



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**UTILIZACIÓN DE GLUCOSA POR *PROCHLOROCOCCUS*:
CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR Pro1404 Y EFECTOS
METABÓLICOS**

M^a Carmen Muñoz Marín
Tesis Doctoral

NOVIEMBRE 2013

TITULO: *Utilización de glucosa por Prochlorococcus: caracterización del transportador Pro1404 y efectos metabólicos*

AUTOR: *M^a Carmen Muñoz Marín*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**UTILIZACIÓN DE GLUCOSA POR *PROCHLOROCOCCUS*:
CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR Pro1404 Y EFECTOS
METABÓLICOS**

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba , para optar al grado de Doctor en Bioquímica y por la Licenciada

Maria del Carmen Muñoz Marín

DIRECTORES

JESÚS DIEZ DAPENA

Dr. en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

JOSÉ MANUEL GARCÍA FERNÁNDEZ

Dr. en Ciencias Biológicas y Profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

Córdoba, Septiembre de 2013



**TÍTULO DE LA TESIS: UTILIZACIÓN DE GLUCOSA POR PROCHLOROCOCCUS:
CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR PRO1404 Y EFECTOS
METABÓLICOS**

DOCTORANDO/A: MARÍA DEL CARMEN MUÑOZ MARÍN

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de la doctoranda María del Carmen Muñoz Marín para la obtención de su Tesis Doctoral ha sido, en nuestra opinión, de una calidad extraordinaria. El objeto de estudio ha sido la caracterización del transportador de glucosa Pro1404 en la cianobacteria marina *Prochlorococcus*, así como los efectos de la adición de glucosa sobre el metabolismo de la misma, mediante estudios de proteómica (en colaboración con el equipo del Prof. Robert Beynon y la Dra. Guadalupe Gómez Baena, de la University of Liverpool, Reino Unido) y de expresión génica, así como otros aspectos como la concentración de glucógeno o la producción de CO₂. El trabajo ha abarcado una gran variedad de técnicas de bioquímica y biología molecular, tanto en el laboratorio como durante una campaña oceanográfica en el Atlántico para estudiar el transporte de glucosa in situ. La doctoranda ha demostrado durante estos años una enorme capacidad de trabajo, así como una gran motivación y perseverancia en la realización de experimentos científicos. Además, ha desarrollado su formación, no sólo con el aprendizaje de técnicas experimentales de última generación, sino también con la escritura de textos científicos, así como su presentación mediante comunicaciones orales en diversos congresos. Por último, es destacable que a lo largo del trabajo, ha realizado estancias en dos laboratorios de gran prestigio internacional: el del Dr. Ignacio Luque (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla) y el del Prof. Mikhail Zubkov (National Centre for Oceanography, Southampton, Reino Unido), en los que ha obtenido resultados de gran interés. La calidad del trabajo ha quedado demostrada mediante la publicación de un primer artículo en una revista internacional de alto prestigio, como *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, y están en preparación otros que se enviarán a revistas de alto impacto.

MUÑOZ-MARÍN MC, LUQUE I, ZUBKOV MV, HILL PG, DIEZ J & GARCÍA-FERNÁNDEZ J (2013). *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. PNAS 110 (21): 8597-8602.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba 27 de Septiembre de 2013

Firma de los directores

Fdo. José Manuel García Fernández

Fdo.: Jesús Díez Dapena

ABSTRACT

Prochlorococcus is responsible for a significant part of CO₂ fixation in the ocean. It was long considered an autotrophic cyanobacterium, but our group has shown in laboratory experiments that *Prochlorococcus* can take up glucose like a heterotrophic organism.

However, the mechanisms of glucose uptake and its occurrence in the ocean have not been shown. Here we report that the gene *melB* confers capability for glucose uptake in *P. marinus* SS120. We utilized a cyanobacterium unable to take up glucose to engineer strains that express the *melB* gene. These were capable of specific glucose uptake over a wide range of glucose concentrations, showing multiphasic transport kinetics. The K_s constant of the high affinity phase was in the nanomolar range, consistent with the average concentration of glucose in the ocean. Furthermore, we were able to observe glucose uptake by *Prochlorococcus* in the Atlantic Ocean, where glucose concentrations were 0.5-2.7 nM. Therefore *Prochlorococcus* is a photoheterotrophic organism, taking up not only organic compounds with essential elements, but also molecules devoid of such elements, like glucose.

The biogeochemical implications of this finding for the carbon cycle are far reaching, given the global importance of *Prochlorococcus*; they could significantly change the consideration of these cyanobacteria to photoheterotrophs enabled to tune their trophic behavior depending on the circumstances.

RESUMEN

Prochlorococcus es el responsable de una parte significativa de la fijación de CO₂ en el océano. Durante mucho tiempo ha sido considerada una cianobacteria autotrófica, sin embargo estudios previos de nuestro grupo demostraron la capacidad que tiene *Prochlorococcus* de transportar glucosa como un organismo heterótrofo.

No obstante, tanto los mecanismos de transporte de glucosa como el transporte de glucosa en poblaciones naturales de *Prochlorococcus* no se habían mostrado. En este trabajo hemos demostrado la capacidad del gen *melB* de transportar glucosa en la estirpe SS120. Para ello, utilizamos una estirpe incapaz de transportar glucosa en la que clonamos el gen *melB*. Las estirpes recombinantes fueron capaces de transportar glucosa con un amplio rango de concentraciones, mostrando una cinética multifásica. La constante K_s de alta afinidad está en un rango de nanomolar, consistente con las concentraciones que existen en el océano.

Además, en este trabajo hemos demostrado la capacidad de *Prochlorococcus* de transportar glucosa en el Océano Atlántico, donde las concentraciones de glucosa fueron 0,5-2,7 nM. Por tanto, *Prochlorococcus* es un organismo fotoheterotrófico, transportando no sólo compuestos orgánicos con elementos esenciales, sino también moléculas desprovistas de tales elementos, como la glucosa. Las implicaciones biogeoquímicas de este hallazgo para el ciclo del carbono son de gran alcance teniendo en cuenta la abundancia global de *Prochlorococcus* y la posibilidad de cambiar su comportamiento trófico dependiendo de las circunstancias.

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. EL ECOSISTEMA MARINO	3
1.1. Estructura geofísica	3
1.2. La luz en el océano	3
1.3. Estructura térmica	4
1.4. Distribución y concentración de nutrientes	5
1.4.1. Inorgánicos	5
1.4.2. Orgánicos	8
1.4.2.1. Procedencia del material orgánico	10
2. LAS CIANOBACTERIAS MARINAS	14
3. <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	16
3.1. Tamaño y estructura	17
3.2. Aparato fotosintético	17
3.3. Distribución oceánica	19
3.4. Características genómicas	20
4. METABOLISMO DEL CARBONO	21
4.1. El ciclo del carbono	21
4.2. La diversidad del metabolismo del carbono en cianobacterias	23
4.3. Transporte de compuestos orgánicos	28
4.3.1. En cianobacterias	28
4.3.2. En <i>Prochlorococcus</i>	30
5. BALANCE METABÓLICO DEL OCÉANO OLIGOTRÓFICO	33
5.1. Estrategias metabólicas	33
5.2. Controversia actual sobre la producción neta en el océano oligotrófico	34
<u>OBJETIVOS</u>	39
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	40
A. ESTIRPES DE CIANOBACTERIAS	42
B. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	42
1. <i>Prochlorococcus</i>	42

1.1. Medio de cultivo	42
1.2. Condiciones de cultivo	44
1.3. Conservación	45
2. <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	45
2.1. Medio de cultivo	45
2.2. Condiciones de cultivo	45
2.3. Conservación	47
3. <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	47
3.1. Medio de cultivo	47
3.2. Condiciones de cultivo	48
3.3. Conservación	49
4. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	49
4.1. Medio de cultivo	49
4.2. Condiciones de cultivo	49
5. <i>Escherichia coli</i>	49
5.1. Estirpes	49
5.2. Medios de cultivo	50
5.3. Condiciones de cultivo	51
5.4. Conservación	51
C. RECOGIDA DE MUESTRAS MARINAS	51
D. MÉTODOS DE RECOGIDA DE CÉLULAS	52
E. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	52
1. Rotura celular en prensa de French	52
2. Rotura celular por choque térmico	52
3. Rotura celular por perlas de vidrio	53
F. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	53
1. Crecimiento de cianobacterias	53
2. Determinación del espectro de fluorescencia de <i>Prochlorococcus</i>	53
3. Determinación de proteína	54
4. Determinación de clorofila	54
5. Cuantificación de ácidos nucleicos	55
6. Determinaciones enzimáticas	55
6.1. Medida del glucógeno mediante un ensayo acoplado	55

7. Determinación de CO ₂ mediante cromatografía de gases	57
8. Determinación del porcentaje de células contaminantes en los cultivos de <i>Prochlorococcus</i>	58
8.1. Análisis por citometría de flujo	58
8.2. CARD-FISH para muestras de <i>Prochlorococcus</i> en filtros de membrana	60
9. Determinación del transporte de glucosa	64
9.1. Cinéticas del transporte de glucosa	64
9.2. Ensayo de competición de azúcares	65
9.3. Efecto de inhibidores	66
9.4. Transporte de glucosa en poblaciones naturales de <i>Prochlorococcus</i> mediante citometría de flujo	67
G. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE LA TÉCNICA FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)	68
H. BIOENSAYOS PARA ESTIMAR LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN EL OCÉANO ATLÁNTICO	69
I. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	72
1. Preparación de las muestras	72
2. Digestión de los extractos de proteínas con tripsina	72
3. Análisis mediante los espectrómetros de masas: <i>Synapt G1 HDMS (Waters Corporation)</i> y <i>Synapt G2 HDMS (Waters Corporation)</i>	72
4. Cuantificación	73
J. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	73
1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados	73
1.1. Plásmidos no construidos en este trabajo	73
1.2. Plásmidos construidos en este trabajo	74
1.3. Oligonucleótidos utilizados	75
1.3.1. Cebadores para estudiar la expresión mediante PCR en tiempo real en <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	75
1.3.2. Cebadores para la clonación de <i>melB</i> en <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	77
1.3.3. Cebadores para estudiar la expresión de <i>melB</i> mediante PCR en tiempo real en los transformantes CK1 y CK3	78

1.3.4. Cebadores para estudiar la expresión de <i>melB</i> en muestras marinas	78
2. Aislamiento de DNA genómico	79
2.1. Volúmenes de cultivo pequeños	79
2.2. Volúmenes de cultivo grandes	79
3. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	80
4. Aislamiento de RNA en cianobacterias	81
4.1. Extracción con fenol/cloroformo	81
4.2. Extracción con un kit comercial	82
4.3. Extracción en muestras naturales	82
5. Electroforesis de ácidos nucleicos	83
6. Visualización de ácidos nucleicos	84
7. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	84
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	84
9. Purificación de productos de PCR	85
10. Transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) en tiempo real	85
10.1. Transcripción inversa	85
10.2. PCR semicuantitativa en tiempo real	86
10.2.1. Preparación de la PCR en tiempo real	86
10.2.2. Análisis de los datos de la expresión	87
11. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción	88
12. Clonación de fragmentos de DNA	88
12.1. Desfosforilación del vector	88
12.2. Fragmento <i>Klenow</i>	89
12.3. Ligación del DNA	89
12.4. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	89
12.4.1. Preparación de células competentes	89
12.4.2. Transformación por choque térmico	90
12.5. Transformación de células de <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	90
12.6. Secuenciación de DNA	91
12.7. Estudios filogenéticos	91
12.7.1. Con secuencias de todas las cianobacterias	91

12.7.2. Con secuencias del proyecto <i>Global Ocean Sampling</i>	92
<u>K. Aparatos e instrumentos</u>	93
1. Condiciones de esterilidad	93
2. Incubación de cultivos	93
3. Centrífugas y rotores	93
4. Determinaciones espectrofotométricas	94
5. Determinación de pH	94
6. Pesadas	94
7. Agitación de soluciones	94
8. Destilación de agua	95
9. Termostatación	95
10. Refrigeración	95
11. Fuentes de alimentación	95
<u>RESULTS AND DISCUSSION</u>	96
<u>1. Study and characterization of the mechanism of glucose uptake</u>	96
1.1. Construction of recombinant <i>Synechococcus elongatus</i> . PCC 7942 strains	98
1.2. ¹⁴ C-Glucose uptake in recombinant strains of <i>S. elongatus</i> PCC 7942	101
1.2.1. Determination of <i>melB</i> expression in recombinant strains by semiquantitative real time RT-PCR	102
1.3. Recombinant <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 strain CK1	104
1.3.1. Glucose uptake kinetics	104
1.3.2. Specificity of the Pro1404 transporter	106
1.4. <i>Prochlorococcus marinus</i> SS120	107
1.4.1. Glucose uptake kinetics	107
1.4.2. Effect of inhibitors on the glucose uptake	110
1.5. <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	114
1.5.1. Glucose uptake kinetics	114
1.6. Sequence features and phylogenetic analysis of Pro1404 in cyanobacteria	117

<u>2. Glucose uptake in natural <i>Prochlorococcus</i> populations</u>	120
2.1. Estimation of the glucose concentration in the Atlantic Ocean by bioassays	122
2.2. Determination of glucose uptake by natural <i>Prochlorococcus</i> populations using FACS (fluorescence activated cell sorting)	125
2.3. Expression of <i>melB</i> in natural <i>Prochlorococcus</i> populations in the Atlantic Ocean	131
2.3.1. Identification of glucose uptake genes in GOS samples	135
<u>3. Effect of glucose addition on the metabolism of <i>Prochlorococcus</i></u>	138
3.1. Changes in the expression of genes related to glucose metabolism in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	140
3.2. Changes in the proteome of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 promoted by the presence of glucose	144
3.2.1. Optimization of method of cell disruption and proteins identified at 5 h with <i>Synapt HDMS G1</i>	146
3.2.2. Changes in the proteome at 24 h with <i>Synapt HDMS G2</i>	153
3.3. Changes on some enzymes and metabolites	160
3.3.1. Effect of glucose addition on the glycogen content	160
3.3.2. Effect of glucose addition on CO ₂ production	161
<u>CONCLUSIONS</u>	166
<u>BIBLIOGRAPHY</u>	169
<u>NOTES</u>	188

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas en el mar en función de la luz penetrante	4
Figura 2. Esquema general de la importancia de la fijación de nitrógeno en el océano	7
Figura 3. Producción primaria anual estimada a partir de valores de Chl-a superficial	11
Figura 4. Representación esquemática del flujo de materia orgánica hacia el fondo del océano	13
Figura 5. Modelos celulares de la estirpe MIT9313 obtenidos mediante tomografía crioeléctrica	18
Figura 6. Distribución vertical de los cuatro ecotipos principales en bajas y altas latitudes en el Océano Atlántico	20
Figura 7. Ciclo del carbono en medio aeróbico y anaeróbico	22
Figura 8. Rutas del metabolismo del carbono en cianobacterias	27
Figura 9. Intercambios metabólicos, transformaciones y procesos relacionados en la superficie del océano que intervienen en el balance entre autotrofia y heterotrofia	36
Figura 10. Cámara de cultivos de <i>Prochlorococcus</i> y <i>Synechococcus</i>	44
Figura 11: Ensayo acoplado de la hexoquinasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	57
Figura 12. Citogramas obtenidos de un cultivo de <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 y de <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	59
Figura 13. Esquema de la técnica CARD-FISH	63
Figura 14. Citograma obtenido de una muestra natural (CTD 35, 47 m)	69
Figura 15. Mapa del trayecto durante la campaña	70
Figura 16. Estimación de la concentración de glucosa mediante bioensayos	71
Figura 17. Localizaciones de las muestras recogidas durante el proyecto GOS	93
Figure 18. Outline of the strategy used to construct the recombinant <i>Synechococcus elongatus</i> strains used in this work	99
Figure 19. Genomic structure of the recombinant strains analysed by PCR	101
Figure 20. ¹⁴ C-Glucose uptake in recombinant strains of <i>S. elongatus</i> sp. PCC	102

7942 expressing the gene <i>melB</i> from <i>P. marinus</i> SS120	
Figure 21: RT-PCR of the recombinant strains	103
Figure 22. Kinetics studies of glucose uptake in <i>S. elongatus</i> C.K1 strain	105
Figure 23. ¹⁴ C-Glucose uptake in <i>S. elongatus</i> C.K1 in the presence of additional concentrations of different sugars	107
Figure 24. Kinetics studies of glucose uptake in cultures of <i>P. marinus</i> SS120	109
Figure 25. Different mechanisms of active transport	110
Figure 26. Effect of different inhibitors on glucose uptake in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	112
Figure 27. Effect of the inhibitors DCMU and DBMIB on the photosynthetic electron transport chain	113
Figure 28. Effect of DCMU and DBMIB on glucose uptake in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	113
Figure 29. Kinetics studies of glucose uptake in <i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	116
Figure 30. Neighbour-Joining phylogenetic tree of <i>melB</i> based on protein sequence similarity with the sequences of all the cyanobacteria	118
Figure 31. Relation between the glucose concentration found in the sea and the total glucose uptake in bacteria	123
Figure 32. ³ H-Glucose uptake in bacteria in the presence of additional concentrations of different sugars	125
Figure 33. Outline of the Atlantic Meridional Transect 21 cruise	126
Figure 34. Flow cytometric scatter plot showing a signature of <i>SYBR Green I</i> -stained DNA picoplankton from stations 15, 35 and 38 of the AMT-21 cruise	127
Figure 35. ³ H-Glucose uptake vs. number of sorted <i>Prochlorococcus</i> or total bacterioplankton cells	128
Figure 36. Glucose uptake in bacteria measured during the transect for the Atlantic Ocean in the stations marked	129
Figure 37. Relative expression of <i>melB</i> in natural samples of <i>Prochlorococcus</i> obtained during the AMT-21 cruise	133
Figure 38. Stations where <i>melB</i> expression was observed during the AMT-21 cruise	134

Figure 39. Relation between the glucose concentration found in the sea and the <i>melB</i> expression in natural samples of <i>Prochlorococcus</i>	135
Figure 40. Neighbour-Joining phylogenetic tree of <i>melB</i> based on protein sequence similarity with the GOS sequences	137
Figure 41. The central metabolic pathway genes of <i>Prochlorococcus</i> investigated in this study	141
Figure 42. Effect of glucose addition on the gene expression of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	142
Figure 43. Effect of different glucose concentration on three genes of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	143
Figure 44. Effect of different glucose concentration on the <i>melB</i> expression of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	144
Figure 45. SDS-PAGE (12%) showing pre-digestion and post-digestion of the samples after glucose addition at 5 h	146
Figure 46. Venn diagrams showing the number of proteins identified with both disruption methods	147
Figure 47. BPI (base peak intensity) chromatograms of control samples vs samples after glucose addition	148
Figure 48. SDS-PAGE (12%) showing pre-digestion and post-digestion of the samples after glucose addition at 24 h	154
Figure 49. Venn diagrams showing the number of proteins identified with the <i>Synapt G2</i> system at 24 h	155
Figure 50. Graph of enrichment score of proteins identified in the presence of glucose	156
Figure 51. Comparative study of the main proteins in control and glucose cultures	159
Figure 52. Effect of glucose addition on the CO ₂ production in different cultures of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	162
Figure 53. Effect of glucose addition on the CO ₂ production in different cultures of <i>Prochlorococcus</i> sp. MED4	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de especies inorgánicas de nitrógeno en el océano	6
Tabla 2. Características de los genomas secuenciados de las estirpes de <i>Prochlorococcus</i>	21
Tabla 3. Estrategias metabólicas	33
Tabla 4. Composición del medio PCR-S11	43
Tabla 5. Preparación de la solución de metales traza: “Gaffron+Se”	43
Tabla 6. Preparación del medio ASW	46
Tabla 7. Estirpes recombinantes de <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	47
Tabla 8. Preparación del medio BG11	48
Tabla 9. Estirpe de <i>E. coli</i> utilizada en este trabajo	50
Tabla 10. Componentes del ensayo HQ-G6PDH	56
Tabla 11. Solución de lisozima	61
Tabla 12. Tampón de hibridación	61
Tabla 13. Tampón de lavado	62
Tabla 14. Tampón de amplificación CARD	63
Tabla 15. Muestras de mar recogidas durante la campaña oceanográfica AMT-21 para la realización de ensayos de competición de azúcares	66
Tabla 16. Inhibidores utilizados para el estudio del transporte de glucosa	67
Tabla 17. Plásmidos no construidos en este trabajo	74
Tabla 18. Plásmidos construidos en este trabajo	75
Tabla 19. Cebadores para estudiar la expresión en <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	76
Tabla 20. Cebadores para la clonación de <i>melB</i>	77
Tabla 21. Cebadores para estudiar la expresión de <i>melB</i> en los transformantes	78
Tabla 22. Cebadores para estudiar la expresión de <i>melB</i> en muestras marinas	78
Tabla 23. Componentes de la solución 1, 2 y 3	81
Tabla 24. Composición de las soluciones para la electroforesis en gel de agarosa	84
Tabla 25. Protocolo común de amplificación utilizado en la PCR	85
Tabla 26. Composición de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real	87

Table 27. Protocolo de amplificación utilizado en la PCR en tiempo real	87
Table 28. Concentrations, microbial uptake rates and turnover times of glucose in the Atlantic Ocean	124
Table 29. ³ H-Glucose uptake determined onboard during the AMT-21 cruise	127
Table 30. <i>Prochlorococcus</i> abundances during the cruise AMT-21 cruise	131
Table 31. CTD casts sampled for RNA	132
Table 32. Protein concentration of the samples obtained with different disruption methods	146
Table 33. Effect of glucose addition on proteins involved in the metabolism of the glucose in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	150
Table 34. Effect of glucose addition on proteins involved in the photosynthesis in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	151
Table 35. Effect of glucose addition on regulatory proteins in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	152
Table 36. Effect of glucose addition on proteins involved in the synthesis of new proteins of <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	153
Table 37. Protein concentration in the presence of 0.1 μM of glucose in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	154
Table 38. Effect of glucose addition on the proteins involved in the metabolism of the glucose in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h	155
Table 39. Effect of glucose addition on regulatory proteins in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	157
Table 40. Effect of glucose addition on proteins involved in the synthesis of new proteins in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120 at 24 h.	158
Table 41. Effect of glucose addition on the glycogen content in <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120.	161

ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina 5'-difosfato
Amp^r	resistencia a ampicilina
AMT	Atlantic Meridional Transect
RNA	ácido ribonucleico
RNA^m	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPasa	adenosina trifosfatasa
BPI	base peak intensity
CARD	catalyzed reporter deposition
CCCP	m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
Ct	ciclo umbral
CTD	Conductivity Temperature Depth
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DCCD	diciclohexilcarbimida
DMSO	dimetil sulfóxido
DMSP	dimetilsulfoniopropionato
ROS	especies reactivas de oxígeno
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fd	ferredoxina
FISH	hibridación fluorescente <i>in situ</i>
HEPES	ácido N-(2-hidroxiethyl) piperacina N'-(etanosulfónico)
kb	kilo pares de bases
LB	Luria-Bertani
Mb	mega pares de bases
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NAG	North Atlantic Gyre
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehido

PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
Pi	ortofosfato inorgánico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción inversa seguida de PCR
Rubisco	ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SAG	South Atlantic Gyre
SD	Standard Deviation
SDS	dodecil sulfato sódico
SSC	side scatter
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Std	Station
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletildiamina
Tris base	tris-(hidroximetil)-amino metano

INTRODUCCIÓN

1. EL ECOSISTEMA MARINO

1.1 Estructura geofísica

Podemos distinguir en el océano dos grandes áreas: la zona pelágica y la zona bentónica (Strahler, 1992). La primera corresponde a la totalidad de la masa de agua oceánica, subdividiéndose a su vez en dos grandes regiones: nerítica (aguas someras o de poco fondo, localizadas a lo largo de la costa) y oceánica (aguas profundas o mar abierto). La región oceánica comienza en el borde de la plataforma continental, justo cuando acaba la región nerítica (zona marítima, cercana a la costa).

