se llevaron a cabo empleando una modificación a la metodología de extracción orgánica (Bruland et al., 1979, Félix-Bermúdez et al., 2020). Se utilizaron los quelantes orgánicos APDC y DDDC, embudos de teflón y todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de atmósfera positiva en una campana de flujo laminar clase-100. Se colocaron aproximadamente  $250 \text{ g}$  de la muestra de agua de mar en un

embudo de separación; con HNO<sub>3</sub> ultrex concentrado se llevó a un pH de aproximadamente 4 - 4.5 y acetato de amonio grado ultrex como amortiguador para mantener fijo el valor de pH. Se agregó 1 mL de una solución de APDC/DDDC al 1% como agente quelante. Después se realizó una doble extracción del complejo orgánico en cloroformo grado HPLC. Finalmente, se realizó la retro-extracción del metal, adicionando 100 µL de HNO<sub>3</sub> Ultrex y 3 mL de agua desionizada al cloroformo recuperado anteriormente (Félix-Bermúdez, 2018). Los extractos se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (Agilent Spectra AA 880Z) con corrección de fondo zeeman. La cuantificación de Fe se realizó empleando el método de adición de estándares para eliminar las interferencias de la matriz. La exactitud y precisión se evaluó haciendo uso de un material de referencia NASS-7 y se obtuvo un porcentaje de recuperación del 99.7% ± 2.1%.

## 6.6 Índices de surgencia costera

Los índices de surgencia costera Bakun y el índice de transporte biológicamente efectivo (BEUTI; por sus siglas en ingles “Biologically Effective Upwelling Transport Index”) fueron obtenidos del Pacific Fisheries Environmental Laboratory (<https://oceanview.pfeg.noaa.gov>). Se promediaron los datos de las latitudes 30 y 33° N debido a que nuestra estación de estudio se encuentra en la latitud de 31.5° N. Los índices reportados en este trabajo corresponden al promedio de tres días (el día de muestreo más dos días anteriores).

## **6.7 Análisis estadístico**

Se realizó un diseño factorial  $2^2$  con el cual estudiamos el efecto de dos factores ( $Fe_d$  y  $B_{12}$ ) considerando dos niveles (con adición y sin adición). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de comprobar que los efectos de la adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  contribuyen a explicar el comportamiento de la respiración y la abundancia bacteriana. Todo el análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.I

## 7. Resultados

### 7.1 Condiciones ambientales *in situ* de abundancia bacteriana, índices de surgencia costera y Fe<sub>d</sub>.

Las condiciones *in situ* de abundancia bacteriana, índices de surgencia costera (Bakun y BEUTI) así como las concentraciones de Fe<sub>d</sub> en los muestreos realizados en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021 variaron temporalmente (Tabla II y III). El índice de surgencia de Bakun fluctuó entre 17.83 y 163.50 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> por 100 m de costa, mientras que el BEUTI presentó valores de -0.05 a 5.86 mmol m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Como se observa en la Fig. 3A en ambos índices de surgencia los valores más altos se encontraron en marzo del 2021 y los más bajos en noviembre del 2020.

La abundancia bacteriana *in situ* fue de 1.18x10<sup>4</sup> a 2.63x10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup> (1.10x10<sup>5</sup>, en promedio) con los valores más altos en agosto del 2020 y los menores en noviembre del 2020, respectivamente. Por su parte la concentración promedio de Fe<sub>d</sub> durante los meses de estudio fue de 2.67±1.61 nM, donde las concentraciones más bajas fueron 1.18 y 1.69 nM (en marzo y abril del 2021, respectivamente), mientras que los valores más altos fueron registrados en el mes de septiembre del 2020 (6.41 nM) y octubre del 2020 (2.69 nM).

En cuanto a la respiración celular esta fue dividida en dos: respiración procariota (R<sub>pro</sub>) y respiración de la comunidad microbiana (R<sub>com</sub>). La R<sub>pro</sub> (Fig. 4A) presentó un intervalo de 0.16 a 1.49 μM O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> con un promedio de 0.74±0.48 μM O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> con valores máximos en septiembre del 2020 y mínimos en noviembre del 2020. Así mismo, la R<sub>com</sub>

(Fig. 4B) fue de 0.30 a 1.64  $\mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  con un promedio de  $0.73 \pm 0.47 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  siendo mayores en febrero del 2021 y menores en octubre del 2020.

**Tabla II.** Variables físicas y químicas *in situ* durante la colecta de agua para los experimentos de adición con  $\text{Fe}_d$  y vitamina  $\text{B}_{12}$  disuelta ( $\text{B}_{12d}$ ) en la BTS en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021 .

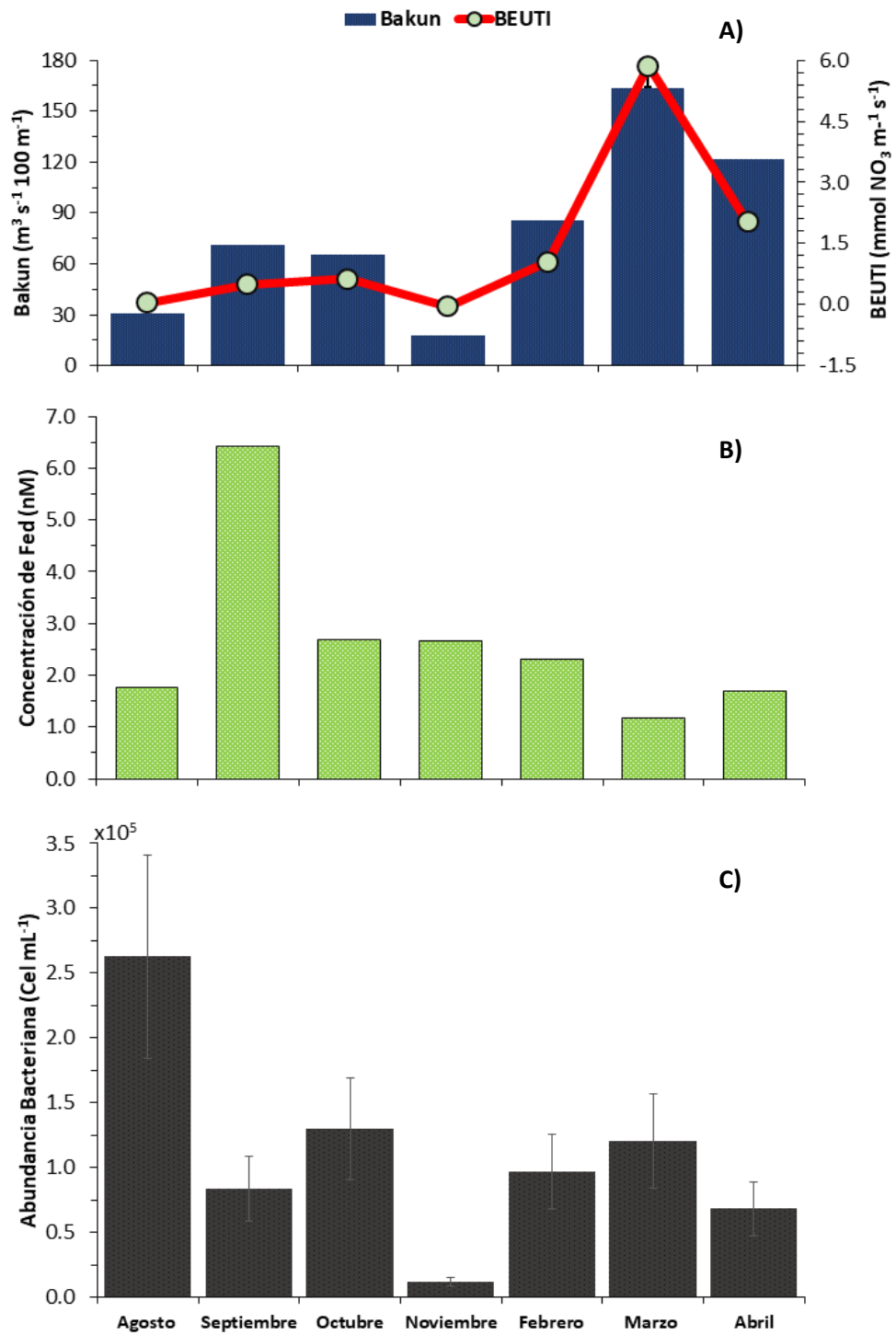
Fecha de muestreo	Indice de Bakun ( $\text{m}^3\text{s}^{-1}100 \text{ m}^{-1}$ )	BEUTI ( $\text{mmol m}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C m}^{-1}$ )**	$\text{B}_{12d}$ ( $\mu\text{M}$ )*	$\text{Fe}_d$ ( $\text{nM}$ )
24 de agosto del 2020	30.50	0.04	17.9	1.31	1.76
24 de septiembre del 2020	71.17	0.50	15.4	0.94	6.41
22 de octubre del 2020	65.67	0.64	16.2	1.24	2.69
18 de noviembre del 2020	17.83	-0.05	15.5	2.08	2.66
11 de febrero del 2021	85.33	1.06	13.9		2.30
24 de marzo del 2021	163.50	5.86	12.9		1.18
30 de abril del 2021	121.50	2.03	13.2		1.69

\*\*Datos de temperatura integrados en 20 metros de profundidad.

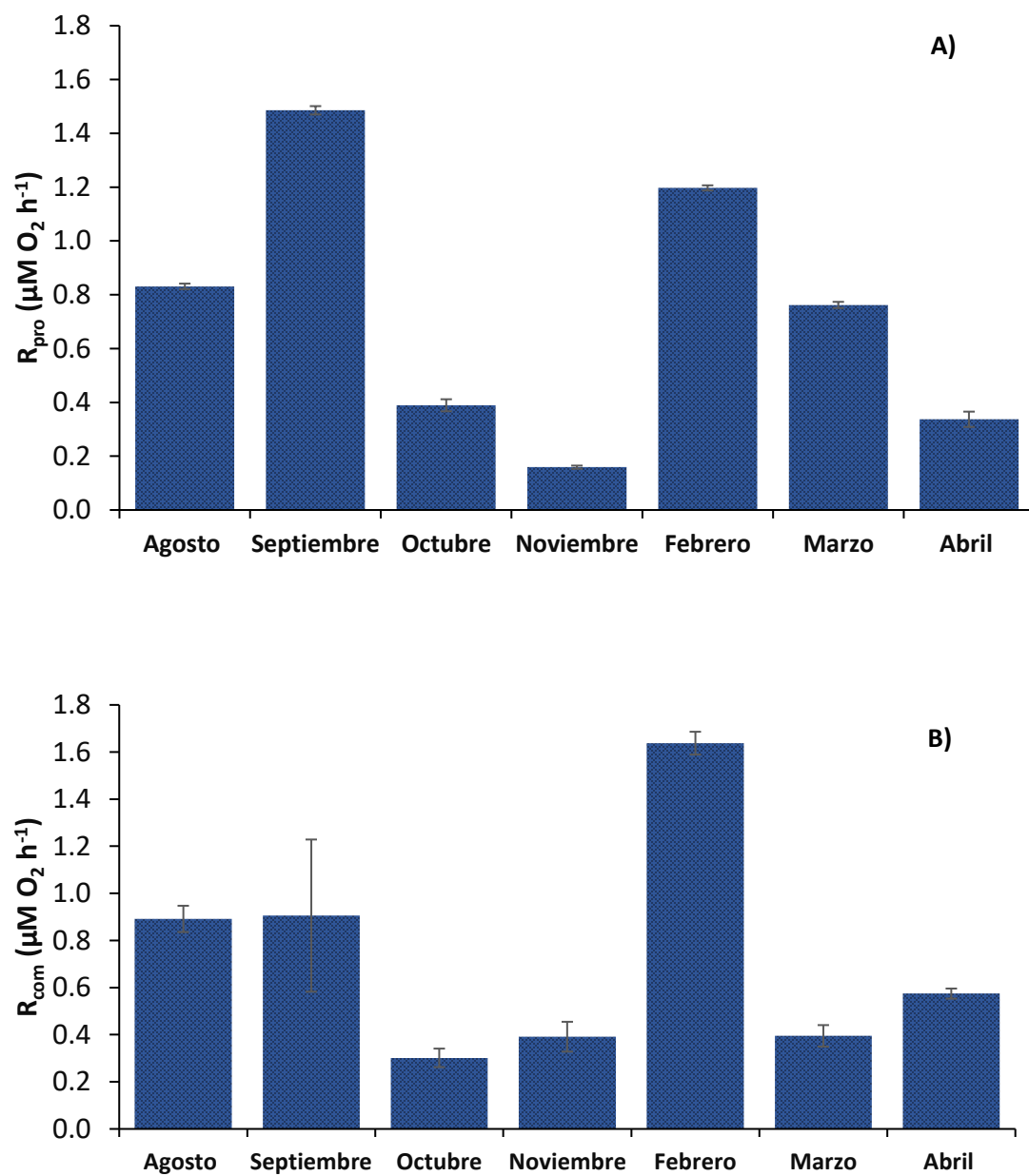
\*Datos de  $\text{B}_{12d}$  reportados por Méndez-González (2021).

**Tabla III.** Variables biológicas *in situ* de los experimentos de adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub> disuelta (B<sub>12d</sub>) en la BTS en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021.

<b>Fecha de muestreo</b>	<b>Clorofila total (mg·m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Clorofila 0.7-5 μm (mg·m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Clorofila &gt;5.0 μm (mg·m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Abundancia Bacteriana (cel mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>24 de agosto del 2020</b>	5.67	2.81	2.86	2.63x10 <sup>5</sup>
<b>24 de septiembre del 2020</b>	3.1	2.35	0.75	8.39x10 <sup>4</sup>
<b>22 de octubre del 2020</b>	-	-	-	1.30x10 <sup>5</sup>
<b>18 de noviembre del 2020</b>	3.09	1.91	1.18	1.18x10 <sup>4</sup>
<b>11 de febrero del 2021</b>	2.08	1.58	0.5	9.60x10 <sup>4</sup>
<b>24 de marzo del 2021</b>	1.6	0.47	1.13	1.20x10 <sup>5</sup>
<b>30 de abril del 2021</b>	1.61	0.94	0.67	6.81x10 <sup>4</sup>



**Fig. 3.** Condiciones *in situ* de (A) índice de surgencia de Bakun 1975 y BEUTI, (B)  $\text{Fe}_d$  y (C) abundancia bacteriana. Los índices de surgencia costera representan la media de 3 días.