Dentro de la región oceánica podemos distinguir varias zonas en base a su profundidad:

- Epipelágica: masa oceánica comprendida entre la superficie y los 200 metros de profundidad.
- Mesopelágica: hasta los 1000 metros aproximadamente.
- Batipelágica: entre los 1000 y 4000 metros de profundidad.
- Abisopelágica: zona más profunda de los océanos.

La zona bentónica está constituida por la masa de tierra que forma las costas y fondos marinos. Dicha zona puede subdividirse a su vez en:

- Litoral: Situada hasta los 200 m de profundidad. Está comprendida por la parte supralitoral, la intermareal y la sublitoral.
- Batial: Es el fondo oceánico comprendido entre el borde de la plataforma continental y el pie del talud (aproximadamente entre 200-400 metros).
- Abisal: Esta región llega hasta las profundidades de las grandes llanuras oceánicas (unos 6000 metros aproximadamente).
- Hadal: Región más profunda encontrándose en las fosas oceánicas a profundidades superiores a seis o siete mil metros.

1.2 La luz en el océano

La luz que penetra en el océano es indispensable para el desarrollo de la vida marina (García-Pichel, 1998). Las radiaciones que forman la luz son absorbidas por el agua de mar y le transmiten calor. Esta absorción es selectiva y depende de la longitud de onda de la radiación.

Dentro del espectro visible, la absorción es máxima para el rojo y mínima para el verde-azul. La infrarroja transporta la mayor parte de la energía calorífica, y se absorbe prácticamente en el primer metro de agua. Esto provoca que en aguas profundas el extremo rojo del espectro esté ausente mientras el verde-azul se hace más visible, incluso hasta 400 m. En función de la luz penetrante podemos distinguir verticalmente dos zonas (Figura 1):

- Zona fótica: Se extiende desde la superficie hasta unos 200 m de profundidad y es la zona donde se queda retenida el 99% de la energía de la luz incidente. A su vez la zona fótica se divide en dos estratos: la zona eufótica, de los 0 a los 100 metros aproximadamente, y la zona disfótica, de los 100 a los 200 metros más o menos.
- Zona afótica: comienza a los 200 metros y se extiende hasta los 4000 metros de profundidad, donde la luz penetrante es insignificante.

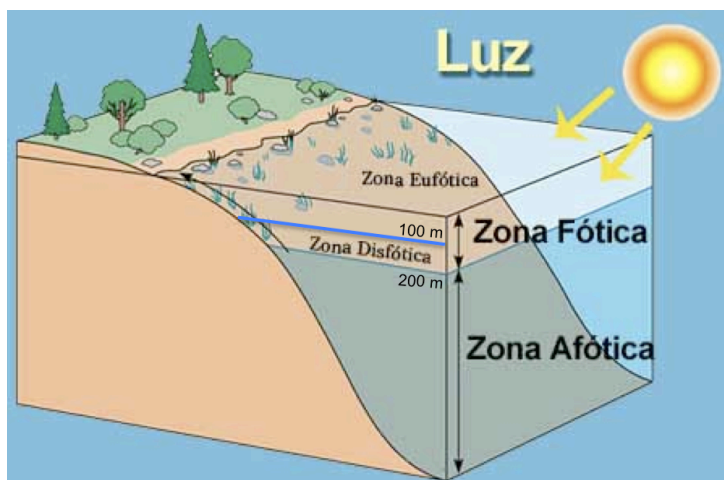


Figura 1: Zonas en el mar en función de la luz penetrante. Imagen modificada de http://cidta.usal.es/cursos/agua/modulos/conceptos/uni_03/u5c1s1.htm

1.3 Estructura térmica

La temperatura es un factor determinante de la distribución ecológica de las diversas especies de organismos marinos. Conforme la profundidad aumenta van penetrando menos radiaciones, por lo que la temperatura disminuye, formándose una capa de agua relativamente caliente en la superficie, con una temperatura uniforme que puede extenderse de los 20 a los 500 metros de profundidad (Cifuentes Lemus *et al.*, 2003). A continuación de esta zona existe una zona limítrofe a partir de la cual aparece un rápido descenso de la temperatura; esta zona limítrofe es la termoclina, que

separa a estas aguas superficiales, menos densas y menos salinas, de las aguas de las profundidades, más frías, densas y salinas.

En latitudes bajas, el agua superficial está sometida a una radiación solar intensa durante todo el año, y en las latitudes medias, esto ocurre sólo en verano. Bajo estas condiciones de radiación, la temperatura oceánica puede estructurarse de forma general en tres capas (Strahler, 1992):

1. Capa superficial o capa de mezcla: puede considerarse isoterma al presentar una temperatura uniforme de 20-25°C, algo mayor en latitudes ecuatoriales. Puede alcanzar hasta los 500 m de profundidad.
2. Termoclina: abarca desde los 500 hasta los 1000 metros.
3. Capa profunda: la temperatura disminuye más lentamente desde los 5 °C hasta 1 °C en las profundidades del fondo.

Sin embargo en las altas latitudes ocurre todo lo contrario, el enfriamiento de las aguas superficiales hace aumentar su peso y, por lo tanto, se hunden haciendo aflorar las aguas más templadas, ocasionando con ello movimientos llamados conectivos, lo que produce la homogeneidad de la temperatura (Cifuentes Lemus et al., 2003).

Además de observarse variaciones anuales de temperatura dependiendo de la absorción del calor recibido por la luz y de la profundidad, también se han presentado variaciones de la temperatura en función de las distintas estaciones, registrándose un máximo al comienzo del otoño y un mínimo al inicio de la primavera.

Finalmente, también se han presentado variaciones de la temperatura del agua del mar a través de largos periodos de tiempo en determinadas regiones del océano. Por ejemplo, en el Atlántico Norte se ha podido registrar un ligero calentamiento de sus aguas que se inició a partir del año 1990 (Robson & Sutton, 2012).

1.4 Distribución y concentración de nutrientes

1.4.1 Inorgánicos

Las concentraciones de nutrientes inorgánicos en la zona eufótica en el océano abierto se encuentran normalmente en un rango de nanomolar-micromolar y varían considerablemente en el espacio y el tiempo, sin embargo, todas sus formas comparten unas concentraciones relativamente altas en las zonas costeras y afloramientos subacuáticos y menores en las aguas intertropicales.

El nitrógeno inorgánico existe en una variedad de formas moleculares, fases y estados redox (Capone, 2000). La mayor parte se encuentra en forma gaseosa en la atmósfera, y se fija a través de procesos físicos, como la formación de óxido de nitrógeno durante las tormentas; o mediante procesos biológicos, por organismos capaces de fijar nitrógeno (Capone *et al.*, 2006) (Tabla 1). No sólo el nitrógeno molecular es requerido como nutriente esencial para el crecimiento sino que otros sustratos nitrogenados como NH_4^+ , NO_3^- y DON (nitrógeno orgánico disuelto) también sirven como fuentes de nitrógeno importantes para las bacterias. Además, bajo condiciones anóxicas, algunas formas oxidadas de nitrógeno como son NO_3^- y NO_2^- , pueden también actuar como aceptores de electrones durante la oxidación bacteriana de la materia orgánica (desnitrificación) o del amonio (Capone, 2000, Kuypers *et al.*, 2003).

Tabla 1. Concentraciones de especies inorgánicas de nitrógeno en el océano (Capone, 2000).

<i>Forma</i>	<i>Concentraciones típicas (μM)</i>		<i>Cantidades globales (Pg = 10^{15} g)</i>
	<i>Oceánica</i>	<i>Costera</i>	
<i>Especies gaseosas</i>			
Nitrógeno molecular (N_2)	900 - 1.100	900 - 1.100	22 - 23 x 10^3
Óxido nitroso (N_2O)	0,006 - 0,070	0 - 0,25	0,2 - 0,8
Óxido nítrico (NO)	?	?	?
<i>Especies sólidas</i>			
Nitrato (NO_3^-)	<0,03 - >40	<0,1 - 200	570 - 677
Nitrito (NO_2^-)	<0,03 - 0,1	<0,03 - 10	-

El mayor reservorio de nitrógeno en los océanos lo constituye el N_2 disuelto, que se encuentra en concentraciones cercanas a 1 mM (Capone, 2000, Sharp, 1983). Tanto el N_2 como el NO_3^- poseen una distribución común, con concentraciones bajas en la zona eufótica (<0,03-10 μM) y altas en la zona afótica (30-40 μM). En las zonas tropicales y subtropicales el nitrato se encuentra a veces en muy bajas concentraciones

(< 10 nM), sugiriendo que este compuesto podría limitar el crecimiento del plancton (Nagata, 2008). Otra forma nitrogenada común en el océano es el nitrito, el cual se encuentra en menor concentración que el nitrato, aunque su concentración aumenta en la base de la zona eufótica de las áreas del mar abierto (Dore & Karl, 1996).

La fijación de nitrógeno en el océano es globalmente importante debido a que es la única forma de aumentar su contenido en el océano, a diferencia del regenerado a partir de la materia orgánica existente en aguas superficiales y que es exportado a zonas profundas por un proceso comúnmente llamado bomba biológica (Eppley & Peterson, 1979, Sohm *et al.*, 2011) (Figura 2).

El fósforo es un nutriente esencial que juega un papel vital en el mantenimiento y las transformaciones de la energía celular, en la estructura de la membrana y en el intercambio genético. La concentración de ortofosfato en océano abierto varía de nanomolar a micromolar. En los giros oceánicos donde el intercambio de nutrientes es bajo, las concentraciones eufóticas de PO_4^{3-} son muy bajas, a veces menos de 30 nM (Bjorkman *et al.*, 2000, Karl & Tien, 1992, Van Den Broeck *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2000).

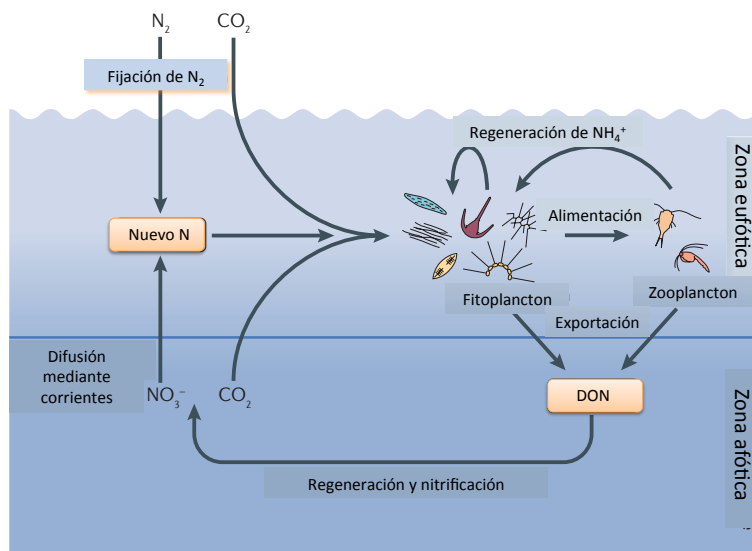


Figura 2. Esquema general de la importancia de la fijación de nitrógeno en el océano (Sohm *et al.*, 2011).

Un dato interesante es que la concentración de fosfato y la de nitrógeno se mantienen proporcionales, dentro de unos límites que varían en función de la zona de la que se trate (Bruland, 1980, Landing & Bruland, 1987).

Finalmente, el manganeso, hierro, zinc, cobalto y níquel son esenciales, incluso en cantidades trazas, desde concentraciones picomolares a nanomolares (Bruland *et al.*, 1991, Brand *et al.*, 1983, Bruland & Lohan, 2004). Estas bajas concentraciones restringen el crecimiento del fitoplancton en grandes regiones del mar abierto.

De estos metales trazas, el hierro es la forma más reactiva que se encuentra en el océano (Bruland *et al.*, 1991), encontrándose en concentraciones alrededor de 0,15-0,3 nM tanto en zonas superficiales como profundas del océano Pacífico, mientras que su concentración aumenta hasta 0,5-2 nM en las aguas intermedias de la zona eufótica (Arrigo, 2005, Bruland, 1980).

1.4.2 Orgánicos

Existen dos tipos de materia orgánica, la disuelta (DOM) y la particulada (POM). El material disuelto se define arbitrariamente, generalmente, como aquel material orgánico que pasa a través de filtros con tamaños de poro de 0,2 a 0,45 μm , mientras que el particulado queda retenido (Sharp, 1973). La mayor fracción de DOM excretada por el fitoplancton en el mar está constituida por moléculas pequeñas, menos de 1.000 Da (Jensen, 1983, Lancelot, 1984); de hecho, tan sólo entre un 20 y 30 % de la materia orgánica disuelta es de alto peso molecular (Carlson *et al.*, 1985) y esta fuente es rica en carbohidratos (25%-50%) (Benner *et al.*, 1992).

Las concentraciones de la fuente de carbono orgánico disuelto (DOC), nitrógeno (DON) y fósforo (DOP), tienden a ser elevadas en la superficie y a disminuir verticalmente, conforme aumenta la profundidad y se aleja de su principal fuente, la producción fotosintética. Las concentraciones de DOC se encuentran entre 60 y 90 μM y disminuyen en torno a 40 μM en profundidad (Hansell, 2002). Las zonas tropical y subtropical (40°N - 40°S) presentan valores altos de DOC, entre 70 y 80 $\mu\text{mol C kg}^{-1}$, en ellas la estratificación vertical de la columna de agua favorece la lenta acumulación de la materia orgánica resistente a la degradación. Concentraciones más bajas (40-50 $\mu\text{mol C kg}^{-1}$) se han observado en las zonas subpolares y en el océano circumpolar sur (> 50°S), donde la baja concentración de DOM es consecuencia de las constantes mezclas en el agua. La estratificación de las aguas en el océano Ártico y el aporte de materia orgánica terrestre debido a las frecuentes lluvias y del aporte de los ríos, hace que la superficie esté enriquecida en carbono orgánico alcanzando

concentraciones de 70-100 μM (Bussmann & Kattner, 2000, Dittmar & Kattner, 2003, Hansell *et al.*, 2009).

Las mayores concentraciones de DON y DOP se encuentran en la superficie, entre 5 y 6 μM en el caso de DON y 0,1-0,5 μM en el de DOP. Estas concentraciones fueron difíciles de medir en las profundidades, encontrándose concentraciones de 2-4 μM para DON y para el DOP de 0,02-0,2 μM (Bronk, 2002). La mayoría de las investigaciones se han centrado en estudiar y evaluar la importancia de la fuente de carbono oceánico (DOC); sin embargo, DON y DOP juegan un papel importante en la nutrición bacteriana.

Se definen tres clases de DOM en los océanos: lábil, semi-lábil y resistente, dependiendo de los tiempos de permanencia en el océano. Los compuestos lábiles son rápidamente consumidos (desde minutos a días) como aporte al crecimiento de bacterias; las concentraciones de sustratos lábiles son muy bajas, nanomolares, debido a su rápido consumo y comprenden menos de un 1% del carbono orgánico disuelto total en la superficie de los océanos. Los sustratos semi-lábiles son consumidos en una escala de tiempo de semanas a meses, con concentraciones de 20-30 μM , a diferencia de los sustratos resistentes a la degradación, que persisten desde años a milenios llegando a concentraciones de hasta 40 μM , experimentando pequeñas variaciones con la profundidad (Nagata, 2008).

Los componentes más comunes de materia orgánica disuelta son carbohidratos (poli y monosacáridos), proteínas y lípidos. En el océano abierto las concentraciones de monosacáridos son generalmente bajas, entre 0,002 y 0,8 μM , siendo la glucosa el azúcar simple más abundante. En algunos ambientes la glucosa es rápidamente consumida (horas a días), sin embargo en otros ecosistemas, el tiempo de renovación de la glucosa es más lenta, incluso de cientos de días (Nagata, 2008, Amon & Benner, 1994, Ogawa & Tanoue, 2003, Ogawa *et al.*, 2001).

Las concentraciones de polisacáridos disueltos son al menos 10 veces mayores que las de los monosacáridos, sin embargo el ciclo de degradación de estos sustratos es más lento que el de los azúcares simples (Benner, 2002). Los lípidos disueltos en el océano en su mayoría son ácidos grasos, pero también se encuentran otros lípidos como los esteroides, fosfolípidos, hidrocarburos etc., los cuales representan una concentración mas baja.

Los aminoácidos se pueden encontrar de forma libre apareciendo en muy bajas

concentraciones con valores de 0,001-0,1 μM (Benner, 2002), o de forma combinada junto a pequeñas proteínas y péptidos, azúcares, y absorbidos en ácidos húmico y fúlvico (Lytle & Perdue, 1981).

La alta velocidad del transporte de los aminoácidos por las bacterias, al igual que el de la glucosa, tiene como consecuencia un rápido consumo. Los aminoácidos que podemos encontrar en el mar son preferentemente glicina, arginina, alanina, fenilalanina y serina (Benner, 2002).

Las concentraciones de amonio son generalmente menores a 0,05 μM en aguas oligotróficas. La asimilación de NH_4^+ por las bacterias parece ser un componente importante en el ciclo del nitrógeno (Kirchman & Wheeler, 1998, Kirchman *et al.*, 1989, Wheeler & Kirchman, 1986). Las bacterias poseen sistemas de transporte de amonio muy eficientes (Flynn *et al.*, 1997, Schlee & Komor, 1986), además la proporción de amonio transportado por las bacterias heterotróficas tiende a incrementarse cuando disminuye la concentración de amonio (Suttle *et al.*, 1990), quizás como consecuencia de la posible competencia con otras bacterias.

Por último, otra fuente de materia orgánica importante es la urea encontrándose en el océano a concentraciones que oscilan entre 0,1 y 2 μM .

1.4.2.1 Procedencia del material orgánico

La materia orgánica marina deriva predominantemente de la producción primaria fotosintética en la capa eufótica del océano; otros procesos de producción como la fotosíntesis de macroalgas en áreas costeras, o la quimiosíntesis en las chimeneas hidrotermales o en ambientes con bajo contenido de oxígeno pueden ser localmente importantes, pero no a escala global comparados con la fotosíntesis del fitoplancton, que representa el 95% de la producción primaria oceánica total (Killops & Killops, 1993) (Figura 3).

Se ha observado que las floraciones de fitoplancton en el mar mantienen una relación con los cambios físico-químicos del agua del mar, a través de la redistribución de los macronutrientes inorgánicos (McAllister *et al.*, 1961) y de la síntesis y excreción de compuestos orgánicos (Jenkinson & Biddanda, 1995).

La DOM se libera del fitoplancton por al menos tres mecanismos diferentes: liberación extracelular directa durante el crecimiento (entre el 2 y el 10% en células creciendo exponencialmente, siendo mayor en presencia de luz (Jones *et al.*, 1996));

liberación durante la depredación por organismo heterótrofos (zooplancton), y liberación durante la lisis viral de las células (Nagata, 2000b, Nagata, 2008, Sharp, 1977).

Experimentos en cultivos han demostrado que el fitoplancton marino aislado libera como productos fotosintéticos materia orgánica, incluyendo carbohidratos (mono, oligo y polisacáridos), componentes nitrogenados (aminoácidos, proteínas y polipéptidos) lípidos (ácidos grasos), ácidos orgánicos (glicolato, ácidos tricarbónicos, hidroximato) hormonas y vitaminas (Duursma, 1965, Fogg, 1983). Mediante el crecimiento de fitoplancton en cultivos se han observado excreciones de carbohidratos en forma de exopolímeros en grandes cantidades (Guillard & Wangersky, 1958, Eberlein *et al.*, 1983) además de haberse observado en su medio natural (Ittekkot *et al.*, 1981).

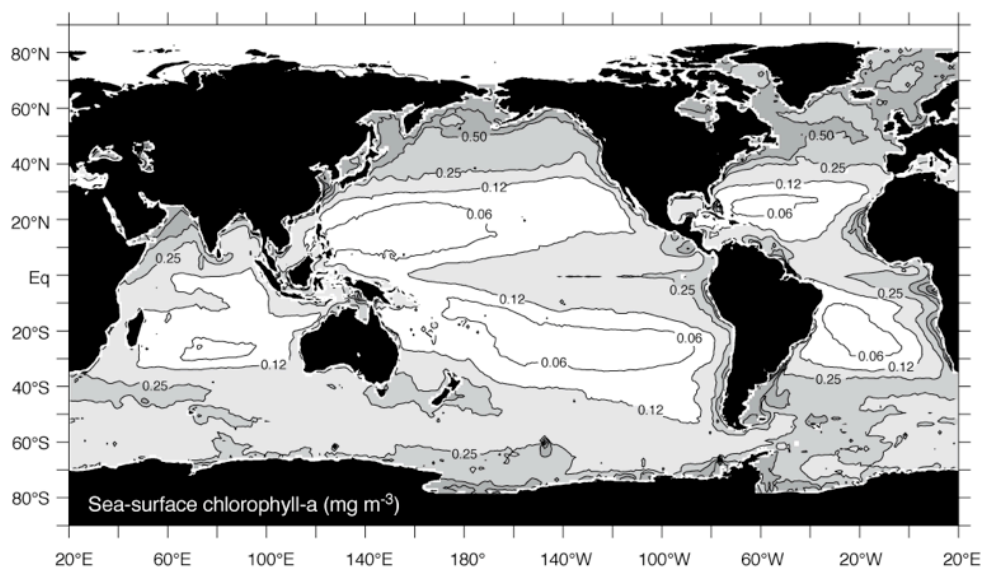


Figura 3. Producción primaria anual estimada a partir de valores de Chl-a superficial según (Sarmiento & Gruber, 2006) modificado por Igarza Tagle, 2012

La predominancia de carbohidratos excretados por el fitoplancton puede ser una de las razones por la que un 25-50% de la DOM de alto peso molecular está compuesta por polisacáridos (Benner *et al.*, 1992). Existen dos clases de comunidades que se alimentan del fitoplancton: protozoos y metazoos, llamadas comúnmente zooplancton. Los protozoos comen principalmente fitoplancton pequeño y bacterias,

mientras que los metazoos se alimentan de fitoplancton de mayor tamaño.

Los protozoos pueden liberar entre 10 y 30% de la materia orgánica ingerida como materia orgánica disuelta (Nagata & Kirchman, 1992, Chase & Price, 1997, Strom *et al.*, 1997, Ferrier-Pagès *et al.*, 1998). Estos valores sugieren que los protozoos son potencialmente una fuente de nutrientes dominante en algunas regiones de los océanos donde abunda fitoplancton de pequeño tamaño y por tanto dando lugar a concentraciones mayores de carbono orgánico disuelto (Sherr & Sherr, 1994).

Existen distintos modos de liberación de DOM por el zooplancton: durante la alimentación, vía excreción (amonio o urea) y por evacuación de heces (Nagata, 2000a, Moller, 2007, Lampert, 1978, Grace *et al.*, 2011, Nagata, 2000b).

Los protozoos pueden contribuir a la liberación de compuestos de materia orgánica disuelta, ricos en elementos nutricionales incluyendo nitrógeno y carbono, como los aminoácidos (Ferrier-Pagès *et al.*, 1998, Nagata & Kirchman, 1991, Ammerman & Azam, 1985), fósforo orgánico disuelto como DNA (Turk *et al.*, 1992) o grandes cantidades de hierro (Tortell *et al.*, 1996). Por otra parte, las bacterias y cianobacterias pueden excretar metabolitos orgánicos tales como urea y purinas (Caron & Goldman, 1990).

El último mecanismo por el que el fitoplancton libera materia orgánica es el mediado por infección viral. Son muchos los estudios que sugieren que los virus pueden ser la mayor causa de mortalidad para las bacterias y el fitoplancton, jugando un papel importante en los flujos de materia orgánica disuelta en el océano (Suttle, 2005).

La materia orgánica presente en la columna de agua y que finalmente es acumulada en los sedimentos marinos, está compuesta por material orgánico autóctono y alóctono que es sometido a una intensa degradación durante su descenso por la columna de agua, de forma que sólo una pequeña fracción (< 10%) alcanza el fondo marino (Wakeham & Lee, 1993).

El flujo de carbono orgánico exportado difiere del que se puede encontrar en el sedimento. Esto es debido a distintos factores que afectan a la preservación y acumulación del material orgánico en los sedimentos del fondo: el nivel de productividad primaria, el contenido de oxígeno en la columna de agua y el sedimento, el tamaño de las partículas que están sedimentando, la absorción del material orgánico a superficies minerales, y la porosidad del sedimento (Stein, 1990, Hartnett *et al.*,

1998, Hulthe *et al.*, 1998) (Figura 4).

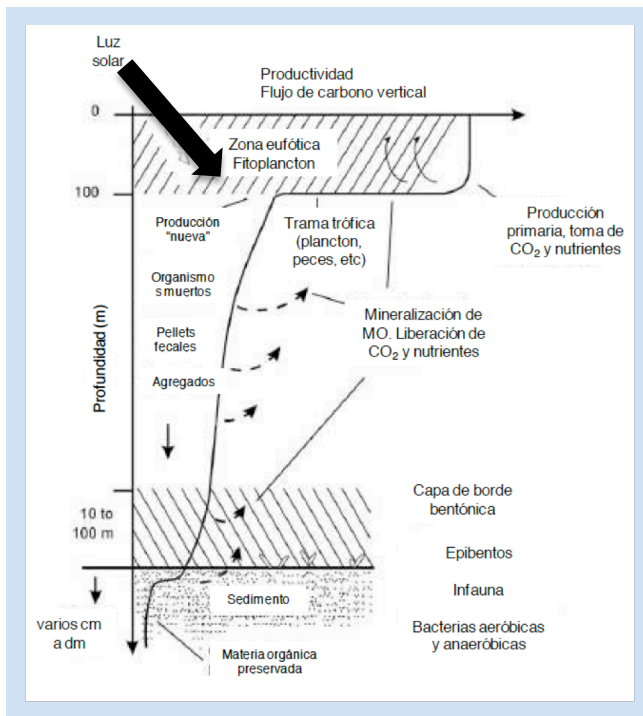


Figura 4. Representación esquemática del flujo de materia orgánica hacia el fondo del océano. Modificado de (Rullkötter, 2006).

La materia orgánica que llega al fondo marino representa la fuente de energía para los organismos bentónicos, la degradación de ésta ocurre en la capa superficial del sedimento principalmente, aunque puede continuar en las profundidades debido a la presencia de oxidantes de la materia orgánica como es el oxígeno.

Una alta concentración de materia orgánica es formada por el detritus del fitoplancton pero también pueden encontrarse partículas de detritus proveniente de plantas o animales, o incluso excretarse componentes orgánicos a partir de algas. Todo esto puede llegar a crear microambientes alrededor de esta fuente de producción de DOM (Sieburth, 1976, Azam & Hodson, 1981) llegando a concentraciones intracelulares de azúcares y aminoácidos del orden de milimolar en algunas algas (Dortch, 1982).

Otra fracción poco representada pero importante es el componente eólico, que puede aportar entre otras cosas, polen de plantas terrestres y cenizas de incendios forestales. Las contribuciones relativas de estas fuentes de materia orgánica (2 Tmol

C/año) están fuertemente influidas por los procesos de transporte (Buat-Ménard *et al.*, 1989).

Los sistemas de surgencia costera (movimiento vertical de las masas de agua) son de gran importancia en el océano, porque permiten la renovación de las aguas superficiales (Jorgensen *et al.*, 1990). El alto flujo de material orgánico, la deficiencia de oxígeno disuelto y la escasez de fauna bentónica que caracteriza a los ambientes de surgencia, favorecen la preservación de material orgánico en los sedimentos de fondo (Milessi *et al.*, 2005, Lazarus *et al.*, 2006).

Finalmente, existe una entrada importante de material orgánico en los océanos vía atmósfera y de la principal fuente externa, el aporte de los ríos y estuarios donde el carbono orgánico de fuentes terrestres pueden ser una fracción importante del total de materia orgánica (Cauwel, 2002).

2. LAS CIANOBACTERIAS MARINAS

Las cianobacterias ocupan una posición privilegiada entre los organismos, ya que como productores primarios juegan un papel muy importante en el ciclo del carbono de la tierra; y como fijadores de nitrógeno también intervienen en el ciclo del nitrógeno, considerándose organismos de gran importancia en el mantenimiento de la biosfera.

Colonizan la Tierra desde hace 3500 millones de años (Knoll, 2008, García-Ruiz *et al.*, 2003) y han desempeñado un papel decisivo en la evolución de la vida en la Tierra puesto que son responsables del cambio de la atmósfera a oxidante (Schopf, 2000).

A pesar de los distintos medios ambientes donde las cianobacterias pueden habitar, las cianobacterias de vida libre son sorprendentemente simples comparadas con los organismos bentónicos. Dentro de las cianobacterias pertenecientes al plancton, existen cuatro grupos como los diazotrofos (con células capaces de fijar N₂ atmosférico) como *Trichodesmium* y *Crocospaera* y los dos no diazotrofos *Synechococcus* y *Prochlorococcus* (Hoffman, 1999). Al primer grupo se puede añadir un organismo recientemente descubierto y provisionalmente llamado UCYN-A, filogenéticamente relacionado con las cianobacterias pero con la peculiaridad de no

poseer fotosistema II ni la enzima rubisco y por tanto sin capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Zehr *et al.*, 2008, Thompson *et al.*, 2012, Tripp *et al.*, 2010).

Las cianobacterias se han considerado durante mucho tiempo fotoautótrofos oportunistas con una variedad de estrategias que les permiten adaptarse bien a cambios en su medio ambiente (Whitton & Potts, 2000, Whitton, 1992); sin embargo, algunas también pueden crecer mixotrófica, fotoheterotrófica o heterotróficamente en presencia de alguna molécula orgánica exógena (Rippka *et al.*, 1979). Esto nos muestra una vez más la capacidad que tienen de adaptarse frente a cualquier cambio en su medio ambiente, lo que les permite habitar desde la zona bentónica de las costas hasta la zona pelágica en el mar abierto, donde aparecen formando parte del plancton (Hoffman, 1999). No solamente tienen unos requerimientos nutricionales muy bajos, y se adaptan a utilizar luz de muchas longitudes de onda y a bajas intensidades, sino que también han desarrollado mecanismos de supervivencia en ambientes extremos que, hasta hace unos años, no se consideraban compatibles con la vida (García-Pichel & Pringault, 2001, García-Pichel *et al.*, 2003).

Hay tres grupos principales de cianobacterias según su morfología: unicelulares, filamentosas formadoras de heterocistos y filamentosas no formadoras de heterocistos. Los heterocistos son células especializadas en la fijación biológica del N₂ que engrosan su pared con capas de glicolípidos y polisacáridos específicos, para evitar la entrada del oxígeno que está generándose en las células vegetativas vecinas y protegiendo por tanto a la nitrogenasa de la inhibición por oxígeno (Paerl, 2000).

Hasta el momento, se han descrito cuatro géneros de cianobacterias presentes en número suficiente como para que su contribución ecológica en el mar resulte significativa: los géneros filamentosos *Trichodesmium* y *Richelia*, y como parte del picofitoplancton, *Synechococcus* y *Prochlorococcus*. Aunque también se encuentran en el océano otros grupos de cianobacterias, como *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* o *Nodularia*, ninguno de estos parece contribuir de forma apreciable a la producción primaria del ecosistema marino (Ducklow, 2000, Flombaum *et al.*, 2013, Hoffman, 1999).

Los genomas de las cianobacterias presentan un contenido variable en G+C, que oscila entre 31 y 68 %. Esta variabilidad también se ve reflejada en el tamaño de sus genomas, desde 11,58 Mb (*Calothrix sp.* PCC 7103) a 1,44 Mb (*UCYNA*) (Shih *et*

al., 2013). La mayoría son poliploides, presentando en torno a 12 copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989).

Tradicionalmente se ha considerado que una de las características de las cianobacterias era que presentaban un ciclo de Krebs incompleto, debido a la ausencia del complejo enzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Esto confería a esta ruta una función anabólica que conduce a la formación de 2-oxoglutarato, que posteriormente se incorporaría al ciclo GS-GOGAT (Muro-Pastor *et al.*, 2005). Aunque actualmente se ha demostrado que las cianobacterias utilizan una vía alternativa para cerrar el ciclo, como en la estirpe *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Knoop *et al.*, 2010), en *Prochlorococcus* y *Synechococcus* este ciclo permanece incompleto (Zhang & Bryant, 2011).

En este trabajo se han utilizado las cianobacterias marinas *Prochlorococcus* sp. SS120, principalmente, y *Prochlorococcus* sp. MED4. Para estudiar la posible función como transportador del gen *melB* se usó la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Finalmente se utilizó *Synechococcus* sp. WH 7803 para estudiar la posible competencia con *Prochlorococcus* por la absorción de glucosa y *Synechocystis* sp. PCC 6803 como control positivo para el transporte de glucosa.

3. **PROCHLOROCOCCUS**

La picocianobacteria marina *Prochlorococcus* domina la biomasa fotosintética en latitudes medias de los océanos oligotróficos, siendo responsable de aproximadamente un 30% de la producción primaria (Goericke & Welschmeyer, 1993). Además *Prochlorococcus* es considerado como el organismo fotosintético más abundante en la tierra (Partensky *et al.*, 1999b) y desde su descubrimiento en 1988 (Chisholm *et al.*, 1988) se ha convertido en un modelo de estudio en ecología marina.

Aunque existen otros fotoautótrofos en áreas subtropicales y oligotróficas, sólo *Prochlorococcus* y *Synechococcus* son abundantes en estas zonas, aunque la concentración de *Synechococcus* en estas regiones es típicamente dos órdenes de magnitud (y en biomasa aproximadamente 20 veces) más baja que *Prochlorococcus* (Partensky *et al.*, 1999a, Partensky *et al.*, 1999b).

3.1. Tamaño y estructura

Prochlorococcus es el organismo fotosintético más pequeño conocido. El alto cociente superficie/volumen le aporta una ventaja en la absorción de nutrientes bajo condiciones oligotróficas. (Partensky & Garczarek, 2010, Partensky et al., 1999b).

Su pequeño tamaño, entre 0,5 y 0,7 μm de largo por 0,4 y 0,6 μm de ancho (Chisholm et al., 1988), dificulta su identificación mediante microscopía óptica, aunque el microscopio de transmisión electrónica revela una arquitectura típicamente cianobacteriana.

Prochlorococcus contiene en su citoplasma filamentos de DNA, carboxisomas detectables mediante anticuerpos frente a la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) y gránulos de glucógeno, situados en las cercanías de los tilacoides o directamente entre ellos (Lichtle et al., 1995). Posee entre dos y cuatro tilacoides, aunque en ocasiones pueden ser más de seis, que se sitúan paralelamente a la membrana celular (Chisholm et al., 1992, Shimada et al., 1995) (Figura 5).

3.2. Aparato fotosintético

Un aspecto importante de la adaptación de *Prochlorococcus* es reflejada en la presencia de divinil derivados de las clorofilas a y b, llamados clorofila a_2 y b_2 no encontrados en ninguna otra cianobacteria marina, que le permiten utilizar luz en el espectro de verde-azul, que penetra en la columna de agua (Mühling, 2012). El estudio del cociente clorofila b_2 /clorofila a_2 ha posibilitado la clasificación de las estirpes de este género en: ecotipos de superficie, en los que este cociente es menor que 1, y ecotipos de profundidad, en los que ese cociente es igual o mayor que 1, detectados en capas bajas de la zona eufótica en regiones a 200 m de profundidad, donde sólo alcanza un 0,1 % de la luz que incide en la superficie (Ferris & Palenik, 1998, Moore & Chisholm, 1999, West et al., 2010, Partensky et al., 1993).

Comparando las secuencias del gen 16S del RNA ribosómico de *Prochlorococcus*, observamos la misma clasificación anterior (Moore et al., 1998).

Estas estirpes se pueden diferenciar también en base a sus características genómicas (Dufresne et al., 2003, Martiny et al., 2006, Scanlan et al., 2009) y según la habilidad de adquirir nutrientes (Moore et al., 2002, Ahlgren et al., 2006, López-

Lozano *et al.*, 2002), como por ejemplo la capacidad de crecer con nitrito como fuente de nitrógeno (Moore *et al.*, 2002).

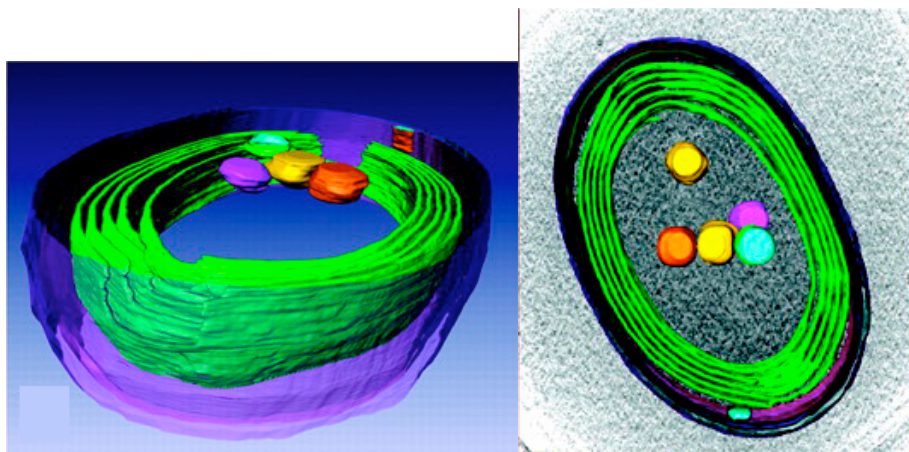


Figura 5. Modelos celulares de la estirpe MIT9313 obtenidos mediante tomografía crioelectrónica. Las estructuras representadas incluyen la pared celular (violeta, rosa y azul), sistema de membrana intracitoplasmático (verde), y carboxisomas (naranja, amarillo, rosa y celeste). Imágenes obtenidas por Claire S. Ting (Ting *et al.*, 2007).

La síntesis de clorofila b_2 a partir de clorofila a_2 es catalizada por una oxigenasa específica de *Prochlorococcus*, la cual está relacionada con la proteína CAO encontrada en plantas superiores y otras cianobacterias (Satoh & Tanaka, 2006). La presencia de divinil-clorofila en vez de monovinil-clorofila se piensa que puede estar relacionado con la pérdida del gen 3,8-divinyl photochlorophyllide a (*dvr*) (Nagata *et al.*, 2005, Kettler *et al.*, 2007).

Prochlorococcus ha sustituido los ficobilisomas, complejos captadores de luz típicos de cianobacterias, por las proteínas codificadas por el gen *pcb*. Estas proteínas se unen a las clorofilas a_2/b_2 sirviendo de proteínas antena, con la ventaja de ser mucho menos voluminosas que los ficobilisomas (La Roche *et al.*, 1996). Una vez más, la variabilidad entre estirpes se refleja en el número de copias que presenta este gen, desde una copia en la estirpe MED4 hasta ocho copias en la estirpe SS120 (Garczarek *et al.*, 2000).

También están presentes otros pigmentos como la zeaxantina, el α -caroteno, la protoporfirina a_2 (derivado de la clorofila c) y, en algunas estirpes, la ficoeritrina (Hess *et al.*, 1996).

Todas las estirpes conocidas de *Prochlorococcus* tienen una licopeno ciclasa responsable de la síntesis de α -caroteno (Hess *et al.*, 2001). A pesar de su baja concentración en la célula (Goericke & Repeta, 1992, Moore *et al.*, 1995, Partensky *et al.*, 1993) este pigmento debe ser importante para el correcto funcionamiento del aparato fotosintético de *Prochlorococcus* (Partensky & Garczarek, 2010).

3.3 Distribución oceánica

Prochlorococcus se distribuye principalmente en áreas pobres en nutrientes entre los 45° Norte y 45° Sur (Olson *et al.*, 1990, Johnson *et al.*, 2006), con una mayor concentración (10^5 - 10^6 células/mL) entre los 100 y 200 metros (Chisholm *et al.*, 1988, Ferris & Palenik, 1998, West & Scanlan, 1999, Johnson *et al.*, 2006, Zwirgmaier *et al.*, 2007, Jameson *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha observado *Prochlorococcus* incluso en capas por debajo de la oxiclina (zonas mínimas en oxígeno) y bajo condiciones de luz de menos de 0,1-2 % de irradiancia (Goericke *et al.*, 2000).

Las concentraciones máximas de *Prochlorococcus* se encuentran en aguas con una temperatura comprendida entre 26 y 29 °C, por lo que parece que las bajas temperaturas no le son favorables (Malmstrom *et al.*, 2010).

Durante mucho tiempo se ha estudiado ampliamente la abundancia de los ecotipos de *Prochlorococcus* en las diferentes regiones oceánicas (West & Scanlan, 1999, Ahlgren *et al.*, 2006, Bouman *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2006, Zinser *et al.*, 2006, Zinser *et al.*, 2007, Malmstrom *et al.*, 2010). Los ecotipos de superficie (HL, *high light-irradiance adapted*), MIT9312 y MED4, son los más abundantes en las altas regiones de la zona eufótica, y dentro de los ecotipos de profundidad (LL, *low light/irradiance adapted*), NATL y MIT9313 son las estirpes más abundantes en las regiones bajas de la zona eufótica (West *et al.*, 2001b, Johnson *et al.*, 2006, Zinser *et al.*, 2007) (Figura 6).

La estabilidad de la columna de agua y la concentración de nutrientes también son parámetros importantes que van a determinar la presencia de unas estirpes u otras (Bouman *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2006, Malmstrom *et al.*, 2010).