**Fig. 4.** Respiración celular *in situ* de procariotas heterotróficos (A) y de la comunidad microbiana (B) en muestras colectadas en la Bahía de Todos Santos en el periodo de agosto del 2020 a abril del 2021.

## 7.2 Respuesta de la respiración celular de la comunidad microbiana y procariotas heterótrofos a la adición de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub>.

Se promediaron las tasas de respiración de todos los experimentos por tratamientos para ambos grupos: procariotas y comunidad microbiana. En incubaciones de procariotas se encontró un máximo de respiración con los tratamientos +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> y +B<sub>12</sub> ( $0.78 \pm 0.66 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) y mínimos con +Fe<sub>d</sub> ( $0.48 \pm 0.34 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$ ). Por su parte, la comunidad microbiana se caracterizó por presentar las mayores tasas de respiración con el tratamiento +Fe<sub>d</sub> ( $0.96 \pm 0.43 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) así como las menores cuando no se adicionaron micronutrientes ( $0.73 \pm 0.47 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$ ).

La respiración de procariotas ( $R_{\text{pro}}$ ) se vio favorecida con el enriquecimiento de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub>, incrementando significativamente en algunos tratamientos y ciertos meses. Por ejemplo, como se observa en la Fig. 5A, la adición de B<sub>12</sub> estimuló el aumento de la  $R_{\text{pro}}$  hasta 4.6 y 1.5 veces en los meses de noviembre y abril, respectivamente. Así mismo, el enriquecimiento con Fe<sub>d</sub> favoreció el consumo de oxígeno en noviembre incrementando la  $R_{\text{pro}}$  1.9 veces. Al añadir en conjunto Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> se observó un aumento de la  $R_{\text{pro}}$  en septiembre, noviembre y abril el cual fue de hasta 2.0 veces. No se observó un efecto sobre la  $R_{\text{pro}}$  con los tratamientos +B<sub>12</sub> en septiembre, +B<sub>12</sub> y +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> en octubre y +Fe<sub>d</sub> en abril. En cambio, los tratamientos +B<sub>12</sub> y +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> en agosto y marzo, así como el +Fe<sub>d</sub> en octubre y marzo disminuyeron el consumo de oxígeno hasta 1.7 veces, donde el mayor cambio se presentó con el tratamiento +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> en agosto.

En la Fig. 5B se observa que la respiración de la comunidad microbiana ( $R_{\text{com}}$ ) se caracterizó por presentar una respuesta positiva a las adiciones de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> en

comparación a los cambios observados sobre la  $R_{pro}$ . La  $R_{com}$  incrementó significativamente al añadir  $B_{12}$  en marzo y abril (1.8 y 2.1 veces, respectivamente), así como con la adición de  $Fe_d$  en octubre y marzo (4.2 y 2.5 veces, respectivamente). La adición conjunta de los dos micronutrientes estimuló el  $R_{com}$  en septiembre, octubre, marzo y abril alcanzando un incremento de 1.5 veces. Por el contrario, en febrero al enriquecer con  $B_{12}$  la  $R_{com}$  disminuyó 1.3 veces. No obstante, los tratamientos  $+B_{12}$  de agosto a noviembre,  $+Fe_d$  en noviembre, febrero y abril, así como  $+Fe_d+B_{12}$  en agosto, noviembre y febrero no tuvieron ningún efecto sobre la  $R_{com}$ .

**Tabla IV.** Resumen de la respuesta temporal de la respiración celular en ambos tipos de incubación (procariotas heterotróficos y comunidad microbiana) con las adiciones de  $Fe_d$  y  $B_{12}$ .

Mes/Tratamiento	$+B_{12}$		$+Fe_d$		$+Fe_d+B_{12}$	
	Pro	Com	Pro	Com	Pro	Com
<b>Agosto 2020</b>	-	=	N/A	N/A	-	=
<b>Septiembre 2020</b>	=	=	N/A	N/A	+	+
<b>Octubre 2020</b>	-	=	-	+	=	+
<b>Noviembre 2020</b>	+	=	+	=	+	=
<b>Febrero 2021</b>	=	-	=	=	=	=
<b>Marzo 2021</b>	-	+	-	+	-	+
<b>Abril 2021</b>	+	+	-	=	+	+

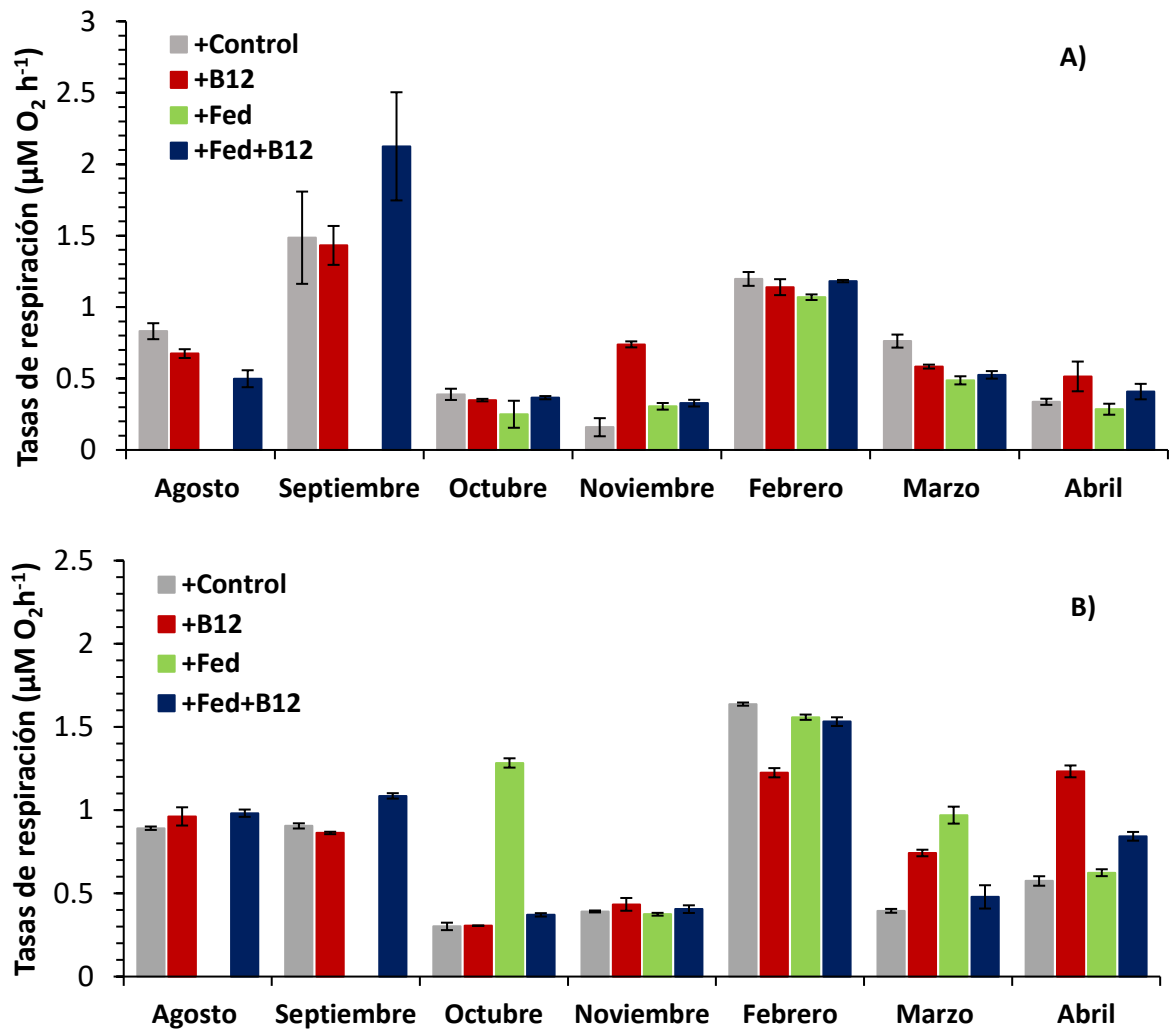
*Pro*: procariotas heterótrofos.

*Com*: comunidad microbiana.

=: no se encontró respuesta con las adiciones de micronutrientes.

+: aumento con las adiciones de micronutrientes.

-: disminución con las adiciones de micronutrientes.

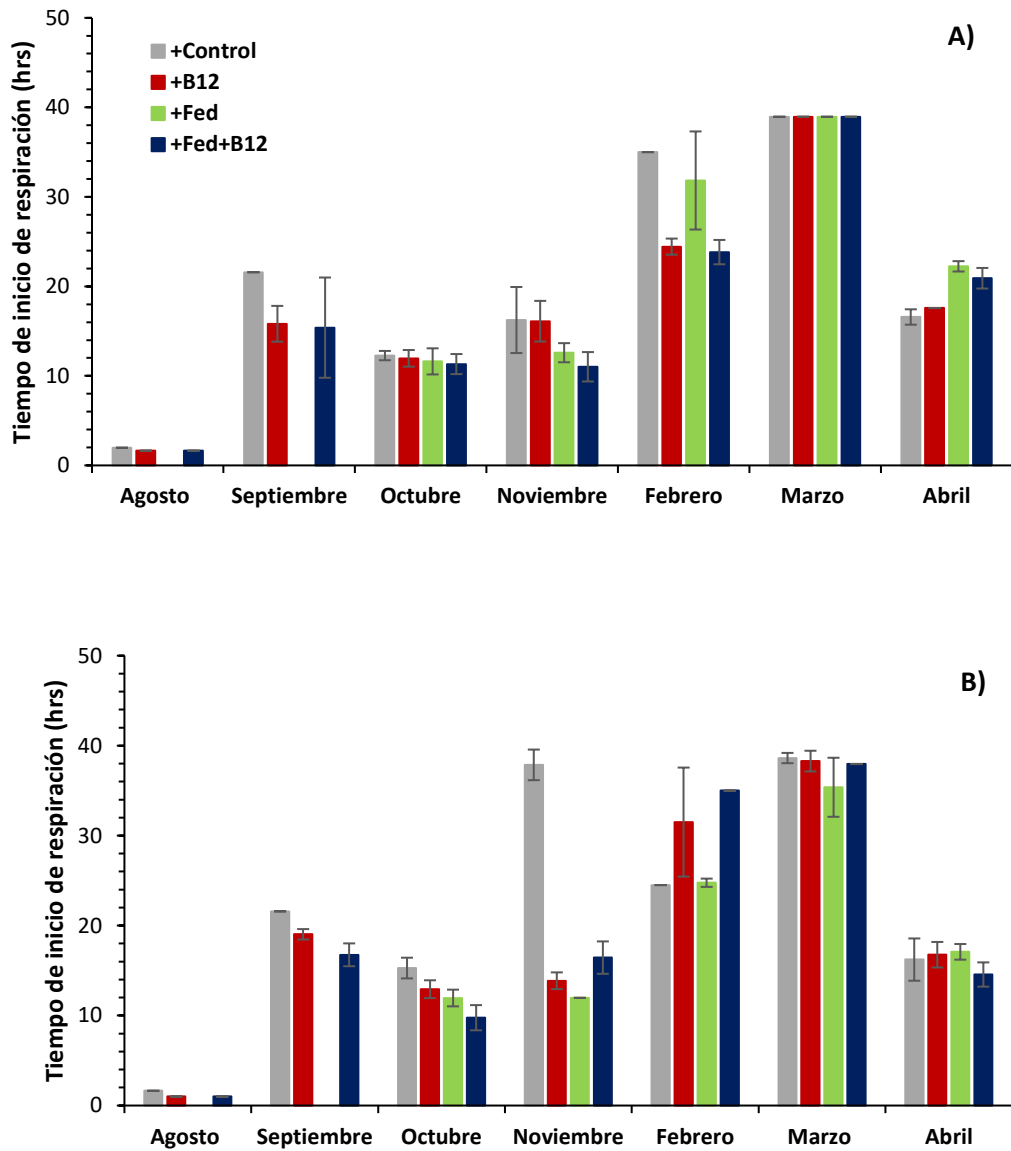


**Fig. 5.** Tasas de respiración celular de (A) procariotas heterótrofos y de la (B) comunidad microbiana bajo tres diferentes tratamientos de adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  en la BTS durante el periodo de agosto del 2020 a abril 2021.

### 7.3 Tiempo de inicio de la respiración de la comunidad microbiana y procariotas heterótrofos con la adición de $Fe_d$ y $B_{12}$ .

El tiempo en el cual se comenzó a observar la disminución en la concentración de oxígeno (tiempo de inicio de la respiración), fue de 1.6 a 38.9 horas para procariotas y de 1 a 38.6 horas para la comunidad microbiana (Fig. 6). En incubaciones de procariotas (Fig. 6A) la adición de  $B_{12}$  en agosto, septiembre y febrero aceleró el tiempo de activación de las tasas respiratorias hasta en 1.6 veces. Lo mismo ocurrió con los tratamientos  $+Fe_d$  en noviembre con 1.3 veces y  $+Fe_d+B_{12}$  en agosto, septiembre, noviembre y febrero con un decremento en el tiempo de activación de 1.5 veces. Por el contrario, al enriquecer con  $Fe_d$  en octubre y abril, el tiempo en el que comenzaron a respirar los procariotas aumentó hasta en 3.5 veces. Por otra parte, los tratamientos  $+B_{12}$  en octubre, noviembre, marzo y abril,  $+Fe_d$  en febrero y marzo, así como  $+Fe_d+B_{12}$  en octubre, marzo y abril, no tuvieron un efecto en dicha variable medida.