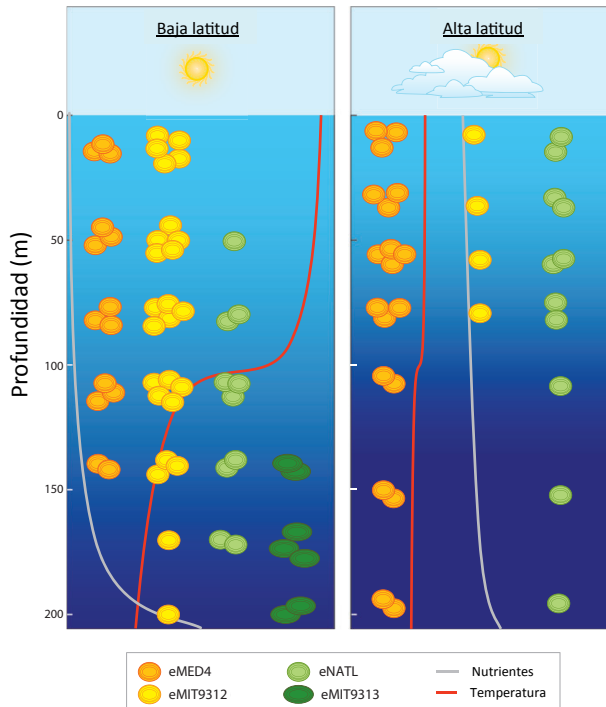


Figura 6. Distribución vertical de los cuatro ecotipos principales en bajas y altas latitudes en el Océano Atlántico. Imagen obtenida de Partensky & Garczarek, 2010.

3.4. Características genómicas

Una de las estrategias evolutivas utilizadas por *Prochlorococcus* parece ser la compactación del genoma, ya que ha eliminado zonas no codificantes así como genes prescindibles para la supervivencia, como algunos genes fotosintéticos, genes involucrados en el mecanismo de concentración del carbono, subunidades de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa, enzimas del ciclo de Calvin y de otras rutas metabólicas, genes involucrados en la reparación del DNA, componentes del reloj circadiano e incluso genes que codifican para transportadores de nutrientes (Dufresne et al., 2003, Rocap et al., 2003, Dufresne et al., 2005, Kettler et al., 2007, Dufresne et al., 2008, Partensky & Garczarek, 2010, Holtzendorff et al., 2008, García-Fernández et al., 2004).

La mayoría de las estirpes se caracterizan por tener un genoma pequeño (1,64-2,68 Mpb), con un contenido en G+C variable (30,8-50,7 %) (Dufresne et al., 2008, Kettler et al., 2007) (Tabla 2). Los genomas de las primeras tres estirpes secuenciadas (MIT9313, SS120, ambas de baja irradiancia y MED4 de alta irradiancia) mostraron una cierta diferencia de tamaños (2,41, 1,75 y 1,66 Mpb, respectivamente).

Tabla 2. Características de los genomas secuenciados y disponibles de las estirpes de *Prochlorococcus*. Adaptado y modificado de (Mühling, 2012).

<i>Estirpe</i>	<i>Origen geográfico</i>	<i>Tamaño(kb)</i>	<i>% C+G</i>
MED4 ^a	Mar Mediterraneo, 5 m	1658	30,80
SS120 ^b	Mar de los Sargazos, 120 m	1751	36,44
MIT9313	Corriente del Golfo, 135 m	2411	50,74
MIT9211	Pacífico Ecuatorial, 83 m	1688	38,01
AS9601	Mar Arábico, 50 m	1674	31,32
MIT9301	Mar de los Sargazos, 90 m	1642	31,34
MIT9303	Mar de los Sargazos, 100 m	2681	50,01
MIT9312	Corriente del Golfo, 135 m	1709	31,20
MIT9515	Pacífico Ecuatorial, 15 m	1710	30,79
MIT9215	Pacífico Ecuatorial, superficie	1740	31,15
NALT1A	Atlántico Norte, 30 m	1865	34,98
NALT2A	Atlántico Norte, 10 m	1840	35,12

a. Nombres alternativos: CCMP1378; CCMP1986

b. Nombre alternativo: CCMP1375

4. METABOLISMO DEL CARBONO

4.1 El ciclo del carbono

Tanto la atmósfera como los océanos y la corteza terrestre actúan como reservorios de carbono, sin embargo el océano es el que contiene la mayor cantidad.

Es necesario diferenciar los procesos que ocurren en un medio aerobio de los que ocurren en un medio anaerobio (Figura 7). En un medio aerobio el carbono en forma de CO₂ es absorbido de la atmósfera y utilizado para la síntesis de moléculas orgánicas, mediante los procesos de fotosíntesis (realizado por algas, plantas verdes y cianobacterias) y quimiosíntesis (bacterias quimioautótrofas).

La cantidad de fitoplancton en los océanos representa tan solo 1-2% del carbono total global en plantas, pero estos organismos fijan entre 30 y 50 x 10⁹ toneladas de carbono anualmente, lo cual representa el 40% del total (Falkowski *et al.*, 1992, Berges & Harrison, 1995). *Prochlorococcus* y *Synechococcus* son las cianobacterias unicelulares más abundantes en el océano y por tanto, los mayores participantes en el ciclo global del carbono.

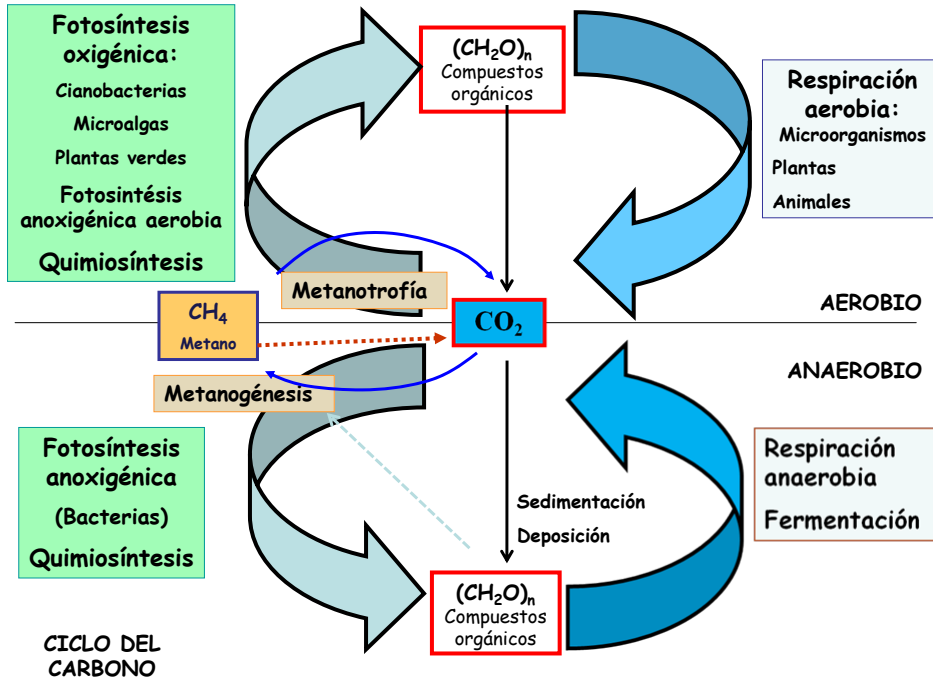


Figura 7. Ciclo del carbono en medio aeróbico y anaeróbico

Los compuestos orgánicos son oxidados en el proceso de respiración celular, realizado tanto por plantas, como por animales y microorganismos; en la respiración el carbono se libera como CO_2 , que se reintegra así a la atmósfera. Esta producción primaria sirve a su vez como sumidero a las regiones profundas en forma de precipitados fecales y detritus de plantas y animales, que al morir el organismo se sedimentan en el fondo del océano formando lodos que pueden comprimirse a medida que pasa el tiempo y finalmente transformarse en roca caliza (Harrison, 2003). El mecanismo de transporte que conduce el carbono (15-20% de la producción primaria neta) desde la superficie a las aguas más profundas se denomina bomba biológica y deposita en los fondos marinos $\sim 0,1 \times 10^9 \text{ t C año}^{-1}$ (Post *et al.*, 1990).

Además de actuar como reservorio, la atmósfera juega un importante papel en el ciclo del carbono como conductor entre los otros dos reservorios (océano y el sistema terrestre).

La diferencia de concentraciones de CO_2 entre la atmósfera y el océano tienden a equilibrarse, siendo el intercambio neto entre estos dos compartimentos de 2 Gton de carbono por año hacia el océano, que actúa como un gran sumidero

(Houghton *et al.*, 1990). En la parte superficial de la región fría del océano se disuelven grandes cantidades de CO₂ en el agua, que tienden a hundirse a grandes profundidades como consecuencia del enfriamiento. Por el contrario, en regiones donde el agua asciende hacia la superficie mediante los sistemas de surgencia, especialmente en la divergencia tropical, el calentamiento de las aguas frías causa que miles de millones de toneladas de CO₂ pasen del agua a la atmósfera.

Por otra parte, en un medio anaerobio las bacterias fotosintéticas transforman el CO₂ en compuestos orgánicos; éstos son degradados por los procesos de respiración anaerobia y fermentación, llevados a cabo por microorganismos. Estos procesos también liberan CO₂, que es devuelto al medio. En la fermentación se produce una degradación incompleta de los compuestos orgánicos, liberándose ácidos orgánicos y alcoholes. Estas moléculas pueden ser transformadas en metano (CH₄) por las llamadas bacterias metanógenas. Si el metano pasa a ambientes aerobios es oxidado a CO₂ por las bacterias metanotróficas, bacterias quimiosintéticas que viven en el suelo y realizan esta oxidación para obtener energía.

La atmósfera es la reserva que acumula menos carbono ($\sim 0,75 \times 10^{12}$ t C año⁻¹), pero en los últimos años ha ido creciendo exponencialmente debido a la quema de combustibles fósiles, fabricación de cemento, deforestación y cambios en el uso de suelo, produciendo en forma de CO₂ más del doble del carbono contenido en toda la biota marina (Hilton *et al.*, 2002).

Esta bomba biológica (que incluye todos estos procesos de fotosíntesis, alimentación, respiración y descomposición) contribuye a la concentración del carbono en el interior del océano (Falkowski & Scholes, 2000).

4.2 La diversidad del metabolismo del carbono en cianobacterias

Las cianobacterias son el único grupo filogenético de bacterias, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Como se ha explicado en el apartado anterior, debido a su gran abundancia en el océano, las cianobacterias juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos como el del carbono. Sin embargo la diversidad del metabolismo del carbono en cianobacterias no se conoce en profundidad (García-Fernández & Díez, 2004).

Gracias a la gran expansión de las técnicas de secuenciación, se han conocido numerosos genomas completos, aportando nuevos datos sobre la diversidad metabólica en diversos ambientes.

Recientemente también se han realizado expediciones de muestreo en el océano con el fin de investigar la diversidad microbiana en los entornos marinos (Venter, 2004, Rusch *et al.*, 2010) confirmando de nuevo la diversidad microbiana oceánica y la heterogeneidad de microorganismos a nivel genómico, y particularmente en *Prochlorococcus*.

Por otra parte, la capacidad de las cianobacterias de convertir energía solar y CO₂ atmosférico directamente en compuestos carbonados ha suscitado un gran interés en la generación de biofuel y por tanto en el estudio del metabolismo del carbono de las cianobacterias (Atsumi *et al.*, 2009, Ducat *et al.*, 2011, Hess, 2011, Quintana *et al.*, 2011, Rosgaard *et al.*, 2012, Steuer *et al.*, 2012).

Estudios recientes han realizado una comparación de genomas de múltiples cianobacterias fotoautotróficas para estudiar la diversidad genética encontrada en el metabolismo del carbono (Beck *et al.*, 2012). Dicha comparación se ha realizado especialmente con respecto a la funcionalidad metabólica basándose en el alineamiento de secuencias de proteínas y en una construcción de familias de genes ortólogos. El análisis de dichas secuencias de cianobacterias, incluyendo 8 estirpes marinas y 8 de agua dulce, permitió obtener un esquema de las distintas rutas metabólicas presentes en esas 16 cianobacterias, pudiéndose observar la diversidad metabólica que existe (Figura 8). En amarillo se muestran las enzimas ausentes en todas las estirpes de *Prochlorococcus*. En dicha figura, podemos observar que todas las enzimas claves del ciclo de Calvin-Benson, responsables de la fijación de CO₂, se encuentran en las 16 estirpes de cianobacterias, al igual que las enzimas que intervienen en la ruta de las pentosas fosfato. La enzima FBP (fructosa-1,6-bifosfatasa, EC 3.1.3.11) no está anotada en todas las estirpes permaneciendo ausente en todas las α -cianobacterias (clasificación basada en la filogenia de la rubisco (Beudeker *et al.*, 1980)) incluyendo a las estirpes de *Prochlorococcus*. Sin embargo, según una reciente reconstrucción del modelo del metabolismo del carbono en *Synechocystis sp.* 6803, dicha enzima no es esencial (Knoop, Zilliges *et al.* 2010) pudiendo ser sustituida por la enzima bifuncional SBP (fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa, EC 3.1.3.37) presente en las 16 estirpes. Igualmente la enzima PFK (fosfofructoquinasa, EC

2.7.1.11) no está anotada en algunas estirpes, estando ausente de nuevo en *Prochlorococcus*. PFK es esencial en la glucolisis, por lo que cabría pensar que la utilización de glucógeno como fuente de energía se llevaría a cabo mediante la ruta de las pentosas fosfato. Otras enzimas de la glucolisis, tales como FBA (fructosa-bifosfato aldolasa), GAP (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), PGM (fosfoglicerato mutasa) y PYK (piruvato quinasa) están anotadas en todas las cianobacterias estudiadas en dicho trabajo.

De nuevo en el metabolismo del piruvato existen diferencias, la enzima PEP carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) que cataliza la conversión anaplerótica de PEP a oxalacetato y fosfato inorgánico, se encuentra en todas las estirpes, a diferencia de la que cataliza la reacción inversa, PEPK (PEP carboxiquinasa) que sólo está en tres estirpes (*Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Cyanothece* sp. PCC 8801 y *Microcystis aeruginosa* NIES-843). La enzima PEPC es esencial en la formación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), formando 2-oxoglutarato, sensor del balance carbono/nitrógeno (C/N) en las cianobacterias (Muro-Pastor et al., 2005).

Desde hace tiempo se pensaba que las cianobacterias presentaban la particularidad de tener un ciclo de los ácidos tricarbónicos incompleto al carecer de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH) (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Aunque actualmente se conoce la posibilidad de que este grupo de microorganismos utilice una vía alternativa para cerrar el ciclo como en la estirpe *Synechocystis* sp. 6803 (Knoop et al., 2010) usando tres enzimas como la glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15), 4-aminobutirato transaminasa (EC 2.6.1.19) y la succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSDH, EC 1.2.1.16) o como recientemente se ha descubierto en la estirpe *Synechococcus elongatus* sp.7942 mediante las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa (2OGD, EC 4.1.1.71) y succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSDH, EC 1.2.1.16) convirtiendo el 2-oxoglutarato a succinato y de esta forma cerrando el ciclo TCA (Zhang & Bryant, 2011).

Otro ejemplo de vía alternativa es la malato:quinona oxidoreductasa (MQH, EC 1.1.5.4) presente en las α -cianobacterias que cataliza la oxidación irreversible de malato a oxalacetato sustituyendo a la enzima málica (ME, EC 1.1.1.38) y a la malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), ausentes en estas cianobacterias.

Como organismos fotoautótrofos, la mayoría de cianobacterias almacenan compuestos carbonados durante el día para mantener la función celular durante la

noche. El compuesto de almacenamiento más abundante en cianobacterias es el glucógeno, sintetizado a partir de glucosa-6-fosfato, pero también existen otros menos comunes como la cianoficina, compuesta por aspartato y arginina y el poli-beta-hidroxibutirato (PHB) en *Synechocystis sp.* PCC 6803 y *Microcystis aeruginosa* NIES-483.

En *Prochlorococcus* la enzima glucógeno fosforilasa (GP, EC 2.4.1.1), necesaria para la degradación del glucógeno, no aparece anotada en ninguna estirpe. Estudios realizados con un mutante de *Synechocystis sp.* 6803 en el que el gen *SigE* (codificante del factor sigma E) fue inactivado, fue incapaz de crecer en condiciones heterotróficas, conteniendo un elevado nivel de glucógeno, implicando por tanto que *SigE* interviene también en la degradación de dicho polímero (Osanai *et al.*, 2005); este hecho nos muestra una vez más rutas alternativas y por tanto, la enorme diversidad metabólica en cianobacterias.

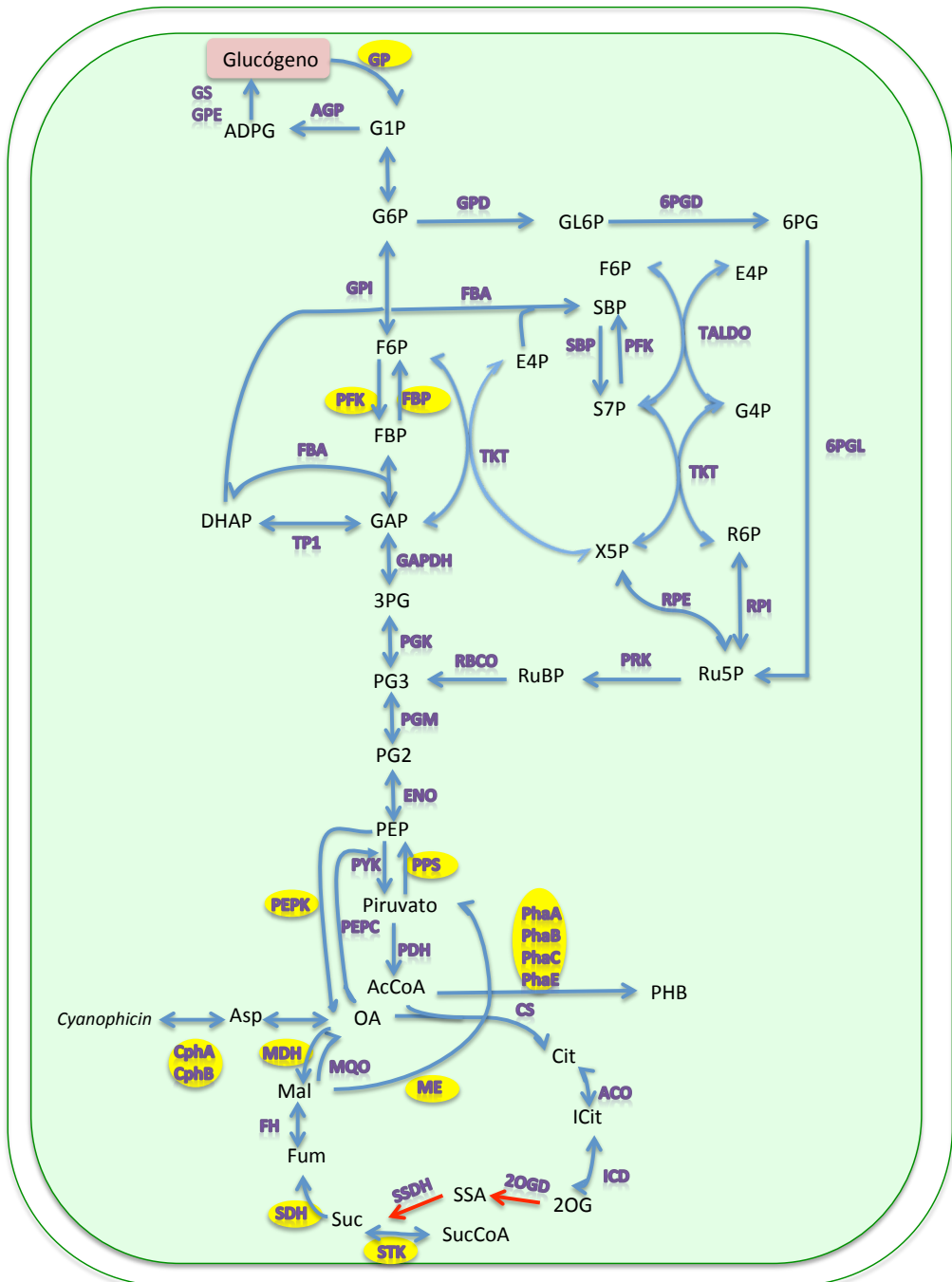


Figura 8. Rutas del metabolismo del carbono en cianobacterias. En amarillo aparecen las enzimas ausentes en algunas estirpes de *Prochlorococcus*.

4.3. Transporte de compuestos orgánicos

4.3.1. En cianobacterias

Las cianobacterias por naturaleza son organismos fotoautotróficos que utilizan su aparato fotosintético para la obtención de energía, al igual que las plantas. Aproximadamente la mitad de las estirpes estudiadas son capaces de utilizar compuestos orgánicos realizando crecimiento heterotrófico (Rippka et al., 1979).

Se han descrito cianobacterias capaces de incorporar diferentes compuestos orgánicos tales como aminoácidos (Zubkov *et al.*, 2003, Michelou *et al.*, 2007, Flores & Schmetterer, 1986, Joset *et al.*, 1988, Raboy & Padan, 1978) además se han encontrado genes involucrados en el transporte de aminoácidos en diversas cianobacterias, como *Anabaena*, *Nostoc*, *Pseudoanabaena* y *Planktothrix* (Montesinos, Herrero et al. 1997; Zotina, Koster et al. 2003).

La cianobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 5142 utiliza sustratos carbonados para crecimiento mixotrófico bajo condiciones de luz y crecimiento heterotrófico en condiciones de oscuridad (Reddy *et al.*, 1993). Estudios genómicos han revelado que *Cyanothece* 5142 tiene un cluster de genes único que contiene genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y del piruvato (Welsh *et al.*, 2008). Sin embargo la habilidad de esta estirpe para metabolizar glucosa, piruvato y un derivado lipídico como el glicerol se demostró recientemente mediante el análisis de metabolitos al añadir dichas moléculas carbonadas marcadas radiactivamente bajo condiciones continuas de luz (Feng *et al.*, 2010). Otra cianobacteria capaz de utilizar glicerol para crecer fotoheterotróficamente es la cianobacteria unicelular *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (Rippka et al., 1979).