En cuanto a la comunidad microbiana (Fig. 6B), la adición conjunta de  $B_{12}$  y  $Fe_d$  en los meses de septiembre y octubre disminuyó el tiempo de activación de las tasas respiratorias de la comunidad microbiana hasta en 1.3 veces. Sin embargo, todos los tratamientos enriquecidos con micronutrientes en febrero incrementaron el tiempo de activación siendo hasta 1.9 veces más altos. Además, el tratamiento  $+B_{12}$  y  $+Fe_d$  no tuvieron un efecto en esta variable en todos los meses con excepción de febrero al igual que  $+Fe_d+B_{12}$  en noviembre, marzo y abril.



**Fig. 6.** Tiempo de activación de las tasas respiratorias bajo cuatro diferentes tratamientos en la BTS durante el periodo de agosto del 2020 a abril 2021 en: (A) incubaciones de procariotas heterótrofos y (B) incubaciones de la comunidad microbiana.

## 7.4 Cambios en la abundancia bacteriana en incubaciones de comunidades microbianas y procariotas heterotróficos con la adición de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub>.

Promediando las abundancias bacterianas de incubaciones de procariotas (AB<sub>pro</sub>) se observaron los valores máximos al adicionar el conjunto de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> ( $1.1 \pm 0.3 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>) y las menores con el control ( $8.3 \pm 3.8 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>). De igual forma, el máximo de la abundancia bacteriana en incubaciones de la comunidad microbiana (AB<sub>com</sub>) correspondió al tratamiento +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> ( $9.4 \pm 2.6 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) y el mínimo al control ( $6.2 \pm 3.1 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>).

La respuesta de la AB<sub>pro</sub> a la adición de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> fue variable entre los meses y tratamientos. En la Fig. 7A se observa que la abundancia bacteriana se incrementó en noviembre y febrero en todos los tratamientos: +B<sub>12</sub>, +Fe<sub>d</sub>, +B<sub>12</sub>+Fe<sub>d</sub>. Los mayores incrementos se observaron con la adición de Fe<sub>d</sub> en noviembre incrementando en 2.9 veces y en febrero con la adición combinada de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub> aumentando 2.2 veces. Así mismo la adición de B<sub>12</sub> en marzo incrementó esta variable en 1.5 veces al igual que el tratamiento +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> en abril con 1.3 veces. Por el contrario, en abril los tratamientos +Fe<sub>d</sub> y +B<sub>12</sub> ocasionan una disminución de la AB<sub>pro</sub> la cual llegó a ser de 1.7 veces menor. Así mismo en los meses de octubre con todos los tratamientos que contenían micronutrientes como en marzo con los tratamientos que contenían Fe<sub>d</sub> solo o en conjunto con la B<sub>12</sub> no se presentó un cambio sobre la AB<sub>pro</sub>.

Por su parte, la adición de Fe<sub>d</sub> solo o en conjunto con B<sub>12</sub> fue el que tuvo un mayor efecto sobre la AB<sub>com</sub> (Fig. 7B). En noviembre y febrero se presentó un aumento en la

$AB_{com}$  en todos los tratamientos que contenían micronutrientes con incrementos máximos de 2.7 veces en noviembre con la adición de  $Fe_d$  y 2.6 veces con el tratamiento  $+Fe_d+B_{12}$  en febrero. Así mismo, en marzo la adición de  $B_{12}$  y  $Fe_d+B_{12}$  aumentó 1.9 veces y 2.0 veces la  $AB_{com}$  respectivamente, mientras que en abril el tratamiento  $Fe_d$  incrementó 1.5 veces el número de células bacterianas. Sin embargo, en el mes de octubre la adición de micronutrientes no tuvo un efecto sobre la  $AB_{com}$  al igual que el enriquecimiento con  $Fe_d$  en marzo y los tratamientos  $+B_{12}$  y  $+Fe_d+B_{12}$  en abril.

**Tabla V.** Resumen de la respuesta temporal de la abundancia bacteriana en ambos tipos de incubación (procariotas heterotróficos y comunidad microbiana) con las adiciones de  $Fe_d$  y  $B_{12}$ .

Mes/Tratamiento	$+B_{12}$		$+Fe_d$		$+Fe_d+B_{12}$	
	Pro	Com	Pro	Com	Pro	Com
Octubre 2020	=	=	=	=	=	=
Noviembre 2020	+	+	+	+	+	+
Febrero 2021	+	+	+	+	+	+
Marzo 2021	+	+	=	=	=	+
Abril 2021	-	=	-	+	+	=

### Abreviaturas:

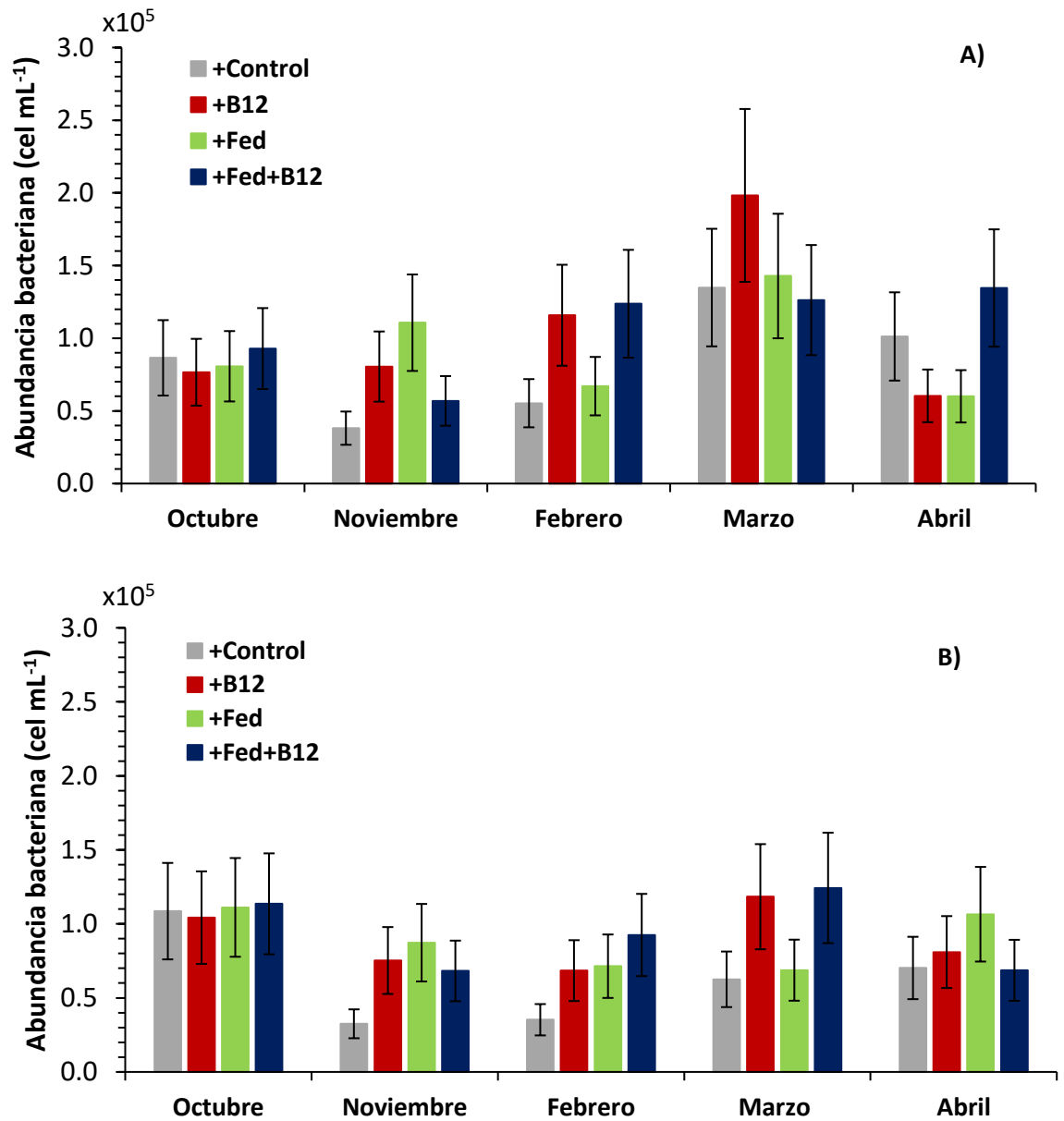
*Pro*: procariotas heterótrofos.

*Com*: comunidad microbiana.

=: no se encontró respuesta con las adiciones de micronutrientes.

+: aumento con las adiciones de micronutrientes.

-: disminución con las adiciones de micronutrientes.

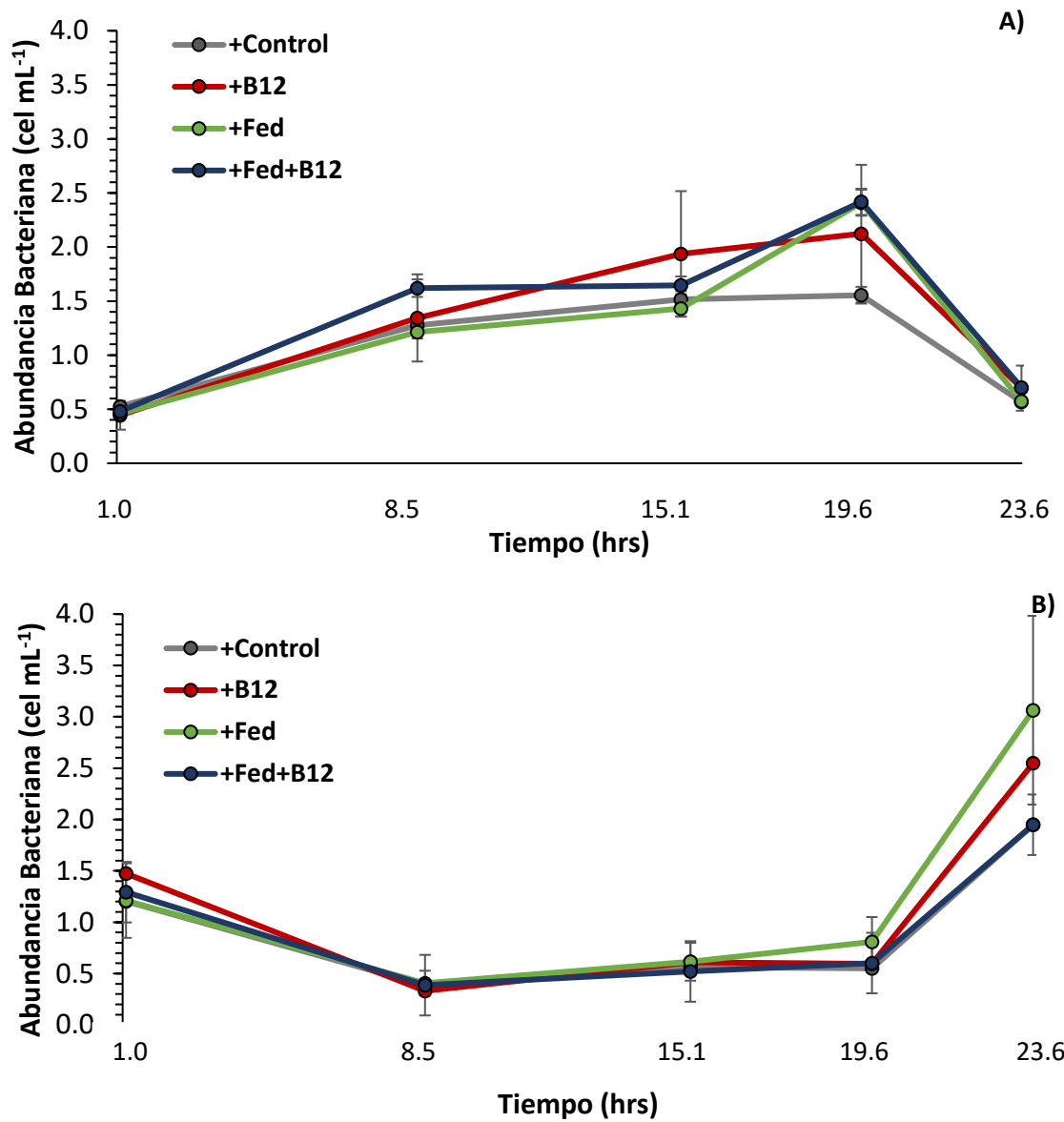


**Fig. 7.** Abundancia bacteriana de los experimentos de incubación bajo cuatro diferentes tratamientos durante el periodo de octubre del 2020 a abril 2021 en: (A) procariotas heterótrofos y (B) comunidad microbiana.

## **7.5 Cambio de la abundancia bacteriana a lo largo del tiempo en incubaciones de comunidades microbianas y procariotas heterotróficos con la adición de Fe<sub>d</sub> y vitamina B<sub>12</sub>.**

La AB<sub>pro</sub> incrementó en las primeras 19 horas a partir de las cuales comenzó un decremento hacia las 23:30 horas. Como se muestra en la Fig. 8A los tratamientos a los que se adicionó Fe<sub>d</sub> fueron los que tuvieron un mayor incremento dentro de las primeras 19 horas (incrementos mayores a 5 veces), mientras que el control fue el que presentó el menor incremento dentro de este intervalo de tiempo (3 veces). Después de las 19:30 horas la AB<sub>pro</sub> disminuyó, lo cual al igual que con los incrementos fue más pronunciado en los tratamientos enriquecidos con Fe<sub>d</sub> (hasta 4 veces).

Al tener toda la comunidad microbiana el comportamiento de la abundancia bacteriana en las 23:30 horas de incubación presentó una tendencia opuesta a la de las incubaciones de solo procariotas (Fig. 8B). En las primeras 8:30 horas la AB<sub>com</sub> decremento principalmente con la adición de vitamina B<sub>12</sub> (4.5 veces). Posterior a ello, se tuvo un aumento considerablemente en especial en los tratamientos +B<sub>12</sub> y +Fe<sub>d</sub> (mayor a 7.5 veces), mientras que los cambios menores se observaron con el control y el tratamiento +Fe<sub>d</sub>+B<sub>12</sub> (3.3 veces).



**Fig. 8.** Cambios en la abundancia bacteriana con respecto al tiempo durante el experimento de abril del 2021 en la BTS bajo cuatro diferentes tratamientos en: A) incubaciones de procariontes heterótrofos y B) incubaciones de la comunidad microbiana.

## 8. Discusión

### 8.1 Variables metabólicas *in situ* en la Bahía de Todos Santos.

Dentro de la BTS, la abundancia bacteriana presenta concentraciones bajas en comparación con las regiones norte e intermedia del SCC (Tabla VI). La concentración de células bacterianas fue en promedio  $1.1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> con un intervalo de  $1.2 \times 10^4$  a  $2.6 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> con mínimos en noviembre y máximos en marzo. En comparación, en la región norte del SCC se han reportado valores de 0.7 a  $1.0 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (Culley et al., 2002) y en la región intermedia de 0.1 a  $1.2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (Sher et al., 2005; Ward, 2005). Mientras que, en la región sur, de la cual forma parte la BTS, se reporta una concentración de  $7.8 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> (Haskpiel-Segura et al., 2017). Debido a esto, se sugiere que dentro de la BTS hay un decremento de la abundancia bacteriana con respecto a las regiones norte e intermedia del SCC.

La clorofila dentro del SCC tiende a disminuir hacia el sur (Espinosa-Carreón et al., 2012; Gaxiola-Castro et al., 2015). Las mayores concentraciones de clorofila coincidieron con las mayores abundancias bacterianas (Tabla. III). Aunado a esto se encontró una relación lineal positiva ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) entre la abundancia bacteriana y la clorofila (tamaño del poro del filtro  $> 5 \mu\text{m}$ ). La clorofila se considera un indicador de la biomasa fitoplanctónica y la producción de carbono orgánico disuelto (Yang et al., 2019), el cual estimula el crecimiento bacteriano (Kuznar et al., 2009). Nuestros resultados sugieren que la abundancia bacteriana en BTS es estimulada por la producción de sustrato orgánico, proveniente de otros organismos de la comunidad microbiana.

**Tabla VI.** Cuadro comparativo de los valores reportados de abundancia bacteriana por diversos estudios en las diferentes regiones del Sistema de la Corriente de California (SCC).

<b>Localidad</b>	<b>Abundancia Bacteriana (x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
<i><b>Región Norte del SCC</b></i>		
Frente a la costa de Oregón	0.7 -1.0	Culley et al., 2002
<i><b>Región Intermedia del SCC</b></i>		
Zona adyacente a la bahía de Monterey	0.1-0.9	Sher et al., 2005
Bahía Monterey	0.4-1.2	Ward, 2005
<i><b>Región Sur del SCC</b></i>		
Estaciones Ensenada Micmar Antares	0.8 - 1.86	Haskpiel-Segura et al., 2017
Bahía de Todos Santos	0.01-0.3	Este estudio

Las tasas respiratorias *in situ* de procariotas medidas en nuestro estudio fueron superiores a las reportadas fuera de la bahía por otros autores (Fig. 9). Los valores de  $R_{\text{pro}}$  se encontraron en un intervalo de 0.2 a 1.5  $\mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  y para la estación Flucar (30 m de profundidad), la cual se encuentra en la porción sur del SCC y es aledaña a la BTS, fueron de  $\sim 0.14 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  (Villegas-Mendoza et al., 2017). Nuestros datos se encontraron influenciados por la presencia de un sistema retentivo que aumenta la actividad biológica de autótrofos (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015; Vander-Woude et al., 2006). En un estudio realizado en Washington y Oregón se encontró que la respiración integrada de la columna de agua se relaciona con los tiempos de residencia, siendo mayores en localidades con circulación retentiva (Siedlecki et al., 2015). Por lo cual, el sistema retentivo de la BTS puede favorecer la disponibilidad de sustrato orgánico para los heterótrofos incrementando las tasas respiratorias.

Otro aspecto documentado del sistema retentivo en BTS es el incremento en la concentración de  $\text{Fe}_d$  con respecto a la zona adyacente (Félix-Bermúdez, 2018). La constante media de saturación ( $K_s$ ) de  $\text{Fe}_d$  varía para cada organismo. Shafiee et al. (2019) mostraron que las bacterias heterotróficas tienen un  $K_s$  superior a ciertas especies de eucariotas como *E. huxleyi* y *T. oceanica* e inferior a otras como *T. pseudonana*. Esto implica que los cambios en las concentraciones de  $\text{Fe}_d$  pueden afectar de manera diferencial el metabolismo celular de cada miembro de la comunidad microbiana. En relación con lo anterior, se observó que las contribuciones de la  $R_{\text{pro}}$  a la respiración total (Tabla VII; 41 al 193%) son mayores que las registradas fuera de la bahía (26 al 70%;

Villegas-Mendoza et al., 2017). Debido a esto se sugiere que el sistema retentivo característico de la BTS intensifica el metabolismo respiratorio de los procariotas.

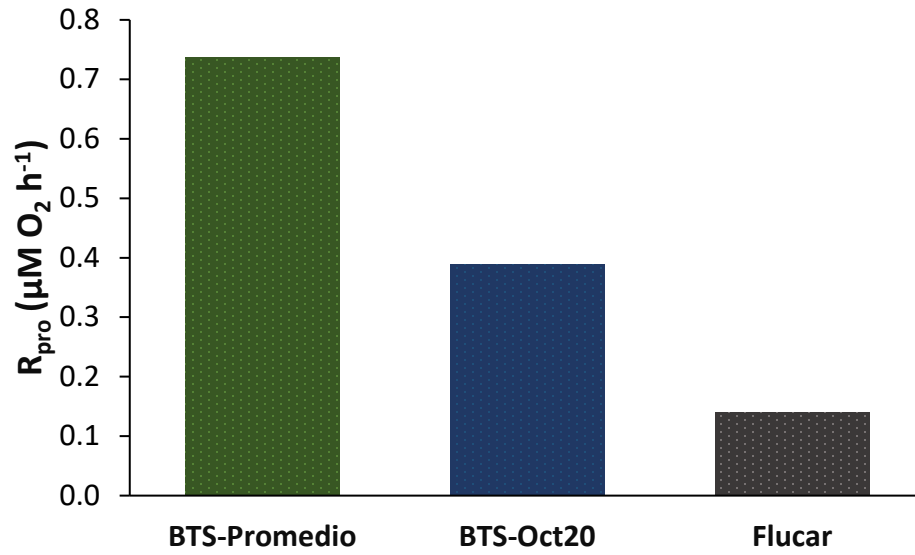
**Tabla VII.** Porcentaje de contribución de la respiración procariota ( $R_{pro}$ ) a la respiración comunitaria ( $R_{com}$ ) en los meses de agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021 en muestras naturales de la Bahía de Todos Santos (BTS).

Mes	+Control	+B <sub>12</sub>	+Fe <sub>a</sub>	+Fe <sub>a</sub> +B <sub>12</sub>
Agosto	93.2	70.1		50.8
Septiembre	164.1	165.9		195.7
Octubre	129.1	114.1	19.5	98.7
Noviembre	40.7	170.3	81.6	80.9
Febrero	73.1	93.0	68.6	77.1
Marzo	192.9	78.6	50.2	109.8
Abril	58.7	41.7	45.7	48.5

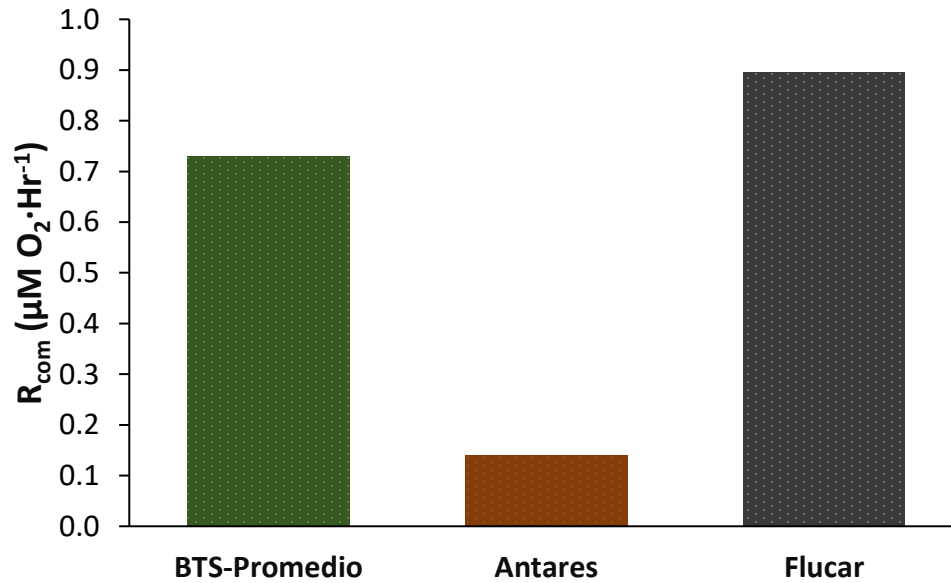
De acuerdo con la Fig. 10, la  $R_{com}$  fue menor a estaciones aledañas costeras (Flucar) y mayor a oceánicas (MicMar). La  $R_{com}$  se encontró en un intervalo de  $0.3 \pm 1.6 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$ . Por su parte en la estación oceánica MicMar se reportaron valores de  $0.1 \pm 0.06 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  (Hakspiel-Segura et al., 2017) y para la costera Flucar de  $0.09$  a  $0.90 \mu\text{M O}_2 \text{ h}^{-1}$  (Villegas-Mendoza et al., 2017). Dichas diferencias pueden ser consecuencia de la disponibilidad de sustrato orgánico, como es el carbono orgánico, el cual es considerado uno de los principales moduladores de la respiración celular (Robinson, 2019). Hakspiel-Segura et al., 2017 reportaron mayores cantidades de carbono orgánico total en estaciones costeras en comparación con las oceánicas. Con lo cual se sugiere que las tasas

respiratorias de la comunidad microbiana están principalmente influenciadas por la cantidad de sustrato presente.

A diferencia de la  $R_{pro}$  la  $R_{com}$  no se favoreció por el sistema retentivo característico de la BTS. La  $R_{pro}$  fue 5.3 veces mayor que la estación costera aledaña Flucar, mientras que la  $R_{com}$  fue 1.2 veces menor. La discrepancia entre las respuestas puede deberse a las ventajas competitivas de cada grupo microbiano. Se ha reportado para regiones limitadas por nitrógeno que los procariotas son mejores adquiriendo nutrientes que el fitoplancton (Jogglar et al., 2020). Dentro de la BTS se ha reportado que existe empobrecimiento de nitrógeno (Delgadillo-Hinojosa et al., 2020; Félix-Bermúdez, 2018), lo cual les confiere una ventaja competitiva a los procariotas. Así mismo, las respuestas a los enriquecimientos con  $Fe_d$  son mayormente favorecidas bajo condiciones sin limitación de sustrato (Fourquez et al., 2015). Debido a esto en un sistema donde se tiene limitación por nitrógeno y suficiente carbono orgánico disuelto, la  $R_{pro}$  se ve beneficiada a comparación de la  $R_{com}$ .



**Fig. 9** Respiración procariota ( $R_{pro}$ ) de la estación costera Flucar medida en octubre del 2015 reportada por Villegas-Mendoza et al., 2017, comparada con el promedio reportado en este estudio (BTS-Promedio) y el valor registrado para octubre del 2020 (BTS-Oct20).



**Fig. 10** Respiración de la comunidad microbiana ( $R_{com}$ ) de las estaciones Flucar y Antares comparadas con el promedio reportado en este estudio (BTS-Promedio).

## 8.2 Variabilidad temporal de las respuestas metabólicas a la adición de Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub>

En noviembre 2020 se observó la mayor respuesta de los procariotas a los enriquecimientos con Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub>. Tal como se observa en la Fig. 3, este mes se caracterizó por la presencia de bajas abundancias bacterianas ( $1.2 \times 10^4$  cel ml<sup>-1</sup>) e índices de surgencia costera ( $17.8 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} 100^{-1}$ ). Bajo estas condiciones el principal aumento significativo para la R<sub>pro</sub> (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) fue con el tratamiento +B<sub>12</sub> y para la AB<sub>pro</sub> con +Fe<sub>d</sub>. Sin embargo, en presencia de toda la comunidad microbiana no se observó efecto en la variable respiración (Tabla IV) pero sí en la AB<sub>com</sub>, la cual evaluó el crecimiento de procariotas en presencia de otros miembros de la comunidad microbiana. Estudios previos de adición de micronutrientes han reportado que los procariotas tienen una ventaja competitiva bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Jogglar et al., 2020), las cuales pueden presentarse en la BTS (Delgadillo-Hinojosa et al., 2020; Félix-Bermúdez, 2018). El mes de noviembre se tuvo el menor transporte vertical de NO<sub>3</sub> ( $-0.05 \text{ mmol NO}_3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Aunado a eso se encontraron altas abundancias fitoplanctónicas, representada por altas concentraciones de clorofila ( $3.1 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) y de diatomeas ( $21,460 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Méndez-González, 2021), lo que genera mayor competencia por los nutrientes. Por lo tanto, bajo las condiciones de índices de surgencia y abundancias bacterianas bajas, así como menor transporte vertical de NO<sub>3</sub> las adiciones de Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub> favorecen principalmente al metabolismo procariota.