Genes codificantes para un transportador del cianato han sido detectados en la cianobacteria *Synechococcus* WH 8102 (Palenik *et al.*, 2003) de hecho datos posteriores demostraron que el cianato puede ser utilizado como principal fuente de nitrógeno en las cianobacterias marinas, constituyendo una fuente de nitrógeno esencial en zonas oligotróficas en organismos fotosintéticos y siendo utilizado mucho menos por organismos no fotosintéticos (Kamennaya *et al.*, 2008). El cianato es un producto producido durante la descomposición de la urea, molécula nitrogenada orgánica muy utilizada por las cianobacterias, de hecho estudios de secuenciación realizados en el Golfo de Arabia mostraron un abundante presencia del gen *urtA*, indicando una utilización generalizada de la urea en poblaciones de cianobacterias

(Kamennaya et al., 2008).

Otros compuestos nitrogenados de origen orgánico que se encuentran en el océano disueltos son los aminoazúcares como la quitina y los peptidoglucanos, también reconocidos como moléculas con un alto poder de energía y como fuente de nitrógeno para los microorganismos marinos (Cottrell & Kirchman, 2000, Riemann & Azam, 2002). Sin embargo, el bacterioplacton muestra una clara preferencia por aminoácidos, particularmente leucina, más que por los aminoazúcares (Zubkov *et al.*, 2008).

El DMSP (dimetilsulfoniopropionato) es una importante fuente de carbono y azufre para un amplio rango de bacterias heterotróficas, al igual que el metanotiol que se obtiene mediante una ruta de desmetilación/desmetiolación en la degradación del DMSP (Kiene *et al.*, 2000). Estos compuestos nitrogenados orgánicos son utilizados por diversas cianobacterias fotosintéticas como *Synechococcus* (Malmstrom *et al.*, 2005, Ruiz-González *et al.*, 2012).

Finalmente, el compuesto orgánico más utilizado por las cianobacterias heterotróficas es la glucosa. La utilización de la glucosa por diversas cianobacterias ha sido estudiada durante mucho tiempo en *Plectonema boryanum*, *Synechocystis* PCC 6714, *Synechocystis* PCC 6803 y *Nostoc* MAC (PCC 8009) (Raboy & Padan, 1978, Joset et al., 1988, Beauclerk & Smith, 1978, Flores & Schmetterer, 1986, Kurian *et al.*, 2006, Ma & Mi, 2008, Rippka et al., 1979, Pelroy *et al.*, 1972, Rippka, 1972).

Durante mucho tiempo *Synechocystis* PCC 6803, ha sido considerada un modelo de cianobacteria de agua dulce con crecimiento fotoheterotrofo en presencia de glucosa; incluso recientemente está siendo utilizada en la producción de biofuel debido a su fácil manejo (Zhu *et al.*, 2013, Varman *et al.*, 2013).

Esta cianobacteria posee un transportador de glucosa con una constante cinética K_s de 0,4 mM (Flores & Schmetterer, 1986); una K_s prácticamente idéntica a la de la estirpe *Synechocystis* PCC 6714 (0,58 mM) sugiriendo una fuerte analogía entre ambas especies (Joset *et al.*, 1988). Otra de las características de esta cianobacteria es la capacidad de crecer fotoheterotroficamnte usando glucosa cuando el fotosistema II es inhibido con DCMU (Rippka et al., 1979, Schmetterer, 1990). Aunque una gran parte de las cianobacterias unicelulares, y más concretamente todas las estirpes de *Synechococcus* fueron incapaces de crecer en estas condiciones (Rippka et al., 1979).

El transportador de glucosa de la cianobacteria de agua dulce *Aphanocapsa* sp. PCC 6714 mostró un transporte de glucosa mayor en presencia de luz (Beauclerk & Smith, 1978). De hecho, en muchas cianobacterias el transporte de estas moléculas orgánicas es potenciado por la luz (Michelou et al., 2007, Li & Golden, 1993), encontrándose en algunas de ellas un mecanismo de transporte asociado a los cambios de luz durante el día, sugiriendo que este proceso está relacionado con el ritmo circadiano (Chen *et al.*, 1991).

Al igual que en la superficie del agua de los océanos la luz del sol aporta la energía necesaria para la fijación de CO₂ (Li, 1994), cabría pensar que el transporte de aminoácidos potenciado por luz podría estar relacionado con un transporte activo, donde el ATP producido por el aparato fotosintético es usado como poder extra de energía para el transporte de aminoácidos y así se ha demostrado en algunas cianobacterias como *Anacystis* y *Synechocystis* PCC 6803, donde la energía utilizada para este transporte activo proviene del fotosistema I (Anderson & McIntosh, 1991, Lee-Kaden & Simonis, 1982).

Por último, la ausencia de transportadores eficientes en algunas cianobacterias, se ha propuesto que es la causa de que algunas cianobacterias sean incapaces de crecer heterotróficamente (Beauclerk & Smith, 1978).

4.3.2. En *Prochlorococcus*

Durante mucho tiempo, *Prochlorococcus* ha sido considerado como un organismo autotrófico siendo responsable de una parte significativa de la producción primaria global; sin embargo distintos estudios indican que *Prochlorococcus* puede ser un organismo fotoheterótrofo (Eiler, 2006, Gómez-Baena *et al.*, 2008, Zubkov *et al.*, 2004, Zubkov & Tarran, 2005, Mary *et al.*, 2008b, Vila-Costa *et al.*, 2006, Hartmann *et al.*, 2011, Michelou et al., 2007).

En las profundidades de los océanos, zona en la que la luz es escasa y donde *Prochlorococcus* es muy abundante, es posible que moléculas reducidas tales como aminoácidos, puedan suponer una fuente importante de nitrógeno para *Prochlorococcus*, por su menor coste metabólico (Hedges *et al.*, 2001, Zubkov et al., 2004). Además, trabajos recientes han demostrado que esta cianobacteria utiliza concentraciones nanomolares de metionina y leucina (Zubkov, Fuchs et al. 2003; Zubkov and Tarran 2005) mostrando pruebas claras de un aumento del transporte en

presencia de luz (Mary, Tarran et al. 2008). Estos resultados coincidieron con los mostrados en el Océano Pacífico Norte donde se observó una incorporación de leucina 114% más alta en luz que cuando se incubó en oscuridad (Church *et al.*, 2004), sin embargo, la contribución exacta de *Prochlorococcus* a dicha asimilación no había sido cuantificada. Años más tarde se observó un transporte de leucina 160% más alto en luz que en oscuridad en el Océano Atlántico Norte aunque los datos sugirieron que parte de la asimilación de leucina se debía a otras bacterias fotoheterótrofas y no sólo a *Prochlorococcus* (Michelou et al., 2007).

Estudios previos realizados en *Prochlorococcus*, mostraron una sincronización con la luz del sol, observándose fluctuaciones en el ciclo celular con respecto a la luz (Vaulot *et al.*, 1995). Por lo que esto hizo pensar que el transporte de aminoácidos en las células de *Prochlorococcus* podría también variar respecto a la luz del sol sugiriendo una posible relación con el ritmo circadiano (Holtendorff et al., 2008). De hecho, se ha demostrado que existen genes en el genoma de *Prochlorococcus* involucrados en dicho mecanismo (Rocap et al., 2003). Investigaciones posteriores demostraron en *Prochlorococcus* una clara sincronización con la luz del sol, presentando oscilaciones en dicho transporte dependiendo de la intensidad de la luz (Mary, Garczarek et al. 2008).

El transporte de aminoácidos en *Prochlorococcus* es consistente con la presencia de sistemas de transporte de aminoácidos en sus genomas (Rocap et al., 2003, Scanlan et al., 2009, Dufresne et al., 2003). Aunque la fuente de nitrógeno más abundante en las profundidades de los océanos donde abunda *Prochlorococcus* es el nitrato (Capone, 2000), *Prochlorococcus* es incapaz de utilizarlo (Rippka *et al.*, 2000, El Alaoui *et al.*, 2001, López-Lozano et al., 2002, Moore et al., 2002, Palinska *et al.*, 2002). Este hecho no es sorprendente ya que el nitrato al igual que el nitrito también son las fuentes de nitrógeno que requieren un mayor gasto energético para su reducción antes de poder fijarse a la materia orgánica (Capone, 2000). Por el contrario, los aminoácidos y otras formas ya reducidas del nitrógeno (amonio o urea) son metabolizadas rápidamente por las cianobacterias, con un esfuerzo metabólico mínimo (Florencio & Reyes, 2002, García-Fernández & Diez, 2004).

Algunas estirpes de *Prochlorococcus* son capaces de utilizar otro compuesto orgánico como la urea (Palinska *et al.*, 2000, Dufresne et al., 2003, Rocap et al., 2003), compuesto mayoritario entre las sustancias nitrogenadas solubles de origen orgánico

(Antia *et al.*, 1991).

Por otra parte, es interesante resaltar que aunque sólo las estirpes MED4, NATL1A y NATL2 llevan en su genoma el gen que codifica a la cianasa (*cynS*) que convierte el cianato a amonio, únicamente la estirpe MED4 (estirpe de alta irradiancia) posee los genes codificantes para un transportador de cianato del tipo ABC. Estudios llevados a cabo sobre la estirpe MED4 parecen indicar que esta estirpe es capaz de utilizar el cianato como fuente de nitrógeno (Kamennaya & Post, 2011, Kamennaya *et al.*, 2008). La utilización del cianato podría aportar una ventaja competitiva a *Prochlorococcus*, al permitirle ocupar nichos con deficiencia de nitrógeno en la superficie de los océanos.

Prochlorococcus, al igual que la cianobacteria *Synechococcus*, las diatomeas y las piceocariotas fotosintéticas, es también capaz de transportar y asimilar otro compuesto orgánico rico en carbono y sulfuro como el DMSP (Vila-Costa *et al.*, 2006). Al igual que en el caso de los aminoácidos, la luz actúa como un potenciador del transporte en el DMSP (Ruiz-González *et al.*, 2012).

Hasta ahora sólo se había estudiado en *Prochlorococcus* el transporte de compuestos orgánicos nitrogenados, sulfurosos o combinados con una fuente de carbono como los aminoácidos o el DMSP. Resultados previos en nuestro grupo demostraron la capacidad que tiene *Prochlorococcus* de transportar un compuesto orgánico carbonado como es la glucosa; además de observar un incremento en la expresión de genes que participan en la utilización de dicha glucosa (Gómez-Baena *et al.*, 2008).

Datos en la secuencia del genoma de *Prochlorococcus* indicaban la presencia de transportadores de azúcares (Rocap *et al.*, 2003, Dufresne *et al.*, 2003) como el gen Pro1404 descrito como un transportador de Na⁺-galactosa (*melB*), observándose un aumento en la expresión de este gen en presencia de glucosa, tras 24 h (Gómez-Baena *et al.*, 2008). Sin embargo, no se conocía el mecanismo del transporte de glucosa en *Prochlorococcus* ni tampoco se había mostrado anteriormente el transporte de glucosa en poblaciones naturales.

5. BALANCE METABÓLICO DEL OCÉANO OLIGOTRÓFICO

5.1. Estrategias metabólicas

La simple clasificación en fotótrofos y heterótrofos no puede describir la amplia diversidad metabólica que poseen las bacterias en el ciclo del carbono (Eiler, 2006).

Los modos metabólicos pueden definirse en base a la energía usada (foto-versus químio-), dependiendo del compuesto utilizado como donador de electrones (organo-versus-lito-) y dependiendo de la fuente de carbono utilizada (auto-versus heterótrofo) (Tabla 3).

Tabla 3. Estrategias metabólicas

Fuente de energía	Donador de electrones	Fuente de carbono	Denominación
Luz <i>Foto-</i>	Orgánico <i>-organo-</i>	Orgánica <i>-heterótrofo</i>	Fotoorganoheterótrofo
		Dióxido de carbono <i>-autótrofo</i>	Fotoorganoautótrofo
	Inorgánico <i>-lito-</i>	Orgánica <i>-heterótrofo</i>	Fotolitoheterótrofo
		Dióxido de carbono <i>-autótrofo</i>	Fotolitoautótrofo
Compuesto químico <i>Químio-</i>	Orgánico <i>-organo-</i>	Orgánica <i>-heterótrofo</i>	Quimioorganoheterótrofo
		Dióxido de carbono <i>-autótrofo</i>	Quimioorganoautótrofo
	Inorgánico <i>-lito-</i>	Orgánica <i>-heterótrofo</i>	Quimiolitoheterótrofo
		Dióxido de carbono <i>-autótrofo</i>	Quimiolitoautótrofo

Heterotrofia se define como una serie de procesos en los cuales los componentes orgánicos se usan como fuente de carbono para la biosíntesis. Autotrofia por el contrario se define como una serie de procesos en los que a partir de materia inorgánica se sintetiza materia orgánica.

La definición de fototrofia puede ser la más confusa, ya que no todos los organismos fotótrofos fijan carbono inorgánico. Por otra parte, algunas bacterias fotótrofas no producen oxígeno ya que usan compuestos diferentes al agua como donadores de electrones.

Por lo que el término fototrofia se define como una serie de procesos mediante los cuales la energía electromagnética es convertida en energía química (Eiler, 2006).

El término mixotrofia en cianobacterias fue previamente descrito por Rippka (Rippka, 1972) y puede describirse como la estrategia metabólica en la que se combinan al menos tres de los siguientes modos metabólicos: foto-, organo-, auto-y heterotrofia. Las bacterias mixótrofas poseen ciertas ventajas como por ejemplo dominar medioambientes acuáticos, debido a su capacidad para usar más recursos que cualquier bacteria fotoautotrófica u organoheterotrófica.

Además esta mixotrofia podría proporcionar a la bacteria una cantidad extra tanto de energía como de poder reductor. Sin embargo, invertir en una estrategia mixotrófica tiene implicaciones fisiológicas importantes para un organismo, ya que tiene que invertir en la síntesis y mantenimiento de ambas fuentes de energía: aparato fotosintético y proteínas para el transporte y posterior degradación de los compuestos orgánicos. Además se podría esperar que un organismo mixótrofo no pudiera competir con un especialista fotótrofo por la luz, o un especialista heterótrofo por la materia orgánica disuelta (Eiler, 2006).

5.2. Controversia actual sobre la producción neta en el océano oligotrófico

La enorme superficie que ocupan las regiones oligotróficas (60 % de la superficie del océano) hace que, a pesar de su baja productividad, su contribución al total del carbono incorporado fotosintéticamente en el océano sea de aproximadamente el 30 % (Longhurst, 1995).

La concentración y distribución del carbono orgánico es fruto de la coexistencia de varios procesos que establecen las fuentes y sumideros de carbono orgánico en el océano. Entre los principales procesos, los dos más importantes son la

producción primaria y la respiración la cual representa el mayor sumidero de materia orgánica de la biosfera (Williams & del Giorgio, 2005).

El estudio de ambos como el balance de materia orgánica que es producida y consumida se utiliza para determinar si un ecosistema es autotrófico (producción > respiración), por lo que la producción neta sería positiva, o heterotrófico (producción < respiración), siendo la producción neta negativa; también se utiliza para considerar si es fuente o sumidero de carbono orgánico (Odum, 1956). Puede ocurrir que los procesos de producción y respiración estén en equilibrio, por lo que el efecto neto sobre la concentración de C en el agua sería nulo, siendo la producción neta en este caso balanceada, (producción = respiración). La producción neta, por tanto va a depender entre otros factores de la cantidad de carbono que puede sedimentarse en el fondo oceánico, además de los intercambios con la atmósfera.

En los últimos años se ha generado un debate acerca del balance metabólico neto del océano oligotrófico con dos visiones contrapuestas: el océano oligotrófico es autotrófico (Williams *et al.*, 2013) y el océano oligotrófico es heterotrófico (Duarte *et al.*, 2013).

La desproporcionada escasez de datos de respiración planctónica limita la cuantificación del balance oceánico entre fotosíntesis y respiración (del Giorgio & Duarte, 2002). Además, las estimaciones obtenidas discrepan casi en un orden de magnitud. Por todo ello se ha generado un intenso debate sobre el balance del carbono (Ducklow & Doney, 2013) debido (al menos en parte) a que las medidas del flujo de carbono están sujetas a problemas metodológicos con diferencias en la escala temporal y espacial, que al igual que este debate permanecen sin resolver (Figura 9).

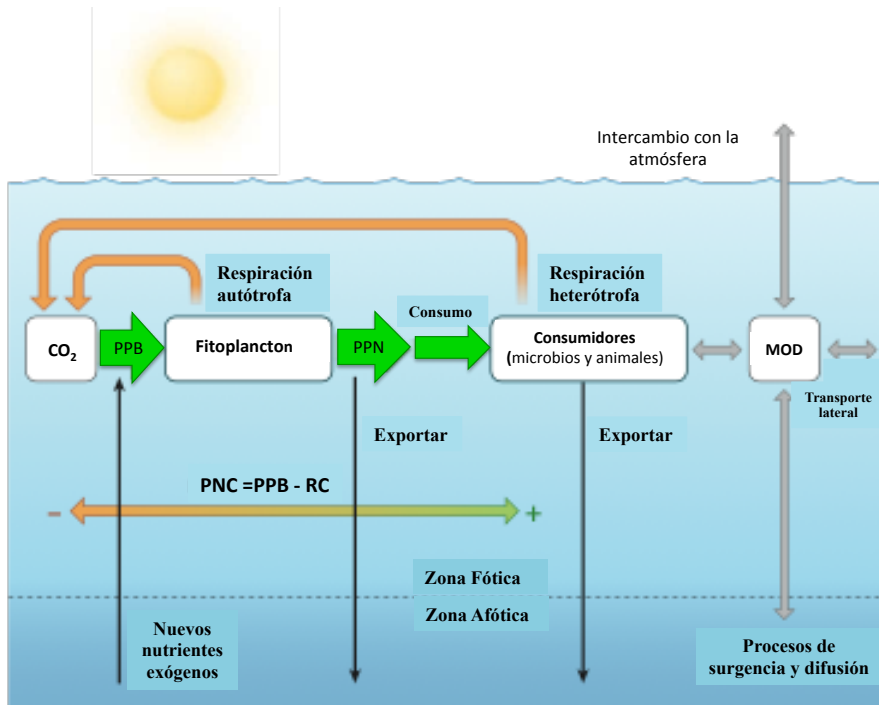


Figura 9. Intercambios metabólicos, transformaciones y procesos relacionados en la superficie del océano que intervienen en el balance entre autotrofia y heterotrofia. La materia orgánica disuelta (DOM) incluye la que es producida por el fitoplancton y consumidores y la utilizada por las bacterias heterotróficas *in situ*, además de los aportes externos. Imagen modificada obtenida de (Ducklow & Doney, 2013).

OBJETIVOS

Objetivos

1. Identificación y caracterización del mecanismo de transporte de glucosa en *Prochlorococcus*.
2. Análisis de la absorción de glucosa en poblaciones naturales de *Prochlorococcus*.
3. Estudio de los efectos de la glucosa sobre el metabolismo de *Prochlorococcus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. ESTIRPES DE CIANOBACTERIAS

Durante el desarrollo de este trabajo se ha utilizado principalmente la cianobacteria marina *Prochlorococcus*: concretamente las estirpes PCC 9511, axénica y MED4, no axénica como representantes de los ecotipos de alta irradiancia, y SS120, NATL1A, NATL2A y MIT 9313 como representantes de los de baja irradiancia. Estos cultivos fueron suministrados por la *Roscoff Culture Collection* (*Station Biologique de Roscoff*, Roscoff, Francia), la *Pasteur Culture Collection* (*Institut Pasteur*, París, Francia) y la *Cyanobacteria Culture Collection* del *Massachusetts Institute of Technology* (Cambridge, Estados Unidos).

La cianobacteria marina *Synechococcus* sp. **WH 7803** fue suministrada por el grupo del Prof. Wolfgang. R. Hess (Universidad de Freiburg, Alemania) para los estudios de competencia de transporte de glucosa con *Prochlorococcus*. Por último los cultivos de *Synechocystis* sp. **PCC 6803** y *Synechococcus elongatus* **PCC 7942** se usaron durante la estancia en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla con el Dr. Ignacio Luque. Como control de cianobacteria heterótrofa se usó *Synechocystis* sp. PCC 6803 y para la realización de transformantes, *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

B. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1. *Prochlorococcus*

1.1. Medio de cultivo

Las células de *Prochlorococcus* crecieron en el medio de cultivo PCR-S11 (Rippka et al., 2000). El agua de mar empleada en la preparación de dicho medio se obtuvo en el mar Mediterráneo (normalmente a varias millas del puerto de Málaga), y fue proporcionada por el Instituto Español de Oceanografía con la amable colaboración de la tripulación del barco “Odón de Buen”.

Como paso previo, se hizo pasar el agua por un soporte de filtros de acero inoxidable de 90 mm de diámetro (*Millipore*), con un filtro de 0,22 μm (*Millipore*) y un prefiltro de fibra de vidrio (*Millipore*). Posteriormente, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120 °C, y una vez que el volumen de agua hubo alcanzado la

temperatura ambiente, se añadieron las soluciones de enriquecimiento, previamente esterilizadas, en la cantidad y concentración indicadas en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Composición del medio PCR-S11 (para 1 L de volumen final)

Soluciones	Volumen añadido (mL)	Concentración final (μM)
Hepes-NaOH 1 M pH 7,5	1,0	1000
Na ₂ -EDTA/FeCl ₃ (*)	1,0	8 (para Fe)
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,5	1,0	50
(NH ₄) ₂ SO ₄ 400 mM	1,0	800 (para N)
Metales traza: "Gaffron+Se" (**)	0,1	

(*) Se mezclaron 0,540 g de FeCl₃·H₂O en 20 mL de HCl 0,1 N con 0,744 g de Na₂-EDTA en 20 mL de NaOH 0,1 N, completándose con agua destilada hasta 1 L

(**) Ver tabla 5

Tabla 5. Preparación de la solución de metales traza: "Gaffron+Se"

Componentes	Cantidad añadida a la solución madre (mg)	Concentración en la solución madre (μM)	Concentración final en PCR-S11 (nM)
H ₃ BO ₃	168,00	3000	300,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	101,00	600	60,0
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	1,98	6	0,6
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	5,16	4	0,4
KBr	7,14	60	6,0
KI	4,98	30	3,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	17,25	60	6,0
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	9,25	30	3,0
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	8,76	30	3,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7,50	30	3,0
NiCl ₂ ·6H ₂ O	7,10	30	3,0
Cr(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	2,40	6	0,6
VSO ₅ ·5H ₂ O	1,50	6	0,6
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	28,40	60	6,0
SeO ₂	3,30	30	3,0

Las soluciones de enriquecimiento se prepararon por separado en agua destilada, conservándose a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tras la adición de estas soluciones al agua de mar filtrada y esterilizada, el medio volvió a filtrarse una vez más, esta vez en el interior de una cámara de flujo laminar, para mantener las condiciones de esterilidad oportunas. Con idea de mantener dichas condiciones, el sistema de filtrado fue previamente esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120 °C.