Por el contrario, en marzo 2021 se presentaron los mayores aumentos de la R<sub>com</sub> con las adiciones de Fe<sub>d</sub> y/o B<sub>12</sub>, sin embargo, la R<sub>pro</sub> no respondió a dichas adiciones. En

presencia de toda la comunidad microbiana la  $R_{com}$  incrementó significativamente (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n=12$ ) con los enriquecimientos. Mientras que, en incubaciones de procariotas, donde no se tiene la presencia de células grandes la  $R_{pro}$  disminuyó (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n=12$ ) con la adición de  $Fe_d$  y  $B_{12}$ . Este mes mostró características análogas a noviembre (Fig. 1), ya que se tuvieron los valores mayores de índice de surgencia ( $163.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ 100}^{-1}$ ) y abundancia bacteriana ( $1.2 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ ). Estos resultados sugieren que al tener solo a procariotas tanto el  $Fe_d$  como la  $B_{12}$  *in situ* satisfacen su demanda celular. Sin embargo, cuando coexisten toda la comunidad microbiana los requerimientos nutricionales de estos micronutrientes aumentan. Para el caso de la  $B_{12}$  se sabe que la constante media de saturación ( $k_s$ ) para el fitoplancton es de 0.07 a 13.1 pM (Droop, 1968; Tang *et al.*, 2010), mientras cuando se tiene a toda la comunidad microbiana este puede llegar a ser de 83 pM (Bertrand *et al.*, 2011). Por lo cual bajo índices de surgencia altos y altas abundancias bacterianas las adiciones de  $Fe_d$  y/o  $B_{12}$  favorecieron principalmente al metabolismo de la comunidad microbiana.

Las surgencias costeras mostraron ser un factor importante en la respuesta a la adición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  en los meses de noviembre y marzo. Estas traen consigo un aporte de nutrientes a aguas superficiales (Gaxiola-Castro *et al.*, 2015). Uno de los nutrientes es el nitrógeno el cual es requerido como un nutriente esencial utilizado para el crecimiento y como fuente de energía para eucariotas y procariotas (Kirchman, 2008). En este estudio, se registró un transporte vertical de  $NO_3$  (BEUTI) máximo en marzo y mínimo en noviembre ( $5.9$  y  $-0.05 \text{ mmol NO}_3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), lo cual corresponde al índice de surgencia costera referida a Bakun. De esta manera en noviembre

se tuvo el mayor incremento de la abundancia bacteriana (hasta 3 veces) en ambos tipos de incubaciones, mientras que en marzo solo respondieron a la adición de vitamina B<sub>12</sub>. Se ha sugerido que los procariotas tienen una ventaja competitiva por la adquisición de vitaminas B contra el fitoplancton bajo condiciones de limitación por nitrógeno (Jogglar et al., 2020). Dichas condiciones se han registrado en la BTS asociadas a una reducción de las surgencias (Delgadillo-Hinojosa et al., 2020; Félix-Bermúdez, 2018). Así mismo, consideramos que la ventaja competitiva de los procariotas no solo está relacionada con la adquisición de vitaminas B sino también de Fe<sub>d</sub>. Por lo cual en bajos índices de surgencia las mayores respuestas a las adiciones de Fe<sub>d</sub> y/o B<sub>12</sub> se presentan en procariotas.

Se encontró una relación entre transporte vertical de NO<sub>3</sub> y la respuesta a las adiciones de Fe<sub>d</sub>. En marzo donde tuvimos un mayor aporte de NO<sub>3</sub> la R<sub>com</sub> incrementó hasta 2.5 veces con la adición de Fe<sub>d</sub>. Pero en noviembre con el bajo aporte de NO<sub>3</sub> la adición de Fe<sub>d</sub> no tuvo efecto alguno. Por el contrario, la R<sub>pro</sub> presentó un comportamiento opuesto al de la comunidad, aumentando hasta 2 veces en noviembre y disminuyendo 1.6 veces en marzo. Browning et al., (2017) refieren que las comunidades fitoplanctónicas del límite oriental del atlántico sur no responden a la adición de N y Fe<sub>d</sub> por sí solos, pero si en conjunto, proponiendo una colimitación. Por lo tanto, sugerimos que el metabolismo respiratorio de las comunidades microbianas de la BTS presenta colimitación N-Fe<sub>d</sub>, lo cual no ocurre con los procariotas.

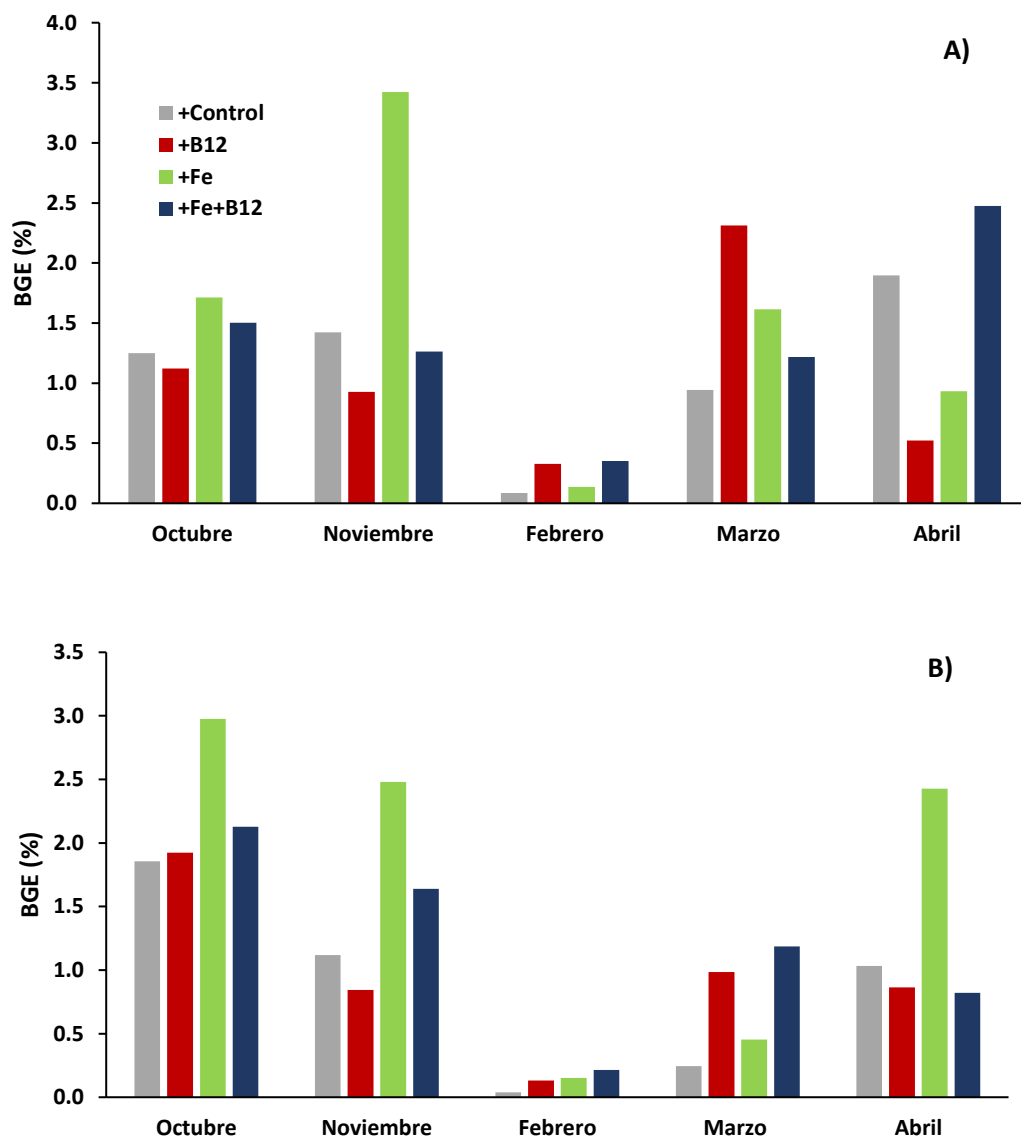
En febrero la mayor proporción del Fe<sub>d</sub> *in situ* es utilizado en el metabolismo respiratorio, limitando el crecimiento bacteriano. Dicho mes se caracterizó por índice de

surgencia intermedio ( $85.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} 100^{-1}$ ), abundancias bacterianas por debajo del promedio ( $9.7 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ ) y una comunidad fitoplanctónica principalmente compuesta por células pequeñas. Bajo estas condiciones la adición de  $\text{Fe}_d$  no tuvo efecto sobre la  $R_{\text{com}}$  y disminuyó la  $R_{\text{pro}}$  (Fig. 5). Lo que indica que los requerimientos de  $\text{Fe}_d$  eran suficientes para mantener el metabolismo respiratorio. Sin embargo, la  $\text{AB}_{\text{com}}$  y  $\text{AB}_{\text{pro}}$  aumentaron hasta 2.6 y 2.2 veces, respectivamente aludiendo una limitación en el crecimiento celular por este micronutriente. En algunas bacterias como *Escherichia coli* se ha mostrado que más del 90% del Fe celular está localizado en la cadena respiratoria (Tortell et al., 1999). Sin embargo, se necesita de estudios que evalúen la cantidad de  $\text{Fe}_d$  intracelular en comunidades naturales de procariotas bajo diferentes condiciones ambientales. Pero, basándonos en nuestros resultados, bajo las condiciones presentadas en febrero, el  $\text{Fe}_d$  será principalmente utilizado para el metabolismo respiratorio dejando limitado el crecimiento bacteriano.

La disminución de la  $R_{\text{pro}}$  con la adición de  $\text{Fe}_d$  no fue exclusiva de febrero ya que se presentó en 4 de los 7 experimentos. Tal como se observa en la Fig. 5, el decremento significativo (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) de la  $R_{\text{pro}}$  se dio en los meses de octubre, febrero, marzo y abril. Contrario a lo reportado en este trabajo, estudios anteriores de respiración con adición de  $\text{Fe}_d$  no han encontrado disminución en la respiración procariota (Fourquez et al., 2012, 2014; Kirchman et al., 2003). Es importante considerar que los estudios antes mencionados sólo utilizaron una especie bacteriana. En comparación, este trabajo estudió a comunidades de procariotas heterótrofos en diferentes condiciones ambientales. Por lo que el entendimiento de la dinámica entre  $\text{Fe}_d$  y el metabolismo respiratorio bacteriano se

vuelve más compleja, interviniendo otros procesos como la competencia por nutrientes y la depredación bacteriana.

Las disminuciones de la  $R_{pro}$  que se observaron en este estudio podrían estar asociadas a que la adición de  $Fe_d$  mejora la eficiencia de crecimiento (BGE) con lo cual el consumo de oxígeno es menor. Se calculo la BGE para cada mes y tratamiento (Fig. 11) donde con la adición de  $Fe_d$  se registraron valores que van de 0.1 a 3.4% (1.6% en promedio) los cuales son más altos que el control (1.1% en promedio). Además, se observaron incrementos en los meses donde se presentaron disminuciones de la  $R_{pro}$ . Esto debido a la relación inversa que se presenta entre ambas variables (Dolan et al., 2018). En un estudio realizado con la especie bacteriana *Vibrio harveyi* encontraron que la adición de  $Fe_d$  ayuda a estimular la BGE (Kirchman et al., 2003). Así mismo, en este trabajo encontramos que la adición de  $Fe_d$  favoreció el incremento de la BGE de procariotas ocasionado disminuciones en la  $R_{pro}$ .



**Fig. 11.** Eficiencia de crecimiento bacteriano (BGE) calculado a partir de un factor de 20 fgC Cel (Bell, 2018) en: (A) procariotas heterótrofos y (B) comunidad microbiana.

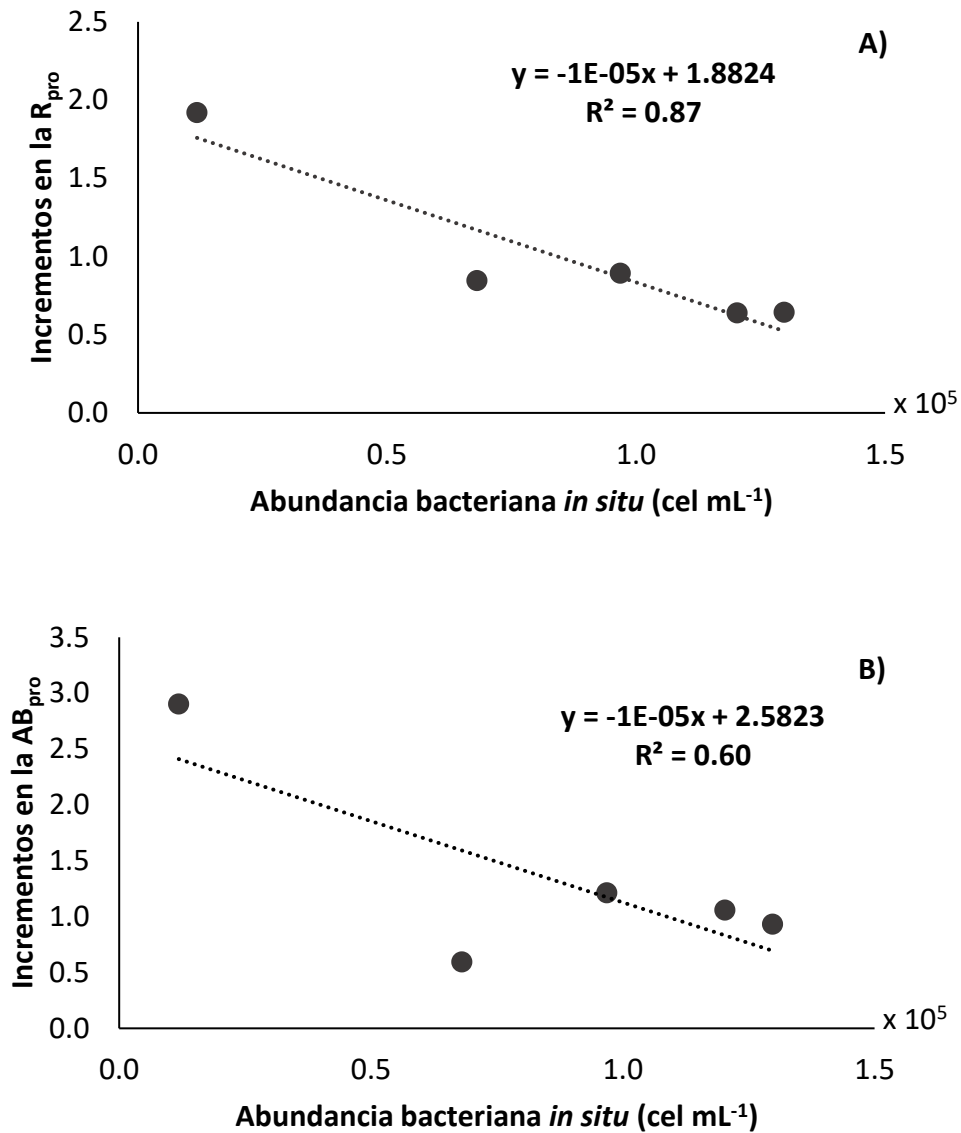
### 8.3 Respuestas metabólicas a la adición de Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub> y su relación con las variables ambientales *in situ*.

La abundancia bacteriana *in situ* y la clorofila total se relacionaron con la respuesta metabólica de los procariotas heterótrofos al añadir Fe<sub>d</sub>. La relación entre la R<sub>pro</sub> y AB<sub>pro</sub> ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) con la abundancia bacteriana *in situ* fue negativa (Fig. 12) pero con la clorofila total fue positiva. Las bajas abundancias bacterianas podrían indicar limitación en el crecimiento bacteriano, por lo cual al adicionar Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub> se observaron incrementos en la AB<sub>pro</sub>. Los mayores incrementos se presentaron en el mes de noviembre (hasta 2.9 veces con +Fe<sub>d</sub>) donde se registraron los valores más bajos de abundancia bacteriana *in situ* y altas concentraciones de clorofila (Tabla III). Se sabe que hay una fuerte competencia por nutrientes entre los procariotas y el fitoplancton (Fourquez et al., 2015; Joglar et al., 2020; Koch et al., 2012; Tortell et al., 1996). Lo cual se evidenció en los resultados aquí mostrados, ya que en presencia de altas concentraciones de clorofila (mayores biomasas fitoplanctónicas) el crecimiento bacteriano se limitó teniendo una mayor respuesta a las adiciones de Fe<sub>d</sub> y B<sub>12</sub>.

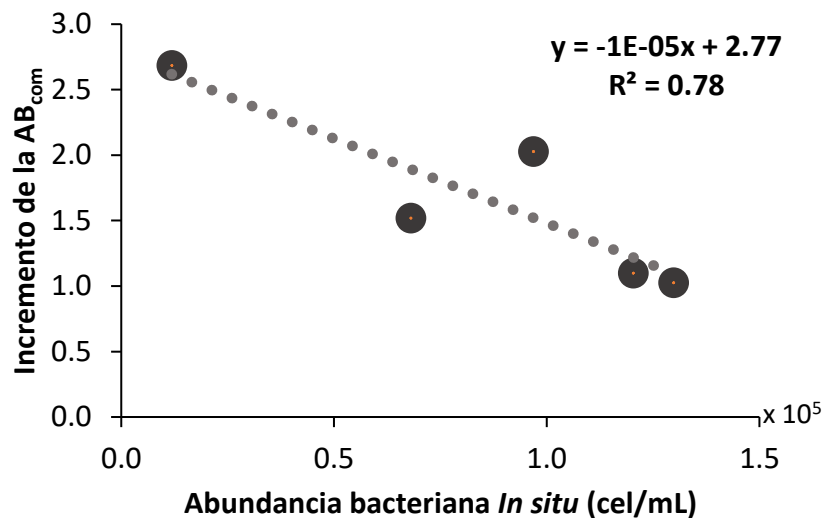
A diferencia de las incubaciones donde solo se tenían procariotas, la respuesta a la adición de Fe<sub>d</sub> y/o vitamina B<sub>12</sub> en la R<sub>com</sub> no se relacionó con la abundancia bacteriana *in situ*. Sin embargo, tal como se observa en la Fig. 13 la AB<sub>com</sub> al agregar Fe<sub>d</sub> si presentó relación ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) con dicha variable. Se sabe que el crecimiento bacteriano es estimulado por la materia orgánica producto del fitoplancton (Kuznar et al., 2009). Por lo cual los incrementos en la abundancia bacteriana pueden ser debidos a un efecto cascada, donde la adición de Fe<sub>d</sub> estimula a eslabones tróficos superiores dejando en disposición

sustrato orgánico para el crecimiento bacteriano (Fourquez et al., 2014). Por lo tanto, la cantidad de células bacterianas no tiene efecto sobre la respiración de la comunidad microbiana, pero si en el crecimiento bacteriano.

A pesar de que el  $Fe_d$  y la vitamina  $B_{12}$  son necesarios en el metabolismo celular (Fenchel et al., 2012; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014) no se encontró relación entre las respuestas de la respiración celular y abundancia bacteriana a la adición de  $Fe_d$  y/o vitamina  $B_{12}$  con sus concentraciones *in situ*. Estudios previos han mostrado que, aunque la variación en las respuestas a las adiciones de micronutrientes, tanto en el fitoplancton como en las bacterias, es dependiente de las concentraciones *in situ*, también influye la composición taxonómica de la comunidad (Barber-Lluch et al., 2019; Gilbert et al., 2012; Joglar et al., 2020). En este trabajo no se evaluó la composición taxonómica de las comunidades microbianas, pero, si se observó una relación entre las variables biológicas (clorofila y abundancia bacteriana) con las respuestas de las variables metabólicas. Así mismo, las concentraciones medidas de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  son mayores (hasta 15 veces) a las reportadas por otros estudios donde observan efecto de las concentraciones *in situ* (Browning et al., 2018; Joglar et al., 2020). Esto sugiere que dentro de la BTS no se presentan condiciones de limitación por  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ . Por lo tanto, concluimos que en esta bahía la respuesta de la respiración y crecimiento celular al añadir  $Fe_d$  y/o vitamina  $B_{12}$  dependió de variables biológicas como la clorofila y la abundancia bacteriana, mientras que la concentración *in situ* de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  no fue un factor determinante.



**Fig. 12.** Relación entre los incrementos con respecto al control de: A) respiración celular ( $R_{pro}$ ) y B) abundancia bacteriana ( $AB_{pro}$ ) en incubaciones de procariontas heterótrofos bajo la adición de hierro disuelto ( $Fe_d$ ) con la abundancia bacteriana *in situ*, presentando una correlación de Pearson estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ )



**Fig. 13.** Relación entre los incrementos de la abundancia bacteriana en incubaciones de la comunidad microbiana (AB<sub>com</sub>) bajo la adición de hierro disuelto (Fe<sub>d</sub>) y la abundancia bacteriana *in situ*, presentando una correlación de Pearson estadísticamente significativa (p<0.05, n=7).

Las surgencias costeras fueron un factor importante en el metabolismo respiratorio decrementando el tiempo de inicio de la respiración. Los índices de surgencia costera referida a Bakun y BEUTI, se relacionaron significativamente (p<0.05, n=7) con el TR<sub>pro</sub> bajo los tratamientos control y +B<sub>12</sub>. Así mismo, se relacionaron con el TR<sub>com</sub> al adicionar B<sub>12</sub> solo o en conjunto con Fe<sub>d</sub>. Las surgencias costeras traen consigo nutrientes inorgánicos, los cuales en conjunto con la B<sub>12</sub> estimulan el crecimiento de organismos productores de esta vitamina como *Synechococcus* (Joglar et al., 2021), así como sus tasas

respiratorias (Fernández-González et al., 2020). Sin embargo, para este estudio las disminuciones en el  $TR_{pro}$  y  $TR_{com}$  no fueron consistentes con los aumentos en la  $R_{pro}$  y  $R_{com}$ . Aunado a esto, las variables  $AB_{pro}$ ,  $AB_{com}$ ,  $R_{pro}$  y  $R_{com}$  no presentaron relación alguna con las variables físicas analizadas: índices de surgencia y temperatura. Lo cual sugiere que la variabilidad física de la BTS tiene efecto en el tiempo de inicio de la respiración, pero no en la magnitud de esta.

No se encontró relación entre el tiempo de inicio de la respiración con la magnitud de esta. Diversos factores pueden estar implicados en este hecho, como es la concentración de sustrato orgánico. El metabolismo bacteriano está principalmente ligado a la disponibilidad de sustrato orgánico (García-Martín et al., 2019; Kirchman et al., 2000), por lo que la adición de micronutrientes no es efectiva hasta que la limitación por carbono orgánico desaparece (Fourquez et al., 2015; Kirchman et al., 2000). Mientras que el tiempo de inicio de la respiración estuvo mayormente relacionada con las surgencias costeras. Por lo tanto, concluimos que estas variables son independientes entre sí ya que están controladas por diferentes factores como las surgencias y la disponibilidad de sustrato orgánico.

#### **8.4 Cinética de crecimiento: depredación bacteriana, competencia por nutrientes y limitación por sustrato orgánico.**

Los cambios de la abundancia bacteriana con las adiciones de  $Fe_d$  y/o vitamina  $B_{12}$  en el experimento realizado en abril del 2021 sugieren una interacción entre los procariontes con otros miembros de la comunidad microbiana. Como se muestra en las Fig. 8, existe una clara tendencia opuesta entre la cinética de crecimiento de la  $AB_{pro}$  y la  $AB_{com}$ . Se sabe

que los procariotas heterótrofos se benefician de la materia orgánica producto de otros miembros de la comunidad fitoplanctónica (Kirchman, 2008; Kuznar et al., 2009). Sin embargo, estos tienen la capacidad de remineralizar nutrientes inorgánicos y dejarlos a disposición de los organismos autótrofos (Kirchman, 2008; Munn et al. 2019) pero a su vez pueden ser competidores por estos nutrientes (Fourquez et al., 2020; Joglar et al., 2020; Kirchman, 2008). Estos y otros procesos de interacción entre bacterias heterótrofas y otros miembros de la comunidad microbiana fueron observados en el experimento de abril del 2021.

Las primeras 19.6 horas se caracterizaron por el efecto de una posible actividad bacterívora. En este tiempo la  $AB_{pro}$  incrementó hasta 5.2 veces. Por su parte, la  $AB_{com}$  presentó un decremento máximo de 4.5 veces en las primeras 8.5 horas y posteriormente permaneció constante aproximadamente por 11 horas hasta llegar a las 19.6 horas. Estos datos sugieren que, al tener solos a los procariotas heterótrofos, no hay competencia por los micronutrientes debido al incremento observado en las primeras 19.6 horas. Sin embargo, en presencia de toda la comunidad microbiana, el decremento de las primeras horas podría estar asociado a la depredación bacteriana por la presencia de fagótrofos. Se ha documentado que pequeños cambios en la abundancia bacteriana son causados por el aumento de la mortalidad (Kirchman et al., 2000) que en este caso sería una depredación bacteriana. Después tenemos aproximadamente 11 horas en las cuales la  $AB_{com}$  permanece casi constante, lo que atribuimos a un equilibrio entre la depredación y crecimiento bacteriano. De esta manera, observamos que el crecimiento bacteriano puede ser controlado por otros miembros de la comunidad microbiana mediante la depredación.

La dependencia de los procariotas con otros miembros de la comunidad microbiana fue especialmente evidente en las últimas 4 horas de incubación. La  $AB_{com}$  incrementó hasta 5 veces, mientras que la  $AB_{pro}$  presentó una disminución máxima de 2.8 veces. El decremento de la  $R_{pro}$  puede estar asociado a la falta de sustrato orgánico (carbono orgánico), el cual proviene de la interacción con otros organismos de la comunidad microbiana (Kirchman, 2008). Aunado a esto, la  $AB_{com}$  incrementó hasta 7.6 veces sugiriendo una menor presencia de fagótrofos los cuales dejan en disposición sustrato orgánico que favorece el incremento de la  $AB_{com}$ . Apoyando a lo anterior, se ha documentado que los incrementos de la abundancia bacteriana son estimulados por el aumento del carbono orgánico disuelto producto del fitoplancton (Barber-Lluch et al., 2019). Por lo tanto, la  $R_{pro}$  depende de la concentración de sustrato orgánico el cual es producido por otros miembros de la comunidad microbiana como el fitoplancton.

Las mayores respuestas a la adición de  $Fe_d$  y/o vitamina  $B_{12}$  se presentaron cuando las células bacterianas no estaban limitadas por sustrato orgánico. Las adiciones tuvieron un máximo incremento de la  $AB_{pro}$  (hasta 5.2 veces) a las 19.6 horas y de la  $AB_{com}$  (hasta 2.5 veces) a las 23.6 horas. Esto coincide con las mayores abundancias bacterianas que se presentaron durante las 23.6 horas de experimentación. Kirchman et al. (2000) plantearon que la producción de biomasa bacteriana puede estar limitada por carbono orgánico disuelto y solo cuando este compuesto es suficiente otros nutrientes como el  $Fe_d$  pueden verse limitados. Estos datos muestran la relación entre la disponibilidad de sustrato orgánico con la respuesta a la adición de micronutrientes como el  $Fe_d$  y la vitamina  $B_{12}$ .