El medio PCR-S11 se conservó a temperatura ambiente.

1.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de *Prochlorococcus* crecieron a una temperatura constante de 24 °C en frascos de poliestireno de 50 mL (*Flask Nunclon D, Nunc*), con una luz continua azul de 4 y 40 $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$, para las estirpes de baja y alta irradiancia respectivamente, emitida por tubos fluorescentes (*Standard F18W/154-T8 Daylight, Sylvania*) cubiertos con un filtro azul (*Moonlight Blue 183, Lee Filters*) (Figura 10). Aquellos inóculos de 50 mL que alcanzaron un valor de absorbancia a 674 nm situado entre 0,10 y 0,12, fueron transferidos a un frasco de poliestireno de 250 mL (*Flask Nunclon D, Nunc*), completando el volumen restante con PCR-S11. Posteriormente, se realizaron transferencias secuenciales a frascos de policarbonato transparente de 1, 4 y 10L (*Nalgene*).



Figura 10. Cámara de cultivos de *Prochlorococcus* y *Synechococcus*

1.3. Conservación

Aunque los cultivos de *Prochlorococcus* se mantuvieron habitualmente en crecimiento continuo, el siguiente protocolo de crioconservación (Moore *et al.*, 2007) se utilizó en diversas ocasiones. En primer lugar, se preparó el concentrado celular 50x. Para ello, se centrifugó a $7.741 \times g$ durante 15 minutos, a 24 °C, un cultivo de 50 mL que se encontraba al final de la fase exponencial de crecimiento. Tras retirar con cuidado la fase superior, el precipitado fue resuspendido en 1 mL de medio PCR-S11 y transferido a un tubo *ependorf* de 1,5 mL, previamente esterilizado, añadiéndole a continuación 75 μ L de DMSO. El contenido del tubo se mezcló por inversión varias veces, e inmediatamente se guardó en un congelador a -80 °C. La segunda parte de este método consistió en la recuperación del cultivo en medio fresco. Con este propósito, después de reducir la iluminación del área de trabajo al mínimo, se trasladó el tubo *ependorf* desde el congelador hasta una cámara de flujo laminar evitando su exposición directa a la luz. En el interior de la cámara, se raspó una pequeña cantidad de células congeladas con una punta de plástico esterilizada, que se introdujo en un frasco de poliestireno de 50 mL (*Flask Nunclon D, Nunc*) con 25 mL de medio PCR-S11, que fue colocado en la cámara de cultivo. El porcentaje de éxito al emplear este método de conservación de las estirpes resultó excesivamente variable, de tal manera que incluso en el mejor de los casos, la recuperación del cultivo requirió un tiempo mínimo de dos meses.

2. *Synechococcus* sp. WH 7803

2.1. Medio de cultivo

El cultivo de *Synechococcus* sp. WH 7803 se ha realizado en medio *Artificial Seawater* (ASW) basado en el medio AMP1 (Moore *et al.*, 2007), cuya composición se indica en la tabla 6.

2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de *Synechococcus* sp. WH 7803 crecieron en un medio de agua de mar artificial (ASW). Las condiciones lumínicas fueron $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con luz azul continua a 24° C. Esta cianobacteria se cultivó en frascos de 50 mL hasta alcanzar la fase estacionaria con una absorbancia de 0,1 unidades en una longitud de onda de 550 nm. En ese momento, los cultivos se diluyeron 1/10 con medio fresco.

Tabla 6. Preparación del medio ASW

Soluciones	Concentración final
<u>Mezcla de sales Turk's Island (1)</u>	
NaCl	481 mM
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	28 mM
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	27 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	10 mM
KCl	9 mM
<u>Macronutrientes</u>	
NaH ₂ PO ₄ (2)	50 µM
(NH ₄)SO ₄	400 µM
<u>Tampones</u>	
NaHCO ₃ (3)	6 mM
HEPES (4)	1 mM
<u>Traza de metales</u>	
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	0,1170 µM
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0,1180 µM
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,0008 µM
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,0005 µM
Los compuestos (excepto la mezcla de sales) fueron disueltos en agua destilada y filtrados en el momento de usarlos con filtros estériles de 0,2 µm (Millipore) bajo una cabina de flujo laminar. Además, fueron mantenidos por separado a 4°C.	
(1) Los componentes de la mezcla de sales Turk Island se disolvieron uno a uno en agua destilada y se esterilizaron mediante el autoclave.	
(2) La solución NaH ₂ PO ₄ fue ajustada a pH 7,5 con NaOH antes de esterilizarse.	
(3) El tampón NaHCO ₃ se mantuvo sólo hasta un mes.	
(4) El tampón HEPES fue ajustado a pH 7,5 con NaOH antes de esterilizarse.	

2.3. Conservación

Para la crioconservación de *Synechococcus* sp. WH 7803, se centrifugaron 160 mL de cultivo durante 10 minutos a 10.000 x g a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 4625 μ L de medio ASW con 7,5% de DMSO y se transfirió a crioviales de 5 mL. El vial se introdujo en nitrógeno líquido y a continuación se guardó a -80°C. Las células congeladas se atemperaron a 37°C en un baño de agua hasta que la mitad del líquido estaba descongelado. Dicho volumen se transfirió a medio estéril para revitalizar el cultivo.

3. *Synechococcus elongatus* PCC 7942

3.1. Medio de cultivo

La estirpe de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 y sus transformantes utilizados en este trabajo (tabla 7) se cultivaron en medio BG11 (Rippka et al., 1979). Dicho medio se preparaba a partir de un concentrado de sales 100x, K₂HPO₄ y una fuente de nitrógeno (tabla 8):

Tabla 7. Estirpes recombinantes de *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Estirpe recombinante	Características
CK1	CK1::Pro1404, Km ^r
CK3	CK3::Pro1404, Km ^r

Se usó kanamicina a 7 μ g/mL de concentración final para el cultivo selectivo de las correspondientes estirpes resistentes. Cuando se gaseaban los cultivos con CO₂, se añadía NaHCO₃ a una concentración final de 12 mM.

Para medio sólido se utilizó agar (BactoTM-Agar, Becton Dickinson and Company, BD) a concentración final 1% p/v. El agar (disuelto en la mitad del volumen final) y los nutrientes se esterilizaron por separado y se mezclaron antes de verterlo en las cajas Petri. Para ello la mezcla se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 50-55 °C, y se vertió en cajas de Petri a razón de unos 50 mL por caja.

Tabla 8. Preparación del medio BG11

Soluciones	Concentración final
Na ₂ CO ₃	0,2 mM
MgSO ₄	0,3 mM
CaCl ₂	0,24 mM
CoCl ₂	0,2 μM
Ácido cítrico	28,5 μM
Citrato férrico-amónico (17%)	0,02 mM
Na ₂ -EDTA	2,4 μM
H ₃ BO ₃	46 μM
MnCl ₂	9,1 μM
Na ₂ MoO ₄	1,6 μM
ZnSO ₄	0,8 μM
CuSO ₄	0,3 μM
K ₂ HPO ₄ (*)	0,2 mM
NaNO ₃ (*)	17,6 mM

El medio se prepara a partir de un concentrado 100x que carece de K₂HPO₄ y de NaNO₃, las cuales se añaden antes de esterilizar en el autoclave.

3.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron en una cámara termostatzada a 30°C, con iluminación por luz blanca fluorescente. Se emplearon tubos con un volumen entre 10 y 2000 mL de cultivo. A partir de 500 mL, los cultivos se gasearon con CO₂ al 1% y los cultivos con volumen inferior se cultivaron en matraces con agitación orbital a una velocidad de alrededor de 150 rpm. Durante el primer día, los cultivos permanecieron en oscuridad. Al día siguiente, los cultivos se iluminaron con luz continua blanca fluorescente (75 μE m⁻² s⁻¹).

El crecimiento sobre medio sólido se llevó a cabo en cajas de Petri colocadas en el interior de una cámara a 30 °C y, durante el primer día, sin luz. Después del primer día, los cultivos fueron iluminados por luz blanca fluorescente.

3.3. Conservación

Los cultivos de *Synechococcus* (PCC 7942, CK1 y CK3) se conservaron a 30 °C en una placa de Petri con BG11. Por otra parte, se guardó una copia de cada cultivo con 7,5 % de DMSO al igual que para *Synechococcus* sp. WH 7803 como se ha descrito en el apartado 2.3.

4. *Synechocystis* sp. PCC 6803

4.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para esta cianobacteria fue BG11, el mismo que para la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (tabla 5), al igual que el cultivo en medio sólido.

4.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio líquido se incubaron en agitadores orbitales *IKA Laborthechnik* modelo *KS501* digital a 30°C con iluminación continua de luz blanca (25-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y agitación constante de 100 rpm, o bien en condiciones de burbujeo, aplicando una mezcla aire-CO₂ en proporción 99:1 (v/v) a 30°C con iluminación continua de luz blanca (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) suministrada por paneles de tubos fluorescentes.

5. *Escherichia coli*

5.1. Estirpes

Una de las estirpes de *E. coli* utilizada en este trabajo fue DH5 α , la cual sirvió como herramienta de manipulación, usando dichas células competentes para las distintas transformaciones. La estirpe BL21, es una estirpe deficiente en las proteasas Lon y OmpT, que podrían degradar la enzima recombinante durante la purificación; debido a su baja eficiencia durante la transformación, es recomendable en ocasiones utilizar una cepa alternativa para la clonación y mantenimiento del vector (tabla 9).

Tabla 9. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	<i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁺ , <i>rK</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>Nal</i> ^r), <i>reA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) (Δ 80- <i>lacZ</i> Δ M15) <i>U169</i>	(Hanahan, 1983)
BL21	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i>	(Grodberg & Dunn, 1988)

5.2. Medios de cultivo

La base de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de cualquiera de las estirpes de *Escherichia coli* fue el medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook & Russell, 2001a), que se preparó disolviendo *LB Broth* (*Pronadisa*) en la cantidad de agua destilada indicada por el fabricante, y esterilizando posteriormente en el autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Para la preparación de medio sólido, fue utilizado de forma equivalente *LB agar* (*Pronadisa*); tras la esterilización del mismo, se enfrió hasta alcanzar una temperatura de 50-55 °C, y se vertió en cajas de *Petri* a razón de unos 20-25 mL por caja.

El medio SOC es un medio nutritivo que se usó para la preparación y transformación de células competentes. Su composición fue la siguiente:

Bacto Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Una vez disueltos todos los componentes se ajustó a 1L con agua destilada y se esterilizó mediante autoclave. Una vez enfriado el medio, se le añadió una solución de Mg²⁺ (MgCl₂•6H₂O) y glucosa a 20 mM de concentración final cada una y filtrado con filtros de 0,2 μ m bajo una campana de flujo laminar.

5.3. Condiciones de cultivo

El cultivo de *Escherichia coli* en medio líquido se realizó a 37 °C, en un incubador rotatorio que proporcionaba una agitación de 200-220 r.p.m. durante 14-18 h. Para ello, se utilizaron tubos *Falcon* de 10 mL y matraces de volumen variable, desde 100 mL hasta 2 L, en condiciones de esterilidad y manteniendo siempre una relación de volumen líquido/fase aérea que permitiera la correcta aireación del cultivo.

El crecimiento sobre medio sólido se llevó a cabo en cajas de *Petri* colocadas en el interior de una estufa a 37 °C.

5.4. Conservación

Las diferentes estirpes de *Escherichia coli* se conservaron a -80 °C en sus correspondientes medio de cultivo con un 15% de glicerol (v/v).

C. RECOGIDA DE MUESTRAS MARINAS

Desde el 29 de Septiembre al 14 de Noviembre del 2011 se realizó una campaña oceanográfica por el Atlántico “Atlantic Meridional Transect 21 (D371-AMT-21)” llevada a cabo por el UK Natural Environment Research Council National Capability, el Plymouth Marine Laboratory y el National Oceanography Centre de Southampton, gracias a la colaboración con el Prof. Mikhail Zubkov. Durante esta campaña oceanográfica se realizaron experimentos de transporte de glucosa en *Prochlorococcus*, además de una serie de bioensayos para determinar la concentración de glucosa en el Océano Atlántico. Para ello, en las 75 estaciones, el agua de mar fue recolectada en botellas Niskin y recogida en termos de 1L lavados previamente con HCl dos veces y otras dos con la misma agua de mar antes de guardarla en el termo. Las muestras fueron analizadas en el período de una hora desde su recogida.

Para el análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa en tiempo real, se filtraron botellas de 10 L y se hizo pasar el agua por un soporte de filtros de acero inoxidable de 90 mm de diámetro (*Millipore*), con un filtro de 0,22 µm (*Millipore*) y un prefiltro de fibra de vidrio (*Millipore*). Los filtros se sumergieron en 4 mL de tampón de resuspensión de RNA (20 mM EDTA; 400 mM NaCl; 0,75 mM sacarosa y 50 mM Tris (pH 7)) y se congeló mediante nitrógeno líquido, guardándose a -80 °C (Holtzendorff *et al.*, 2002). El análisis se realizó en el laboratorio a la vuelta de la

campana oceanográfica.

D. MÉTODOS DE RECOGIDA DE CÉLULAS

Las células de cianobacterias se recogieron mediante centrifugaciones que se realizaron en frascos de centrífuga estériles de 250 o 500 mL de *Beckman*. Las alícuotas de 250 mL se centrifugaban durante 5 min a 30.000 x g, y las alícuotas de 500 mL, durante 8 min a 18.600 x g. La temperatura utilizada dependió de las condiciones requeridas; en el caso de concentrar un cultivo para medir actividad o transporte se realizó a la temperatura de crecimiento del cultivo (24°C en el caso de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* sp. WH 7803 y 30 °C en el caso de *Synechocystis* y *Synechococcus elongatus*). Cuando se recogieron células para experimentos de proteómica o expresión génica, la temperatura utilizada fue de 4 °C.

Las células de *E. coli* se recogieron utilizando una microcentrífuga *Eppendorf* (16.000 x g 1 min).

E. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

1. Rotura celular en Prensa de French

Los extractos celulares de *Prochlorococcus* se obtuvieron en una prensa de French *AMINCO* modelo *FA-079*, tras un paso a 1.000 psi; posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 x g, a 4 °C. El sobrenadante recogido fue utilizado tanto para proteómica como en las medidas de concentración de proteína.

2. Rotura celular por choque térmico

Las células de *Prochlorococcus* fueron recogidas en frascos de polipropileno de 50, 250 o 500 mL (según el volumen utilizado) en la centrífuga *Beckman Avanti J-25* equipada con los rotores *JA-20*, *JA-14* o el rotor *JLA-10.500*. El precipitado resultante fue resuspendido en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, a razón de 2 mL por cada litro de cultivo, conservándose a -80 °C. Al día siguiente, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 x g, a 4 °C. El sobrenadante recogido se utilizó para medir la concentración de proteína.

3. Rotura celular con perlas de vidrio

Los extractos celulares del resto de cianobacterias utilizadas en este trabajo se obtuvieron mediante rotura con perlas de vidrio. Para ello se centrifugaron los cultivos en frascos de polipropileno de 50 mL o 250 mL (*Beckman*), en sucesivas centrifugaciones de 5 minutos a $30.100 \times g$, a una temperatura constante de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, en una centrífuga *Beckman Avanti J-25* usando los rotores *JA-20* o *JA-14*; o bien, en frascos también de polipropileno, de 500 mL (*Beckman*), en sucesivas centrifugaciones de 8 minutos a $18.592 \times g$, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando el rotor *JLA-10.500*. También se utilizó este método en caso de necesitar pequeñas cantidades de extracto (1 o 2 mL).

El precipitado obtenido se resuspendió en 200 μL de Tris-HCl 7,5 50 mM y se añadieron 112,5 mg de perlas *B. Braun Melsungen AG* de 0,10 – 0,11 mm de diámetro. A continuación se sometió a 5 períodos de 2 minutos en agitación y 2 minutos en hielo y se centrifugó a $16.000 \times g$ durante 5 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la medida de la proteína.

F. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

1. Crecimiento de cianobacterias

El crecimiento de los cultivos de *Prochlorococcus* se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 674 nm, tras ajustar a cero con una muestra de medio PCR-S11. En el caso de *Synechococcus* sp. WH 7803 se midió la absorbancia a 550 nm, tras ajustar con medio ASW. El crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se determinó cuantificando la clorofila (apartado F.4). Se utilizaron dos métodos para la estimación del crecimiento de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 y sus estirpes recombinantes, la cuantificación de la clorofila y la medida de absorbancia a 750 nm usando como blanco el medio BG11.

2. Determinación del espectro de fluorescencia de *Prochlorococcus*

La determinación del espectro de fluorescencia de las diferentes estirpes de *Prochlorococcus* se realizó midiendo de forma rutinaria los espectros de emisión de las muestras de cultivo, entre 375 y 650 nm. Para ello, se empleó un fluorímetro *Perkin Elmer*, modelo *LS50B*, con una cubeta de cuarzo 101-OS 10 mm de *Hellma*. La

variación en la composición de pigmentos fotosintéticos de cada una de las estirpes permitió diferenciarlas a partir de sus espectros de fluorescencia (Partensky et al., 1993).

3. Determinación de proteína

Se utilizó el *Bio-Rad Protein Assay*, basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), determinando la absorbancia a 595 nm. Las muestras de los extractos crudos se diluyeron 1:1000. 200 μ L de esta dilución se mezclaron con 200 μ L de reactivo Bradford y se realizaron las medidas en placas de 96 pocillos.

La concentración de proteína se calculó aplicando las diferentes ecuaciones experimentales que fueron obteniéndose en el transcurso de este trabajo, a partir de una serie de muestras de albúmina sérica bovina.

4. Determinación de clorofila

Para la determinación de clorofila se siguió el método descrito por Mackinney (Mackinney, 1941). Las medidas de clorofila se realizaron usando alícuotas de los cultivos celulares con distintos volúmenes según la cianobacteria utilizada.

En los cultivos de *Prochlorococcus*, el precipitado correspondiente a 1 mL de extracto se resuspendía en 10 mL de medio PCR-S11, tomándose para la medida de clorofila 200 μ L de esta disolución, por triplicado. En el caso de que la medida se realizara sobre cultivos, se tomaban alícuotas de 10 mL. A partir de este punto, el protocolo era el mismo para ambos casos. Las muestras se centrifugaban a 16.100 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspendía en 1 mL de metanol al 100%, se agitaba durante unos segundos y se sometía a una nueva centrifugación a 16.100 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se medía la absorbancia a 665 nm del sobrenadante obtenido en esta última centrifugación.

Para calcular la concentración de clorofila en la muestra se extrapolaba la absorbancia medida en una recta patrón, puesta a punto para *Prochlorococcus* por miembros de nuestro grupo, teniendo en cuenta, en cada caso, el factor de dilución de dicha muestra.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\mu\text{g clorofila/mL} = (A_{665} + 2,996 \cdot 10^{-4}) / 0,074069$$

En el resto de cianobacterias (*Synechococcus* sp. PCC 7942, sus transformantes CK1 y CK3 y en *Synechocystis* sp. PCC 6803) se tomaron 100 μL del cultivo en un tubo *ependorf*, debido a su alta concentración celular, y se centrifugó 1 min a 16.100 x g, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le añadió 1 ml de metanol. A continuación, se agitó 30 segundos y se centrifugó de nuevo 1 min a 16.100 x g. Al sobrenadante se le midió la absorbancia a 665 nm. La concentración de clorofila se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g clorofila/mL} = A_{665} \times 13,43 \times 11$$

5. Cuantificación de ácidos nucleicos

Las soluciones de ácidos nucleicos se cuantificaron midiendo su absorbancia a 260 nm, considerando que una unidad de absorbancia corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ en el caso del DNA bicatenario y a 40 $\mu\text{g/mL}$ para el RNA (Sambrook & Russell, 2001b).

La pureza de las preparaciones se determinó considerando que el cociente A_{260}/A_{280} debía encontrarse entre 1,8 y 2. Las medidas se realizaron en un aparato *NanoDrop "ND-1000 Spectrophotometer"* (*NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA*) utilizando 2 μL de muestra de ácido nucleico. Como blanco se usó 2 μL de agua MilliQ.

6. Determinaciones enzimáticas

6.1. Medida del glucógeno mediante un ensayo acoplado

Para la medida del glucógeno se utilizaron cultivos de *Prochlorococcus* sp. SS120 (estirpe de baja irradiancia) y MED4 (estirpe de alta irradiancia). Para el experimento se necesitaron 20 L de cada cultivo, 10 L para el control y 10 L a los que se le añadió glucosa de una solución stock de 20 mM esterilizada y filtrada para obtener una concentración final de 1 μM .

Al cultivo de MED4 se le añadió 100 µg/ mL de kanamicina, tanto al control como al experimento con glucosa, para eliminar los posibles contaminantes que tuviera el cultivo (Tolonen *et al.*, 2006).

El cultivo se recogió en su fase estacionaria y el precipitado se resuspendió en tampón TEA (trietanolamina) 0,25 M pH 7,6 guardándose a -80°C.

Para la determinación de glucógeno se utilizó el método previamente descrito (Ernst *et al.*, 1984). Para ello se utilizó 200 µL del precipitado a -80° C, al que se le añadió 200 µL de KOH al 30% y se incubó durante 90 minutos a 100° C. Con un choque térmico de 5 minutos en hielo se rompieron las células e inactivaron las enzimas. A continuación, se centrifugó durante dos minutos para separar las células rotas (precipitado) del glucógeno en suspensión (sobrenadante) y se añadió al sobrenadante 600 µL de etanol 96%, manteniéndose durante 2 h en hielo para precipitar el glucógeno.