La estimulación de la abundancia bacteriana en incubaciones donde se tenía a toda la comunidad microbiana podría estar relacionada con un efecto cascada. En las primeras 19.6 horas no hubo diferencias notables entre los tratamientos que contenían micronutrientes y el control. Así mismo no se tuvieron incrementos en la  $AB_{com}$ . Sin embargo, después de dicha hora los tratamientos  $+Fe_d$  y  $+B_{12}$  incrementaron dicha variable hasta 5 y 4 veces, respectivamente. Por lo tanto, sugerimos que en las primeras horas los micronutrientes que suministramos fueron aprovechados principalmente por las células fitoplanctónicas y zooplanctónicas, aumentando su biomasa. No obstante, la excreción, sloppy feeding así como el decaimiento de estas células dejaron en disposición sustrato orgánico para el crecimiento bacteriano (Kirchman, 2008). A este se le conoce como efecto cascada, el cual ha sido anteriormente reportado por Fourquez y colaboradores en el 2014, en incubaciones enriquecidas con  $Fe_d$ . Por lo tanto, podemos concluir que en incubaciones de corta duración el aporte de sustrato orgánico por otros organismos de la comunidad microbiana es esencial en el crecimiento bacteriano.

## 9. Recomendaciones para futuras investigaciones

El desarrollo de este trabajo ha permitido aportar información importante sobre las preguntas de investigación planteadas. Sin embargo, ha arrojado nuevas preguntas para profundizar nuestro entendimiento de la biogeoquímica de los nutrientes y su interacción con las dinámicas microbianas.

Sugerimos que simultáneamente a estudios de este tipo se realice una evaluación de la composición taxonómica de la comunidad microbiana (fitoplancton, zooplancton y bacterias). Esto basándonos en nuestros resultados donde demostramos que los factores biológicos son lo más relevantes en la respuesta de tanto de los procariotas heterótrofos como de la comunidad microbiana a la adición de micronutrientes.

Así mismo, creemos importante añadir dos tratamientos más: uno que contenga solo nitrógeno biodisponible (+N) y otro donde se tenga este elemento combinado con cada uno de los micronutrientes añadidos (+N+Fe<sub>a</sub> y +N+B<sub>12</sub>), con lo cual se podría determinar si en la BTS se presenta colimitación por nitrógeno y micronutrientes.

Por último, con la finalidad de confirmar el efecto cascada en incubaciones de corta duración, proponemos la realización de estudios que evalúen la evolución temporal de la biomasa fitoplanctónica y abundancia bacteriana de manera simultánea.

## 10. Conclusiones

En experimentos de corta duración y temperatura controlada realizados en los meses agosto a noviembre del 2020 y febrero a abril del 2021, la adición de  $\text{Fe}_d$  y/o vitamina  $\text{B}_{12}$  tuvo un efecto variable sobre el metabolismo celular de procariotas heterótrofos y de la comunidad microbiana marina. Las condiciones de bajos índices de surgencia favorecieron el metabolismo de los procariotas heterótrofos de la BTS, con lo cual se presentó mayor respiración al adicionar vitamina  $\text{B}_{12}$  y mayor crecimiento con la adición de  $\text{Fe}_d$ . Bajo condiciones de índices de surgencia altos se favoreció el metabolismo de las comunidades microbianas de la BTS, en donde se observó una mayor tasa de respiración al adicionar  $\text{Fe}_d$  y un mayor crecimiento bacteriano con la adición conjunta de  $\text{Fe}_d$  y  $\text{B}_{12}$ .

Con base en el índice de surgencia BEUTI, el metabolismo de las comunidades microbianas en la BTS presentó una colimitación N- $\text{Fe}_d$ , en especial en presencia de índices de surgencia bajos. Se encontró una dependencia entre el transporte vertical de  $\text{NO}_3$  con las respuestas a las adiciones de  $\text{Fe}_d$  en la respiración celular de las comunidades microbianas de la BTS.

Las condiciones ambientales biológicas *in situ*: abundancia bacteriana y clorofila *a* se relacionaron con las respuestas metabólicas de los procariotas a la adición de  $\text{Fe}_d$  y/o vitamina  $\text{B}_{12}$  en los experimentos realizados en 2020 y 2021. Los índices de surgencia costera (condiciones físicas *in situ*) solo presentaron relación con los tiempos de inicio de la respiración, mientras que las concentraciones *in situ* de  $\text{Fe}_d$  y la vitamina  $\text{B}_{12}$  (condiciones químicas *in situ*) no se relacionaron con las respuestas a la adición de estos micronutrientes. Por lo anterior, se sugiere que en los meses de agosto a noviembre del

2020 y febrero a abril del 2021 las condiciones biológicas *in situ* fueron los principales controles sobre las respuestas metabólicas a la adición de  $Fe_d$  y/o  $B_{12}$ .

Este trabajo es el primero en analizar el efecto de la adición de  $Fe_d$  y/o vitamina  $B_{12}$  sobre dos variables metabólicas (respiración celular y abundancia bacteriana) en procariotas heterótrofos y comunidades microbianas marinas de la BTS. Además, se ha documentado por primera vez la disminución de las tasas de respiración procariota ( $R_{pro}$ ) con la adición de  $Fe_d$  asociado al incremento en la eficiencia de crecimiento bacteriano (BGE).

Finalmente, este estudio muestra la complejidad en la dinámica microbiana que se presenta en la BTS por la adquisición de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$ . Esto debido a los diversos procesos como depredación bacteriana, competencia por micronutrientes e interdependencia de grupos microbianos. El presente trabajo servirá como antecedente para futuros trabajos de limitación de  $Fe_d$  y vitamina  $B_{12}$  en la región en donde el efecto de la adición de estos micronutrientes en el metabolismo celular de procariotas heterótrofos sirva de indicador de limitación.

## 11. Referencias

- Andrews, J. H., & Harris, R. F. (1986). r-and K-selection and microbial ecology. In *Advances in microbial ecology* (pp. 99-147). Springer, Boston, MA.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Baltar, F., Gutiérrez-Rodríguez, A., Meyer, M., Skudelny, I., Sander, S., Thomson, B., Nodder, S., Middag, R., & Morales, S. E. (2018). Specific Effect of Trace Metals on Marine Heterotrophic Microbial Activity and Diversity: Key Role of Iron and Zinc and Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03190>
- Barbeau, K. (2006). Photochemistry of organic iron (III) complexing ligands in oceanic systems. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 1505-1516.
- Barber-Lluch, E., Hernández-Ruiz, M., Prieto, A., Fernández, E., & Teira, E. (2019). Role of vitamin B12 in the microbial plankton response to nutrient enrichment. *Marine Ecology Progress Series*, 626, 29–42. <https://doi.org/10.3354/meps13077>
- Barber-Lluch, E., Joglar, V., Moreiras, G., Leão, J. M., Gago-Martínez, A., Fernández, E., & Teira, E. (2021). Variability of vitamin B12 concentrations in waters along the Northwest Iberian shelf. *Regional Studies in Marine Science*, 42, 101608. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101608>

- Basset, G. J., Latimer, S., Fatihi, A., Soubeyrand, E., & Block, A. (2016). Phylloquinone (Vitamin K1): Occurrence, Biosynthesis and Functions. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(12). <https://doi.org/10.2174/1389557516666160623082714>
- Bertrand, E. M., Saito, M. A., Rose, J. M., Riesselman, C. R., Lohan, M. C., Noble, A. E., Lee, P. A., & DiTullio, G. R. (2007). Vitamin B<sub>12</sub> and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnology and Oceanography*, 52(3), 1079–1093. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.3.1079>
- Bertrand, E., Saito, M., Lee, P., Dunbar, R., Sedwick, P & DiTullio, G. (2011). Iron limitation of a springtime bacterial and phytoplankton community in the Ross Sea: Implications for vitamin B<sub>12</sub> nutrition. *Frontiers in microbiology*, 2: 1-12
- Biller, D. V., & K. W. Bruland. (2014). The central California Current transition zone: A broad region exhibiting evidence for iron limitation, *Progress in Oceanography*, 120, 370-382.
- Bondyale-Juez, D. R., Packard, T. T., Viera-Rodríguez, M. A., & Gómez, M. (2017). Respiration: comparison of the Winkler technique, O<sub>2</sub> electrodes, O<sub>2</sub> optodes and the respiratory electron transport system assay. *Marine Biology*, 164(12), 164-226. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3271-1>
- Bozzato, D., Jakob, T., Wilhelm, C., & Trimborn, S. (2021). Effects of iron limitation on carbon balance and photophysiology of the Antarctic diatom *Chaetoceros* cf. simplex. *Polar Biology*, 44(2), 275–287. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02785-1>

- Bristow, L. A., Mohr, W., Ahmerkamp, S., & Kuypers, M. M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Current Biology*, 27(11), R474-R478. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.030>
- Browning, T. J., Rapp, I., Schlosser, C., Gledhill, M., Achterberg, E. P., Bracher, A., & Le Moigne, F. A. C. (2018). Influence of iron, cobalt, and vitamin B12 supply on phytoplankton growth in the tropical East Pacific during the 2015 El Niño. *Geophysical Research Letters*, 45, 6150–6159. <https://doi.org/10.1029/2018GL077972>
- Buck, K. N., Ross, J. R., Russell Flegal, A., & Bruland, K. W. (2007). A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environmental Research*, 105(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.07.006>
- Calleja ML, Ansari MI, Røstad A, Silva L, Kaartvedt S, Irigoien X & Morán X. (2018). The Mesopelagic Scattering Layer: A Hotspot for Heterotrophic Prokaryotes in the Red Sea Twilight Zone. *Frontier in Marine Science*. 5:259. doi: 10.3389/fmars.2018.00259
- Castro, R y Martínez, A. (2010). Variabilidad espacial y temporal del campo de viento. En: Gaxiola-Castro y R. Durazo. Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California. ISBN: 978-607-7908-30-2
- Cepeda-Morales, J., Durazo, R., Millán-Nuñez, E., De la Cruz-Orozco, M., Sosa-Ávalos, R., Espinosa-Carrerón, L., Soto-Mardones, L., & Gaxiola-Castro, G. (2017).

Response of primary producers to the hydrographic variability in the southern region of the California Current System. *Ciencias Marinas*, 40(2):123–135

Croft, M. T., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2006). Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 1175–1183. <https://doi.org/10.1128/ec.00097-06>

Culley, A. I., & Welschmeyer, N. A. (2002). The abundance, distribution, and correlation of viruses, phytoplankton, and prokaryotes along a Pacific Ocean transect. *Limnology and Oceanography*, 47(5), 1508–1513. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1508>

Debelius, B., Forja, J. M., DelValls, N., & Lubián, L. M. (2010). Toxic effect of copper on marine picophytoplankton populations isolated from different geographic locations. *Scientia Marina*, 74(S1), 133–141. <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74s1133>

Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Díaz, M. A., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S. G., Segovia, J. A., Peña-Manjarrez, J. L., García-Mendoza, E., & Castro, R. (2015). Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO<sub>4</sub> ratio in Todos Santos Bay: A retention site of upwelled waters in the Baja California peninsula, Mexico. *Marine Chemistry*, 168, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.10.010>

Delgadillo-Hinojosa, F., Félix-Bermúdez, A., Torres-Delgado, E. V., Durazo, R., Camacho-Ibar, V., Mejía, A., Ruiz, M. C., & Linacre, L. (2020). Impacts of the 2014–2015 Warm-Water Anomalies on Nutrients, Chlorophyll- *a* and

- Hydrographic Conditions in the Coastal Zone of Northern Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125(12). <https://doi.org/10.1029/2020jc016473>
- Droop, M. R. (1968) Vitamin B12 and marine ecology, IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 48, 689–733
- Ducklow, H., Steinberg, D. & Buesseler, K. (2001). Upper Ocean Carbon Export and the Biological Pump. *Oceanography*, 14(4), 50-58.  
<https://doi.org/10.5670/oceanog.2001.06>
- Durazo, R. (2015). Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(2), 1173-1196.
- Elrod, V. A., K. S. Johnson, S. E. Fitzwater & J. N. Plant. (2008). A long-term, high-resolution record of surface water iron concentrations in the upwelling-driven central California region, *Journal of Geophysical Research*, 113, C11021.
- Espinosa-Carreón, T. L., Gaxiola-Castro, G., Beier, E., Strub, P. T., & Kurczyn, J. A. (2012). Effects of mesoscale processes on phytoplankton chlorophyll off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 117(C4).
- Félix-Bermúdez, A., Delgadillo-Hinojosa, F., Huerta-Diaz, M. A., Camacho-Ibar, V., & Torres-Delgado, E. V. (2017). Atmospheric inputs of iron and manganese to coastal waters of the southern California Current System: Seasonality, Santa Ana winds,

and biogeochemical implications. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 122(11), 9230-9254.

Félix-Bermúdez, A. (2018). Balance de masas de hierro disuelto y su interacción biológica en la Bahía de Todos Santos: un sistema con características retentivas influenciado por la Corriente de California y surgencias costeras. (Tesis doctoral). Ensenada, México: UABC

Félix-Bermúdez, A., F. Delgadillo-Hinojosa, E. V. Torres-Delgado, and A. Muñoz-Barbosa (2020), Does sea surface temperature affect solubility of iron in mineral dust? The Gulf of California as a case study, *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125, e2019JC015999, doi:10.1029/2019jc015999.

Fenchel, T., Blackburn, H., & King, G. M. (2012). *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling (English Edition)* (3.<sup>a</sup> ed). Academic Press. ISBN: 978-0-12-415836-8

Fernández-González, C., Pérez-Lorenzo, M., Pratt, N., Moore, C. M., Bibby, T. S., & Marañón, E. (2020). Effects of Temperature and Nutrient Supply on Resource Allocation, Photosynthetic Strategy, and Metabolic Rates of *Synechococcus* sp. *Journal of Phycology*, 56(3), 818–829. <https://doi.org/10.1111/jpy.12983>

Fourquez, M., Devez, A., Schaumann, A., Guéneuguès, A., Jouenne, T., Obernosterer, I., & Blain, S. (2014). Effects of iron limitation on growth and carbon metabolism in oceanic and coastal heterotrophic bacteria. *Limnology and Oceanography*, 59(2), 349–360. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.2.0349>

- Fourquez, M., Obernosterer, I., Davies, D. M., Trull, T. W., & Blain, S. (2015). Microbial iron uptake in the naturally fertilized waters in the vicinity of the Kerguelen Islands: phytoplankton–bacteria interactions. *Biogeosciences*, *12*(6), 1893–1906. <https://doi.org/10.5194/bg-12-1893-2015>
- Gao, X., Bowler, C., & Kazamia, E. (2021). Iron metabolism strategies in diatoms. *Journal of Experimental Botany*, *72*(6), 2165–2180. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa575>
- García-Martín, E. E., Daniels, C. J., Davidson, K., Davis, C. E., Mahaffey, C., Mayers, K. M., McNeill, S., Poulton, A. J., Purdie, D. A., Tarran, G. A., & Robinson, C. (2019). Seasonal changes in plankton respiration and bacterial metabolism in a temperate shelf sea. *Progress in Oceanography*, *177*, 101884. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.12.002>
- Gobler, C., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G., & Sañudo-Wilhelmy, S. (2007). Effect of B-vitamins (B1, B12) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, *49*, 181–194. <https://doi.org/10.3354/ame01132>
- Gómez-Consarnau, L., Sachdeva, R., Gifford, S. M., Cutter, L. S., Fuhrman, J. A., Sañudo-Wilhelmy, S. A., & Moran, M. A. (2018). Mosaic patterns of B-vitamin synthesis and utilization in a natural marine microbial community. *Environmental Microbiology*, *20*(8), 2809–2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14133>
- Hakspiel-Segura, C., Cajal-Medrano, R., Maske-Rubach, H., & Villegas-Mendoza, J. (2017). Temporal and spatial distribution of transparent exopolymer particles off

the northern coast of Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 43(4).  
<https://doi.org/10.7773/cm.v43i4.2732>

Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2014b). *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter (English Edition)* (2.<sup>a</sup> ed.). Academic Press. ISBN 978-0-12-405940-5

Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E. & Smith, A. G. (2011). Insights into the Evolution of Vitamin B12 Auxotrophy from Sequenced Algal Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2921-2933.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr124>

Herndl, G. J. & Reinthaler, T. (2013). Microbial control of the dark end of the biological pump. *Nature Geoscience*, 6(9), 718-724. <https://doi.org/10.1038/ngeo1921>

Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F., & Azam, F. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8):593–599.

Joglar, V., Pontiller, B., Martínez-García, S., Fuentes-Lema, A., Pérez-Lorenzo, M., Lundin, D., Pinhassi, J., Fernández, E., & Teira, E. (2021). Microbial Plankton Community Structure and Function Responses to Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>1</sub> Amendments in an Upwelling System. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01525-21>

Joglar, V., Prieto, A., Barber-Lluch, E., Hernández-Ruiz, M., Fernández, E., & Teira, E. (2020). Spatial and temporal variability in the response of phytoplankton and

- prokaryotes to B-vitamin amendments in an upwelling system. *Biogeosciences*, 17(10), 2807–2823. <https://doi.org/10.5194/bg-17-2807-2020>
- Johnson, K.S., Gordon, R.M., Coale, K.H., 1997. What controls dissolved iron concentrations in the world ocean?. *Marine Chemistry*. 57: 137–161
- King, A & K. Barbeau. (2011). Dissolved iron and macronutrient distribution in the southern California Current System. *Journal of geophysical Reserch*, 116: 1-18.
- King, A. L., & Barbeau, K. A. (2011). Dissolved iron and macronutrient distributions in the southern California Current System. *Journal of Geophysical Research*, 116(C3). <https://doi.org/10.1029/2010jc006324>
- King, A., Sañudo-Wilhelmy, S., Leblanc, K., Hutchins, D & Fu, F. (2011). CO<sub>2</sub> and vitamin B<sub>12</sub> interactions determine bioactive trace metal requirements of a subarctic Pacific diatom. *International Society for Microbial Ecology*, 5: 1388-1396
- Kirchman, D. L. & Mitchell, R. (2008). *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley.
- Kirchman, D. L., Meon, B., Cottrell, M. T., Hutchins, D. A., Weeks, D., & Bruland, K. W. (2000). Carbon versus iron limitation of bacterial growth in the California upwelling regime. *Limnology and Oceanography*, 45(8), 1681–1688. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1681>
- Kirchman, D., Hoffman, K., Weaver, R., & Hutchins, D. (2003). Regulation of growth and energetics of a marine bacterium by nitrogen source and iron availability. *Marine Ecology Progress Series*, 250, 291–296. <https://doi.org/10.3354/meps250291>

- Koch, F., Hattenrath-Lehmann, T. K., Goleski, J. A., Sañudo-Wilhelmy, S., Fisher, N. S., & Gobler, C. J. (2012). Vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> Uptake and Cycling by Plankton Communities in Coastal Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00363>
- Koch, F., Marcoval, M., Panzeca, C., Bruland, K., Sañudo-Wilhelmy, S & Glober, C. (2011). The effect of vitamin B<sub>12</sub> on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnology and Oceanography*., 56: 1023-1034
- Koch, F., Sañudo-Wilhelmy, S. A., Fisher, N. S., & Gobler, C. J. (2013). Effect of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> on bloom dynamics of the harmful brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *Limnology and Oceanography*, 58(5), 1761–1774. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.5.1761>
- Kurczyn, J. A., Pérez-Brunius, P., López, M., Candela, J., Delgadillo-Hinojosa, F., & García-Mendoza, E.(2019). Water masses and ocean currents over the continental slope off northern Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 124, 2803–2823. <https://doi.org/10.1029/2018JC013962>
- Kuznar, J., Espinoza, J. C., Avaria, S., Valenzuela, M., Pavez, C. & Egaña, M. (2009). Efectos microbiológicos producidos por un evento de surgencia costera en Chile central. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44(1). <https://doi.org/10.4067/s0718-19572009000100019>
- Lalli, C. & Parsons, T. (1997). *Biological Oceanography: An Introduction* (2nd ed.). Butterworth-Heinemann.

- Lauderdale, J. M., Braakman, R., Forget, G., Dutkiewicz, S., & Follows, M. J. (2020). Microbial feedbacks optimize ocean iron availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(9), 4842–4849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917277117>
- Levy, J. L., Stauber, J. L., & Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of The Total Environment*, 387(1–3), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.016>
- Libes, S. (2009). Introduction to Marine Biogeochemistry (2 ed). Academic Press, Elsevier. USA. 909. ISBN: 978-0-12-088530-5.
- Liu, X., & Millero, F. J. (2002). The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, 77(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/s0304-4203\(01\)00074-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4203(01)00074-3)
- Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J & Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 275-285. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0902-7>
- Martin, J y R. Gordon. (1988). Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity. *Deep-Sea Res.* 35: 177-196
- Maske H, Cajal-Medrano R & Villegas-Mendoza, J. (2017). Substrate-limited and -unlimited coastal microbial communities show different metabolic responses with regard to temperature. *Frontier in Microbiology* 8: 2270

- Mateos, E., Marinone, S. G., & Parés-Sierra, A. (2009). Towards the numerical simulation of the summer circulation in Todos Santos Bay, Ensenada, B.C. Mexico. *Ocean Modelling*, 27(1-2), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.ocemod.2008.11.002>
- Méndez-González, L. (2021). Variabilidad espacio-temporal de diatomeas con potencial nocivo y su relación con la distribución de vitamina B12 (particulada y disuelta) en la Bahía Todos Santos, Baja California. (Tesis maestría). Ensenada, México: UABC. 71 pp.
- Monteverde, D.M., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., & Sañudo-Wilhelmy, S.A. (2017). Life's utilization of B Vitamins on early Earth. *Geobiology* 15: 3–18
- Munn, C. B. (2019). *Marine Microbiology: Ecology & Applications* (3rd ed.). CRC Press.
- Navarro-Olache, L. F., Castro, R., Durazo, R., Hernández-Walls, R., Mejía-Trejo, A., Flores-Vidal, X., & Flores-Morales, A. L. (2021). Influence of Santa Ana winds on the surface circulation of Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Atmósfera*, 34(1), 97-109.
- Panzeca, C., Beck, A., Tovar-Sanchez, A., Segovia-Zavala, J., Taylor, G., Gobler, C & Sañudo-Wilhelmy, S. (2009). Distribution of dissolved vitamin B<sub>12</sub> and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85: 223-230.

- Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 943–948.  
<https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943>
- Reyes-Bravo, M. (2014). Variación temporal del cobre disuelto en la zona costera de la bahía de todos santos, baja california. (Tesis doctoral). Ensenada, México: UABC
- Robinson, C. (2008). “Heterotrophic bacterial respiration,” in *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd Edn, ed. D. L. Kirchman (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc).
- Robinson, C. (2019). Microbial Respiration, the Engine of Ocean Deoxygenation. *Frontiers in Marine Science*, 5(January):1–13.
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative Genomics of the Vitamin B12 Metabolism and Regulation in Prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41148–41159.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.m305837200>
- Sandy, M., & Butler, A. (2010). ChemInform Abstract: Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. *ChemInform*, 41(5).  
<https://doi.org/10.1002/chin.201005268>
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., & Flegal, A. R. (1991). Trace element distributions in coastal waters along the US-Mexican boundary: relative contributions of natural processes vs. anthropogenic inputs. *Marine Chemistry*, 33(4), 371-392.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4203\(91\)90078-b](https://doi.org/10.1016/0304-4203(91)90078-b)

- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter, L. S., Durazo, R., Smail, E. A., Gómez-Consarnau, L., Webb, E. A., Prokopenko, M. G., Berelson, W. M., & Karl, D. M. (2012). Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(35), 14041-14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208755109>
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., & Webb, E. A. (2014). The Role of B Vitamins in Marine Biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science*, *6*(1), 339–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100912>
- Sennett, C., Rosenberg, L. E. & Mellman, I. S. (1981). Transmembrane Transport of Cobalamin in Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, *50*(1), 1053-1086. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.005201>
- Shafiee, R. T., Snow, J. T., Zhang, Q. & Rickaby, R. E. M. (2019). Iron requirements and uptake strategies of the globally abundant marine ammonia-oxidising archaeon, *Nitrosopumilus maritimus* SCM1. *The ISME Journal*, *13*(9), 2295-2305. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0434-8>
- Sherr, E. B., Sherr, B. F. & Longnecker, K. (2006). Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *53*(4), 713-725. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2006.02.001>
- Siedlecki, S. A., Banas, N. S., Davis, K. A., Giddings, S., Hickey, B. M., MacCready, P., Connolly, T. & Geier, S. (2015). Seasonal and interannual oxygen variability on

- the Washington and Oregon continental shelves. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(2), 608-633. <https://doi.org/10.1002/2014jc010254>
- Strzepek, R. F., & Harrison, P. J. (2004). Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature*, 431(7009), 689–692. <https://doi.org/10.1038/nature02954>
- Tanahara, S., Canino-Herrera, S. R., Durazo, R., Félix-Bermúdez, A., Vivanco-Aranda, M., Morales-Estrada, E., & Lugo-Ibarra, K. D. C. (2021). Spatial and temporal variations in water quality of Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 173, 113148. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113148>
- Tang, Y. Z., Koch, F., & Gobler, C. J. (2010). Most harmful algal bloom species are vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> auxotrophs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(48), 20756–20761. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009566107>
- Tortell, P. D., Maldonado, M. T., Granger, J., & Price, N. M. (1999). Marine bacteria and biogeochemical cycling of iron in the oceans. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00593.x>
- Twining, B. S., and S. B. Baines (2013), The Trace Metal Composition of Marine Phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, 5: 191-215.
- Vander Woude, A., Largier, J., & Kudela, R. (2006). Nearshore retention of upwelled waters north and south of Point Reyes (northern California). Patterns of surface

temperature and chlorophyll observed in CoOP WEST. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(25–26), 2985–2998.

Villegas-Mendoza, J., Cajal-Medrano, R & H. Maske. (2019). B<sub>12</sub> production by marine microbial communities and *Dinoroseobacter shibae* continuous cultures under different growth and respiration rates. *Aquatic microbial ecology*, 83: 251-262.

Ward, B. B. (2005). Temporal variability in nitrification rates and related biogeochemical factors in Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 292, 97-109.

Yang, P., Yang, H., Lai, D. Y., Jin, B., & Tong, C. (2019). Production and uptake of dissolved carbon, nitrogen, and phosphorus in overlying water of aquaculture shrimp ponds in subtropical estuaries, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21565-21578.

## 12. Material complementario

### Toxicidad celular por reactivo de múltiples elementos

En agosto la  $R_{com}$  no presento diferencias con respecto al control, mientras que la  $R_{pro}$  disminuyo al agregar  $B_{12}$  y aún más al agregar el conjunto de  $B_{12}$  con  $Fe_d$ . El reactivo de  $Fe_d$  utilizado en este experimento es una mezcla de elementos traza entre los cuales se encuentra el cobre. Dicho elemento puede ser tóxico para las células si se encuentra en altas concentraciones (levi et al., 2007; Buck et al., 2007). Desconocemos la concentración *in situ* que teníamos al momento de colectar la muestras, sin embargo, sabemos que en la zona costera de la BTS las concentraciones de cobre pueden ir de 0.9 a 11.9 nM (Reyes-Bravo, 2014) y que agregamos 8.3 pM. Debelius et al. (2010) han encontrado que el cobre también puede ser toxico en bajas concentraciones ( $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por lo cual no descartamos una posible toxicidad en las muestras correspondientes a agosto. Aunado a esto, se ha propuesto que las células pequeñas son más susceptibles al cobre debido a la relación área/volumen, por lo cual las células procariotas quedarían en desventaja frente a las eucariotas (levi et al., 2007; Mann et al., 2002). En los datos aquí presentados podemos ver que el metabolismo de procariotas se ve afectado con la adición de esta mezcla de elementos. Mientras que el de la comunidad microbiana, donde tenemos una mezcla de células pequeñas y grandes, no se ve afectado.