Una vez aislado el glucógeno, se procedió a su hidrólisis añadiendo 300 µL de solución de amiloglucosidasa (13 U/mL) y 400 µL de amilasa (20 U/mL) incubándose a 55° C durante 30 minutos. Ambas soluciones de enzimas se prepararon en tampón acetato potásico 0,1 M pH 4,75.

Por último, se procedió al ensayo acoplado de hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para medir la glucosa. Todas las enzimas fueron suministradas por *Roche*. Los componentes del ensayo se recogen en la tabla 10.

Tabla 10. Componentes del ensayo HQ-G6PDH. Volumen final 1 mL.

Componentes	Volumen (µL)	Concentración final
Tampón TEA 0,25 M pH 7,6 + MgSO ₄ 40 mM	200	Tampón TEA 50 mM y MgSO ₄ 8mM
EDTA 0,5 M pH 8	10	5 mM
ATP 76 mM	26	2 mM
NADP 10 mM	50	0,5 mM
Hexoquinasa 56 U/ mL en T.TEA+ MgSO ₄	5	0,28 U
Glucosa-6-P deshidrogenasa	5	0,14 U
Extracto hidrolizado	50	
Agua MQ	654	

Se añadió primero la hexoquinasa, esperándose unos minutos para que se lleve a cabo la primera reacción y posteriormente se añadió la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, midiendo la absorbancia a 340 nm (Figura 11).

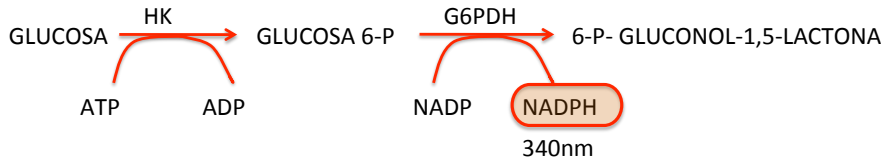


Figura 11. Ensayo acomplado de la hexoquinasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

El objetivo fue que se consumiera toda la glucosa. Como control positivo se utilizó glucógeno comercial, una vez realizada una curva para determinar la concentración a la que se saturaba la reacción. Finalmente se observó saturación con 5 mg/ mL de glucógeno comercial. También se realizó un control con material celular sin hidrolizar con amilasa, para determinar el contenido de glucosa libre del extracto.

Para calcular el contenido de glucógeno, se usó la relación:

$$[\text{NADPH}]_{\text{producido}} = \frac{A_{340/\text{min}}}{6,22}$$

El resultado se dividió entre el volumen de muestra que fue 0,2 mL. Puesto que la relación de NADPH producido con respecto a la glucosa es de 1, dicho valor representa la concentración de glucosa/ mL que había en el extracto.

7. Determinación de CO₂ mediante cromatografía de gases

Para la determinación del CO₂ se usaron 4 L de *Prochlorococcus* SS120 y 4 L de *Prochlorococcus* MED4 en la fase exponencial, cuando el valor de absorbancia a 674 nm alcanzaba 0,05 unidades. Dichos cultivos se pasaron a frascos de vidrio con rosca sellados herméticamente, 2 L para el control y los otros 2 L para el experimento con glucosa. Los tampones contenían un septum de silicona para inyectar los gases y poder recoger los gases liberados en el cultivo. Para ello, se añadieron entre 0,1 y 1 μM de glucosa a 2 L del cultivo. Con el fin de medir los gases liberados de forma

precisa los botes se abrieron y cerraron al mismo tiempo y las muestras se tomaron a 1, 5, 24, 48 y 72 h.

A los cultivos de MED4, se les añadió kanamicina a una concentración de 100 µg/mL para eliminar los posibles contaminantes.

El CO₂ producido por los cultivos líquidos de *Prochlorococcus* se cuantificó analizando la fase gaseosa del espacio de cabeza de los mismos. Para ello, se tomaron 500 µl que se analizaron en un cromatógrafo de gases (*Agilent 7820A*) equipado con dos columnas en serie (*HP-PLOT Q* 30 m x 0,530 mm, 40 µm + *HP MOLESIEVE* 30 m x 0,530 mm, 25 µm), acopladas a un detector de conductividad térmica usando argón como gas portador. El área de los picos resultantes del cromatograma se cuantificó usando un recta de calibrado construida con diferentes volúmenes de aire atmosférico. Este sistema es capaz de detectar CO₂ por debajo de la concentración atmosférica con un límite de detección de 0,00005%, además de otros gases como N₂, O₂, H₂ y vapor de agua.

El cromatógrafo nos muestra los gases liberados por el cultivo expresados en µL/mL de cultivo.

Paralelamente se prepararon placas LB agar con la misma concentración de glucosa empleada en la determinación de CO₂ y se sembraron células del mismo cultivo de *Prochlorococcus* utilizado a posteriori para controlar los posibles contaminantes heterótrofos que estuvieran presentes en el cultivo. Dichas placas se mantuvieron con la misma iluminación (luz continua azul de 4 µE m⁻² s⁻¹) y temperatura (24 °C) que los cultivos.

8. Determinación del porcentaje de células contaminantes en los cultivos de *Prochlorococcus*

8.1. Análisis por citometría de flujo

El procedimiento de aislamiento de las diferentes estirpes implica que el único organismo fotosintético presente en los cultivos es *Prochlorococcus* (Partensky et al., 1993, Chisholm et al., 1988) lo que facilita su identificación en los cultivos mediante la citometría de flujo.

La determinación del grado de contaminación de los cultivos utilizados en los experimentos de cinética (*Prochlorococcus* sp. SS120, *Synechococcus* sp. WH 7803, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en los transformantes CK1 y CK3) se llevó a cabo

utilizando un citómetro de flujo *BD Influx* (*Beckton Dickinson, Biosciences, Oxford, UK*). En los experimentos con muestras naturales se utilizó el citómetro *FACS Calibur* (*Beckton Dickinson, Biosciences, Oxford, UK*).

Las muestras que se utilizaban eran cultivos o muestras naturales fijados con una solución de paraformaldehído a una concentración final de 1% durante una hora. A continuación fueron teñidos con SYBR Green I (Sigma) en presencia de 30 mM de citrato potásico (Marie *et al.*, 1997) durante 1h más.

Los datos, en el caso del citómetro *FACS Calibur*, se obtuvieron utilizando el programa *CellQuest Software* (*BD Biosciences, Oxford*) con un flujo de 15-60 mL min⁻¹ durante un minuto dependiendo de la concentración de la muestra. Para el calibrado del aparato, se utilizaron 25 µL (de una concentración stock de 6.192.875 microesferas/mL) de microesferas fluorescentes de 0,5 µm por cada mL de muestra, como control interno (*Fluoresbrite Microparticles, Polysciences, Warrington, USA*).

En el caso del citómetro *BD Influx*, los datos se obtuvieron utilizando el programa *Sortware* (*BD Biosciences, Oxford UK*) con una presión de 20 psi. Para el calibrado del aparato, se utilizó como control interno 1 µL de microesferas fluorescentes *Flow Check High Intensity Green Alignment* de *Polysciences, Inc.* de 1 µm de diámetro por cada mL de cultivo (se le añadía una gota por cada 5 mL de agua destilada filtrada).

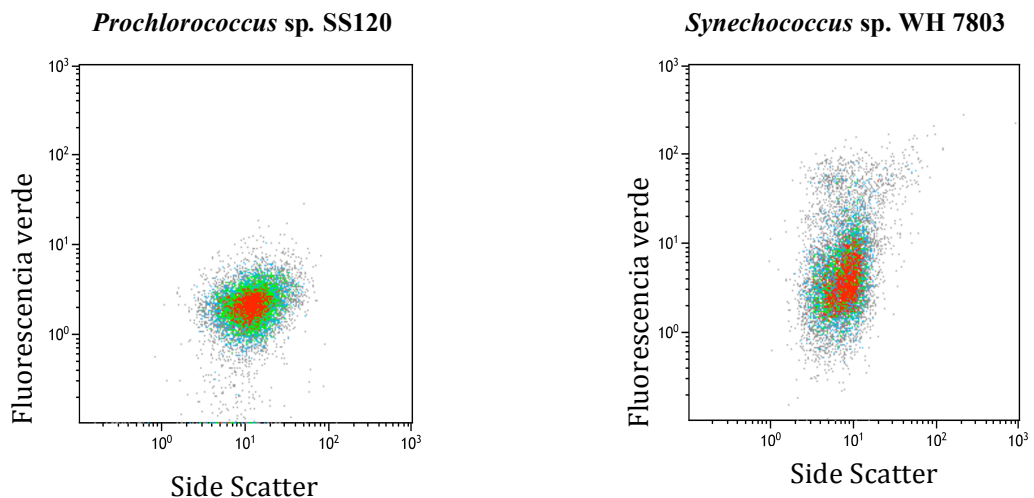


Figura 12. Citogramas obtenidos de un cultivo de *Prochlorococcus* sp. SS120 y de *Synechococcus* sp. WH 7803

En base a la composición de pigmentos de las células de *Prochlorococcus*, se analizó la fluorescencia roja (FL3), donde se sitúan las moléculas que emiten entre 660 y 700 nm, entre ellas las clorofilas. También se tuvo en cuenta el *forward scatter*, este parámetro consiste en la cantidad de luz procedente del láser recogida tras pasar a través de la muestra sin incidir en la partícula, por lo que puede considerarse proporcional al tamaño de dicha partícula. La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (*side scatter*) es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula (Figura 12). Por último, se tiñó el DNA de las células mediante *Syber-Green* (FL1), para el posterior aislamiento de las poblaciones presentes en las muestras.

8.2. CARD-FISH para muestras de *Prochlorococcus* en filtros de membrana

La citometría de flujo combinada con otras técnicas tiene un gran potencial ya que pueden distinguirse ópticamente poblaciones microbianas, aislarlas mediante citometría de flujo y recolectarlas en filtros de membrana para un posterior análisis como es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Para determinar el porcentaje de contaminación en el cultivo, se aislaron células pertenecientes a *Prochlorococcus* según su fluorescencia y tamaño haciéndolas pasar por un filtro de 0,2 μm , al igual que las posibles bacterias que aparecieran en poblaciones independientes en otro filtro.

La técnica FISH comienza con una fijación de la muestra que estabiliza las macromoléculas y las estructuras del citoesqueleto previniendo la lisis de las células durante la hibridación y al mismo tiempo permeabiliza la pared celular para la marcación por fluorescencia con sondas de oligonucleótidos.

La técnica de hibridación fluorescente *in situ* se realizó siguiendo el método descrito por Pernthaler (Pernthaler *et al.*, 2002), con las modificaciones de Zubkov (Zubkov *et al.*, 2007). Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo del Prof. Mikhail Zubkov en el National Oceanography Centre de Southampton.

Para ello, se fijaron las muestras de *Prochlorococcus* (situada en los filtros de membrana) sumergiendo los filtros en agarosa al 0,1% precalentada. A continuación, se situaron boca abajo en parafilm dejándolos secar durante 15 minutos a 37 °C. Una vez fijados, los filtros se incubaron en una solución de lisozima (tabla 11) durante 60 min a 37 °C. A continuación se lavaron con agua MilliQ y se inactivó la peroxidasa endógena con 0,01 M HCl durante 10 min a temperatura ambiente.

Tabla 11. Solución de lisozima

Compuesto	Concentración final
Lisozima	10 mg/ mL en 0,05 M EDTA pH 8
Tris-HCl	0,1 M pH 8

Los filtros se lavaron con 96% de etanol y agua MilliQ, y se dejaron secar sobre un papel de Whatman.

Las células fijadas se incubaron en un tampón que contenía la sonda específica marcada con 5'-peroxidasa de rábano (HRP) [50 ng DNA μL^{-1}] en un ratio 300:1 o 1:100 dependiendo de la muestra.

La identificación taxonómica de *Prochlorococcus* y bacterias fue realizada mediante el análisis del DNA ribosómico usando la sonda EUB338 para bacterias con la secuencia GCT GCC TCC CGT AGG AGT (Amann *et al.*, 1990) y la sonda *405Pro* para *Prochlorococcus* con la secuencia AGA GGC CTT CGT CCC TCA (West *et al.*, 2001a). Sólo se tiñeron las células que contenían la secuencia entera en su RNA ribosómico.

Los filtros fueron sumergidos en el tampón de hibridación (tabla 12) y colocados en un portaobjetos cubierto con parafilm. A continuación se cubrieron los filtros con 50 μL del mismo tampón.

Tabla 12. Tampón de hibridación (volumen final 2 mL)

Compuesto	Volumen (μL)
NaCl 5 M	360
Tris-HCl 1 M pH 8	40
Formamida (depende de la sonda)	700 (<i>Prochlorococcus</i>) y 800 (Bacterias)

Para poder incubar por debajo del punto de fusión el híbrido formado entre la sonda y el RNAr (46 °C) se usó un tubo falcon de 50 mL y en su interior se introdujo un papel al que se le añadió 2 mL del tampón de hibridación creando un espacio húmedo idóneo para mantenerlo a la temperatura deseada. Se introdujo el portaobjetos en posición horizontal en el interior del falcon y se incubó durante 3 h a 46 °C. A

continuación, se lavaron los filtros con un tampón de lavado (tabla 13) precalentado durante 10 min a 48 °C, y pasado este tiempo con PBS 1x durante 15 min a temperatura ambiente retirando de esta forma la sonda que no ha quedado unida al RNAr, y por tanto quedando sólo la sonda unida.

Tabla 13. Tampón de lavado (volumen final 50 mL)

Compuesto	Volumen (mL)
EDTA 0,5 M pH 8	0,5
Tris-HCl 1 M pH 8	1
NaCl (dependiendo de la sonda)	0,7 (<i>Prochlorococcus</i>) y 0,46 (Bacterias)
SDS 10%	0,05
Agua MQ	47,75

La técnica **CARD** (*catalyzed reporter deposition*) se basa en la deposición de un gran número de moléculas de tiramida marcadas fluorescentemente (componentes fenólicos) en la muestra que ha sido hibridada con las sondas marcadas con peroxidasa anteriormente. Esta deposición de moléculas de tiramida produce intermediarios altamente reactivos, los cuales son capaces de unirse a motivos de proteínas tales como tirosinas que se encuentran cerca del sitio de unión de la sonda dentro de la célula. De esta forma muchas moléculas fluorescentes estarán en la vecindad del sitio diana de la sonda, lo cual llevará a una alta intensidad de la señal mejorando la sensibilidad que se lograba con el FISH (Figura 13).

Para ello, fue necesario preparar una atmósfera húmeda al igual que en la etapa de hibridación del FISH; con este fin se introdujo un trozo de papel en un tubo falcon de 50 mL colocándose de forma que se adhiera a las paredes del tubo y se humedeció con 2 mL de agua para mantener una temperatura determinada. Por otra parte, se preparó una solución de H₂O₂ (0,15% en PBS) y se mezcló con un tampón de amplificación (tabla 14) en una proporción de 1:100. A continuación se añadió a la mezcla un agente fluorescente llamado FITA (similar a la tiramina) a una concentración de 1 mg/mL y se mezcló todo bien manteniéndose en oscuridad.

Los filtros fueron sumergidos completamente en la mezcla de amplificación y colocados hacia arriba en un portaobjetos cubierto con parafilm. El resto de la mezcla

de amplificación se colocó encima de los filtros. Finalmente se introdujo el portaobjetos en posición horizontal en el tubo falcon y se incubó a 46 °C durante 45 min en oscuridad.

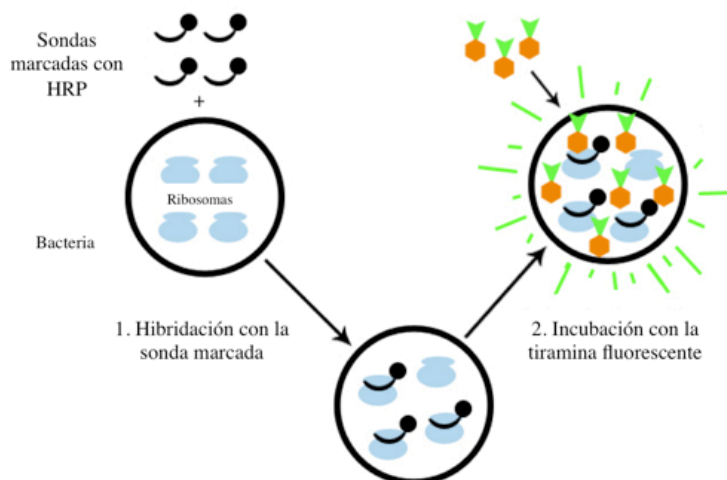


Figura 13. Esquema de la técnica CARD-FISH

Tabla 14. Tampón de amplificación CARD (volumen final 40 mL)

Compuesto	Volumen (mL)
PBS 20x pH 7,6	2
Agente bloqueante 10%	0,4
NaCl 5 M	16
Agua MQ	21,6
4 g Dextrano sulfato	

Para eliminar el exceso de la mezcla en los filtros se limpió cuidadosamente con un papel de Whatman y a continuación se incubó con PBS 1x durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo se lavaron con agua desionizada y etanol 96% dos veces consecutivas durante 1-2 min.

Por último, se tiñeron las preparaciones de CARD-FISH con 50 µL de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 µg ml⁻¹) y se incubó durante 3 min a temperatura

ambiente en oscuridad. Los filtros se lavaron con etanol 80% y agua destilada. Una vez teñidos se colocaron los filtros en un portaobjetos con un par de gotas de aceite de inmersión “Citifluor” y un cubreobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio invertido usando el filtro UB para contar las células totales teñidas con DAPI y el filtro de fluorescencia azul para contar las células con la sonda específica. El número de células de *Prochlorococcus* se determinó como las células unidas a la sonda 405Pro respecto a las células totales visualizadas con el DAPI. El número de bacterias se determinó como el número de células unidas a la sonda EUB338 respecto a las células totales visualizadas con el DAPI. Finalmente, para saber el porcentaje de contaminantes exacto en cada población de *Prochlorococcus* aislada con el citómetro, se le restaba al número de bacterias total el número de células de *Prochlorococcus* detectado con la sonda 405Pro. La abundancia media y la desviación estándar se calcularon a partir de estos valores.

9. Determinación del transporte de glucosa

9.1. Cinéticas del transporte de glucosa

Se utilizaron cultivos que se encontraban por encima de la fase exponencial para obtener un mayor número de células y por tanto una mayor radiactividad. En el caso de los cultivos de *Prochlorococcus* sp. SS120 la absorbancia a 674 nm fue de 0,05-0,06 unidades, *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, las estirpes recombinantes de ésta y de *Synechococcus* sp. PCC 6803 tenían alrededor de 16 µg de clorofila/ mL.

El transporte de glucosa en *Synechococcus* sp. WH 7803 se midió cuando el cultivo se encontraba en una absorbancia de 0,01 a una longitud de onda de 650 nm. Los cultivos se mantuvieron en un baño con una temperatura de 24 °C en el caso de *Prochlorococcus* y de 25 °C en el caso de *Synechococcus* y *Synechocystis* bajo luz continua azul de 4 µE m⁻² s⁻¹.

Se añadió [U-¹⁴C]-glucosa (281 mCi/mmol, Sigma) a un volumen de cultivo de 0,7-4,5 mL según el experimento a una concentración final de 0,010-20 µM. Se usaron mezclas de glucosa radiactiva (concentración final de 1µM) con glucosa sin marcar radiactivamente de un stock de 4,5-7 mM para lograr concentraciones más altas.

Las alícuotas (200-1000 µL) se tomaron a los 3, 6 y 9 minutos (para

Prochlorococcus sp. SS120) y 2, 5 y 10 minutos (para *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 y para *Synechococcus* sp. WH 7803) debido a los tiempos de saturación observados en la realización de la cinética del transporte de glucosa en cada estirpe. Dichas alícuotas se hicieron pasar por filtros de 0,22 μM (en el caso de *Prochlorococcus* sp. SS120 y *Synechococcus* sp. WH 7803) y 0,44 μM (en el caso de *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, las estirpes recombinantes y *Synechocystis* sp. PCC 6803).

Los filtros se lavaron con Tris-HCl pH 7,5 a una concentración final de 25 mM y se introdujeron en viales de centelleo con 5 mL de líquido de centelleo *ReadyProtein Cocktail* (Beckman Coulter). Finalmente, se utilizó el contador de centelleo *LS6000IC* (Beckman Coulter) para medir la radiactividad contenida en los filtros. Las condiciones del cultivo, filtración, lavado y medida de la radiactividad en los filtros descritas en este apartado, se llevaron a cabo de igual forma en todos los experimentos explicados a continuación realizados con los cultivos de cianobacterias marinas.

9.2. Ensayo de competición de azúcares

Este experimento se realizó con el transformante CK1 para estudiar la especificidad del transportador *melB* por la glucosa, para ello se añadió el volumen necesario de [U- ^{14}C]-glucosa 100 μM a 4,5 mL de cultivo, de modo que quedara a una concentración final de 0,5 μM . Se utilizaron azúcares sin marcar como la glucosa, melibiosa, fructosa y sacarosa de una solución almacén de 4,5 mM cada una para alcanzar concentraciones mayores de 5 μM y 50 μM . Las alícuotas (de 1 mL cada una) se tomaron a los 5, 10, 15 y 20 minutos. Se usaron filtros de 0,45 μM .

Para los experimentos de competición de azúcares con muestras de mar se utilizó D-[5,6- ^3H] glucosa (actividad específica 60 Ci / mmol) y se añadió a 1,6 mL de agua marina a una concentración final de 1 nM. Los azúcares sin marcar (fructosa, galactosa, sacarosa y melibiosa) se añadieron a una concentración final de 0,5 nM y 2 nM. Por lo tanto, la concentración final de azúcar en cada vial fue 1,5 nM y 3 nM.

Las muestras se incubaron en tubos de polipropileno estéril de 2 ml con tapón enroscado en oscuridad a temperaturas en situ y se fijaron con PFA al 1% a 45, 90, 135 y 180 min respectivamente.

Las muestras se filtraron sobre filtros de policarbonato de 0,2 mm y la

radioactividad retenida en los filtros se midió como desintegraciones por minuto utilizando un contador de centelleo líquido. Las muestras recogidas en este experimento se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Muestras de mar recogidas durante la campaña oceanográfica AMT-21 para la realización de ensayos de competición de azúcares.

Fecha	CTD	Hora del muestreo (GMT)	Latitud	Longitud	Profundidad
28.10.11	055	05:53	20° 00.85' S	25° 05.46' W	20
29.10.11	057	05:48	23° 04.58' S	25° 03.43' W	20
30.10.11	059	05:48	26° 05.53' S	25° 01.49' W	20
31.10.11	061	06:11	28° 48.13' S	25° 57.09' W	20
2.11.11	065	06:12	32° 43.55' S	31° 33.07' W	20
5.11.11	067	06:01	38° 13.33' S	39° 31.12' W	20
6.11.11	069	06:08	40° 20.22' S	42° 45.28' W	20
6.11.11	070	15:32	41° 07.54' S	43° 58.95' W	20
7.11.11	071	06:00	42° 18.87' S	45° 53.70' W	20
7.11.11	072	15:18	43° 06.56' S	47° 10.77' W	20
8.11.11	073	06:13	44° 20.01' S	49° 11.62' W	20

9.3. Efecto de inhibidores

En los experimentos con inhibidores se añadió glucosa radiactiva a una concentración final de 1 μM (a partir de una solución de 100 μM) a un volumen de 4,5 mL de cultivo de *Prochlorococcus* sp. SS120. Al mismo tiempo se añadieron los distintos inhibidores suministrados por Sigma-Aldrich (tabla 16).

Para analizar el efecto de CCCP, monensina y valinomicina se pesó la cantidad necesaria de cada uno de ellos y se disolvieron en DMSO obteniendo soluciones stock de 25 mM (CCCP), 5 mM (monensina) y 9 mM (valinomicina).

Tabla 16. Inhibidores utilizados para el estudio del transporte de glucosa

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN FINAL
CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona)	50 μ M
Monensina	10 μ M
Valinomicina	15 μ M
DCCD (diciclohexilcarbiimida)	200 μ M
DCMU (3-(3,4 di cloro fenil) -1,1 dimetil urea)	0,3 μ M
DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6 isopropilbenzoquinona)	0,06 μ M

Para el efecto del inhibidor DCCD se preparó una solución stock de 50 mM en etanol 95%. Los experimentos en los que se analizó el efecto del DCMU se realizaron añadiendo 13,5 μ L de una disolución de 23,31 mg/mL en medio PCR-S11 (100 μ M) a 4,5 mL de cultivo. El efecto del DBMIB se analizó añadiendo 2,7 μ L de una disolución 100 μ M realizada en metanol. Para medir el efecto del transporte sobre los inhibidores se tomaron alícuotas de 1 mL a los 3, 6, 9 y 12 minutos. Dichas alícuotas se hicieron pasar por filtros de 0,22 μ M y la radiactividad contenida se midió en un contador de centelleo añadiendo 4 mL de líquido de centelleo.

9.4. Transporte de glucosa en poblaciones naturales de *Prochlorococcus*

Se tomaron muestras de agua de mar en las 75 estaciones que se muestrearon durante la campaña AMT-21 y se midió el perfil hidrológico mediante una sonda CTD (Conductivity Temperature Depth) que permite la realización y monitorización de medidas de perfil de la conductividad, temperatura, presión, oxígeno disuelto y turbidez, a lo largo de la columna de agua. Para medir el transporte de glucosa en las poblaciones naturales de *Prochlorococcus*, se incubaron 1,6-8 mL de agua de mar con 2 nM D-[5,6 3 H] glucosa durante 4 h. Las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% y el DNA se tiñó con *Syber- Green* en presencia de 30 mM de citrato potásico. Tanto las células de *Prochlorococcus* como las del resto de bacterias se aislaron por citometría de flujo mediante la técnica FACS, como se describe en el siguiente apartado. El sistema de aislamiento de células se acopló a un sistema de filtración con filtros de 0,2 μ m de policarbonato, para recoger la población de *Prochlorococcus*. Los filtros se lavaron dos veces con 4 mL de agua desionizada

Millipore. La radioactividad contenida en dichos filtros fue medida como cuentas por minuto, con la adición de 20 mL de cóctel de centelleo líquido usando el contador de centelleo.

G. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE LA TÉCNICA FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

Para la determinación del transporte de glucosa en la población de *Prochlorococcus* se usó el equipo *FACS Calibur* mediante la separación de células, también llamada *Fluorescence Activated Cell Sorting*. La separación celular por citometría de flujo es el proceso de separación física de partículas en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo analítica. Las células se fijaron y tiñeron como se ha explicado en el apartado F.9.4.

Para el análisis de la población total de bacterioplancton se utilizaron los parámetros del *side scatter* (SSC) frente a FL1 (fluorescencia verde, producida por la tinción de DNA mediante *Sybr-Green*) y para el análisis de la población de *Prochlorococcus*, FL3 (fluorescencia roja, producida por la clorofila) frente a FL1 (DNA), quedándose de esta forma muy bien discriminada la población de *Prochlorococcus* del resto de bacterias y recogiendo así las células con un extra de fluorescencia roja, ya que son las células que están más separadas del resto de bacterias (Figura 14).

Se recogieron las células con un flujo de 15-60 mL min⁻¹ durante un minuto, dependiendo de la concentración de la muestra. El sistema de aislamiento de células se acopló a un sistema de filtración para recoger las distintas poblaciones y poder analizarlas posteriormente.

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter).

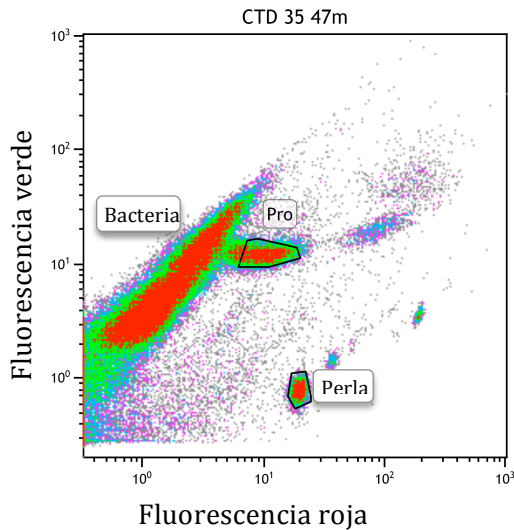


Figura 14. Citograma obtenido de una muestra natural (CTD 35, 47m). Las distintas poblaciones de bacterias se separaron en base a la fluorescencia roja que poseen las bacterias frente a la fluorescencia verde obtenida al teñir el DNA con *SYBR Green*.

H. BIOENSAYOS PARA ESTIMAR LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN EL OCEANO ATLÁNTICO

Se realizaron una serie de bioensayos para la determinación de la concentración de glucosa en el Océano Atlántico siguiendo el método previamente descrito (Wright & Hobbie, 1966, Zubkov & Tarran, 2005, Zubkov et al., 2008).

Se realizaron bioensayos de glucosa en las 75 estaciones realizadas durante la campaña oceanográfica AMT-21 (Figura 15). Las muestras usadas para las determinaciones fueron recogidas en termos de 1 litro lavados dos veces con ácido clorhídrico y dos veces con agua destilada. Dichas muestras se analizaron en el plazo de una hora desde el momento de su recogida.

Se añadió D-[5,6 ^3H] glucosa (60 Ci/mmol, *Hartmann Analytic*, Alemania) a un volumen de 1,6 mL de agua de mar para obtener distintas concentraciones finales 0,25-1,25 nM. Las muestras fueron incubadas en tubos estériles de polipropileno, con rosca de 2 mL, a temperatura ambiente y fijadas con 1% de paraformaldehído (PFA) durante 10, 20 y 30 minutos o bien 30, 50, 70 y 90 minutos. Estos tiempos de incubación variaron según el transporte de glucosa total que había en determinadas zonas del océano Atlántico, por lo que a veces el tiempo aumentaba para poder detectar más radiactividad. De una de las muestras fijadas con paraformaldehído, se tomaron 3 volúmenes de 10, 20 y 30 μL y se midió la radiactividad en cuentas por minuto en tubos de 5 mL (*Mini Poly-QTM Vial de Beckman*) con 4 mL de cóctel de

centelleo en el contador *Tri-Carb 3100, Perkin Elmer*.

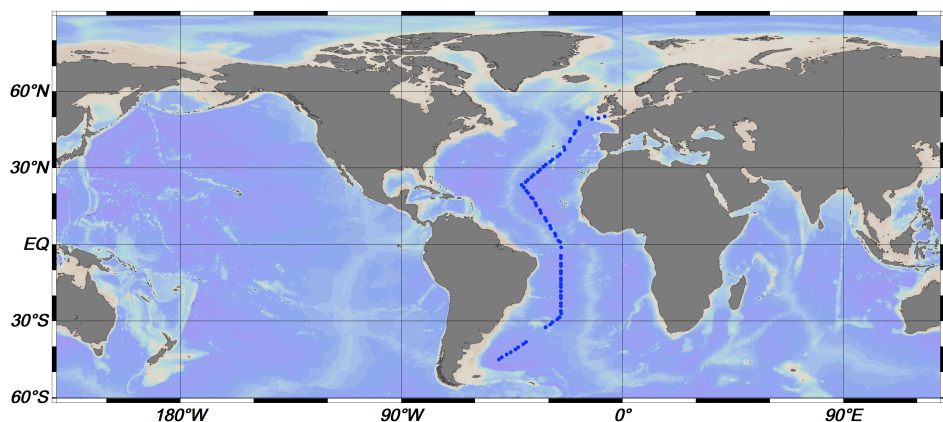
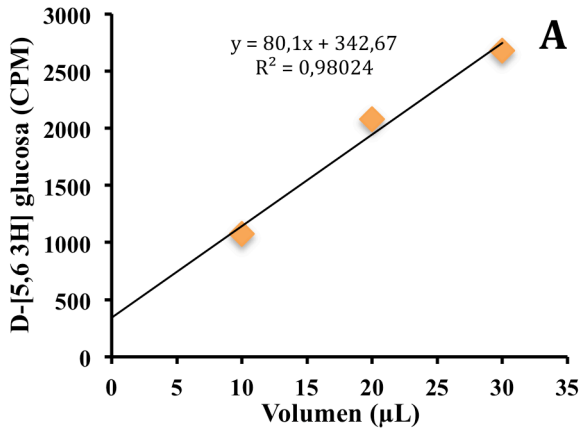


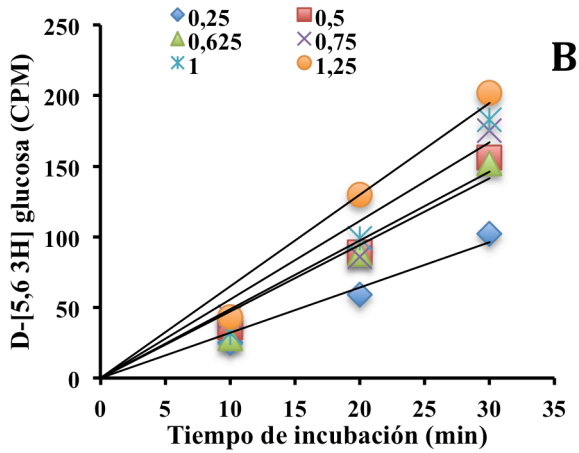
Figura 15. Mapa del trayecto durante la campaña

Los valores de radiactividad obtenidos en CPM se representaron frente al volumen (Figura 16A). A partir de la ecuación de la recta se calculó los CPM totales en los 1600 μL de muestra para esa concentración. Para el resto de concentraciones, dicho valor en CPM se multiplicó por el factor de la concentración en cada caso. Por ejemplo, si en 0,25 nM se midieron 55704,67 CPM en 0,5 nM habrá el doble.

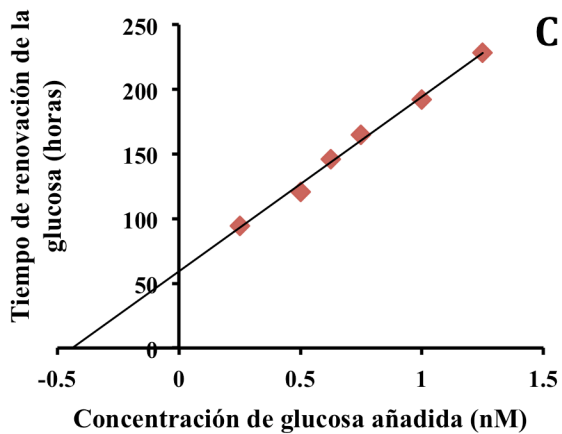
A continuación se filtraron todas las muestras en filtros de policarbonato de 0,2 μm (*Nuclepore, Whatman, Estados Unidos*) y se lavaron dichos filtros dos veces con 4 mL de agua desionizada (*Milli-Q system, Millipore, Reino Unido*). La radiactividad retenida en los filtros también fue medida en cuentas por minuto en tubos de 5 mL con 4 mL de cóctel de centelleo. Los valores de radiactividad obtenidos se representaron frente al tiempo (Figura 16B). El tiempo de renovación se define como el tiempo que tarda en renovarse la biomasa, es decir, es el tiempo requerido para asimilar todo el nutriente disponible en la muestra, en este caso la glucosa. Para calcular dicho tiempo de renovación se sustituyó la radiactividad total calculada para cada una de las concentraciones de la Figura 16A en las ecuaciones de las rectas de la Figura 16B. Los tiempos de renovación se representaron frente a la concentración de glucosa añadida y se extrapolaró la línea de regresión (Figura 16C). La pendiente de esta línea nos dio una estimación de la velocidad del transporte de glucosa a la concentración que hay en la muestra, la intersección de la recta con el eje de ordenadas nos dio una estimación del tiempo de renovación de la glucosa total, y la intersección de la recta con el eje de abscisa, la concentración de glucosa en la muestra.



A. Cálculo de la radiactividad total en cada concentración.



B. Cálculo de los tiempos de recambio.



C. Concentración de glucosa añadida (nM) frente a los tiempos de renovación

Figura 16. Estimación de la concentración de glucosa mediante bioensayos

I. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. Preparación de las muestras

Se utilizaron 10 L de un cultivo de *Prochlorococcus* sp. SS120, de los cuales 5 L se usaron para la condición control y 5 L para el experimento con glucosa. Se añadió glucosa de una solución de 20 mM esterilizada mediante autoclave y filtrada bajo la campana de flujo laminar para conseguir una concentración final de 0,1 μ M. Las células se recogieron a las 24 h mediante centrifugación. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de un tampón que contenía 25 mM de bicarbonato amónico y 1 mM de un cóctel de inhibidores de proteasas (*Sigma*) y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Las células se rompieron mediante prensa de French (apartado E.1 de Materiales y Métodos). Finalmente, las muestras se enviaron al laboratorio del Prof. Robert J. Beynon, del Institute of Integrative Biology de la Universidad de Liverpool para su posterior análisis por la Dra. Guadalupe Gómez Baena. Los siguientes pasos para la preparación de las muestras fueron realizados por la Dra. Guadalupe Gómez Baena.

2. Digestión de los extractos de proteínas con tripsina

Los extractos celulares (100 μ g de proteína) se incubaron con Rapigest (*Waters Corporation*) a una concentración final de 0,05 % (w/v) durante 10 minutos a 80 °C. A continuación las proteínas se redujeron con 3 mM dithiothreitol (DTT) durante 10 min a 60 °C, seguidos de alquilación con 9 mM de iodoacetamida durante 30 min a temperatura ambiente y mantenidos en oscuridad. Después de este tiempo, se añadió la solución de tripsina en un ratio de 50:1 y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Para detener la reacción proteolítica e inactivar y precipitar el detergente, se añadió TFA (concentración final 0,5 % (v/v)) y las muestras se incubaron durante 45 min a 37 °C. Finalmente las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 15 min para eliminar todo el material insoluble.

3. Análisis mediante los espectrómetros de masas: *Synapt G1 HDMS* (*Waters Corporation*) y *Synapt G2 HDMS* (*Waters Corporation*)

Todas las muestras fueron analizadas como péptidos tripticos, resueltos

mediante cromatografía líquida de alta resolución Waters nanoAcquity antes de ser analizados por el espectrómetro de masas, tanto en *Synapt G1* como en *G2*.

En ambos espectrómetros de masas se cargaron 500 ng de mezcla de péptidos y se sometieron a un gradiente lineal de 120 min de duración (tampón de inicio: 0,1% ácido fórmico en agua, tampón de elución: 0,1 % ácido fórmico en acetonitrilo). Como standard interno para la cuantificación absoluta se añadieron a las muestras 50 fmol de fosforilasa B de conejo (*Waters Corporation*). Para la evaluación del funcionamiento del espectrómetro de masas, previo al análisis de las muestras, se analizaban 500 ng de un extracto comercial de *E. coli* (*Waters Corporation*).

Los archivos adquiridos se procesaron usando el software *Protein Lynx Global Server* (PLGS) 1.3 (*Waters Corporation*).

Para la identificación de proteínas se utilizó una base de datos descargada de Uniprot conteniendo el proteoma de referencia para *Prochlorococcus marinus* SS120. Las búsquedas se realizaron usando el software PLGS (*Waters Corporation*) seleccionando los siguientes parámetros: oxidación de la metionina como modificación variable, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y permitiendo un error de digestión para la tripsina, una tolerancia de 1,2 Da en masa de los precursores y 0,5 Da para los fragmentos. Además las identificaciones se hicieron aplicando un p. value menor de 0,05. Se identificaron alrededor de 350 grupos de proteínas por muestra utilizando, los parámetros descritos anteriormente.

4. Cuantificación

Una vez analizados los experimentos (control vs glucosa), los datos de LC-MS/MS se procesaron usando Progenesis LC-MS (1.4, *Non linear dynamics*).

J. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

1.1. Plásmidos no construidos en este trabajo

Los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo, así como algunas de sus características se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Plásmidos no construidos en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia	Resistencia
pGEM-T	Vector de clonación para productos poliA de PCR	<i>Promega</i>	Ap ^R
pTRc99a	Vector de expresión con un promotor inducible lacL y dos terminadores: rrnB_T1_terminator (532-575 pb) y rrnB_T2_terminator (707-734 pb)	<i>Fermentas</i>	Ap ^R
pcA12	Derivado del pTZ57R conteniendo el gen de la Asparragininil-tRNA sintetasa más 400 pb aguas arriba y abajo. Inserto generado por PCR con los primers ASN-TRNA-AD-1F/1R a partir de DNA de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	(<i>Luque et al., 2008</i>)	Ap ^R
pRL161	Derivado de pBR322, utilizado para obtener la casete C.K1	(Elhai & Wolk, 1998)	Ap ^R , Km ^R
pcMN38	Plásmido obtenido clonando en pRL278 (XhoI-SacI) un fragmento de restricción (XhoI-SacI) procedente del pCMN36. Contiene una cassette C.K.3.	(Napolitano <i>et al.</i> , 2012)	Km ^R , Strep ^R , Spec ^R

1.2. Plásmidos construidos en este trabajo

Los plásmidos utilizados construidos en este trabajo, así como algunas de sus características se detallan en la tabla 18. La construcción de los plásmidos y las imágenes de los mismos se realizaron con la ayuda de los programas DNA Strider 1.4, Serial cloner 2-1 y XPlasMap.

Tabla 18. Plásmidos construidos en este trabajo

Plásmido	Descripción	Resistencia
pcMM-1	Plásmido pTRc99A que contiene el gen insertado <i>melB</i> en los sitios de restricción NcoI y HindIII. Inserto generado por PCR con los primers melB-1F y melB-1R a partir de DNAC de <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120	Ap ^R
pcMM-2	Fragmento de <i>melB</i> , <i>rrnB_T1_terminator</i> y <i>rrnB_T2_terminator</i> de pcMM-1 generado por PCR con los primers pcMM1-1F y pcMM1-1R fosforilados y clonado en pcA12 abierto mediante PCR inversa con los primers desfosforilados 7942_asnS_3F y 7942_asnS_3R, quedando el gen de la <i>Asparaginil-tRNA sintetasa</i> a ambos lados	Ap ^R
pcMM-3	Plásmido derivado del pcMM-2 con el fragmento CK3 que confiere resistencia a kanamicina. Dicho fragmento se generó a partir del pcMN38 digerido con Sall y EcoRV y se clonó en pcMM-2 en el sitio de restricción HpaI. El extremo cortado con Sall, se rellenó con Klenow.	Km ^R , Ap ^R
pcMM-4	Plásmido derivado del pcMM-2 con el fragmento CK1 que confiere resistencia a kanamicina. Dicho fragmento se generó a partir del pRL161 digerido con HincII y se clonó en pcMM-2 en el sitio de restricción HpaI	Km ^R , Ap ^R

1.3. Oligonucleótidos utilizados

Los cebadores se diseñaron con la ayuda de los programas *Oligo v4.05* (National Biosciences Inc., Plymouth), *AmplifX 1.5.4* y *Amplify 3X*, suministrados por *Invitrogen* y *Sigma-Aldrich*. Las tablas 19 a 22 recogen los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

1.3.1. Cebadores para estudiar la expresión mediante PCR en tiempo real en *Prochlorococcus* sp. SS120

La tabla 19 muestra los cebadores utilizados en este trabajo para el estudio de la expresión de genes que intervienen en la ruta del metabolismo del carbono en la estirpe SS120.

Tabla 19. Cebadores para estudiar la expresión en *Prochlorococcus* sp. SS120

Nombre	Secuencia (5'-3')
FG3PD	GGTAACGCAAGAAGAAGTCA
RG3PD	TGAGTTTTGTTGACCACCAT
FFBPA	ATAGGTGAAGAGGTTGGGAG
RFBPA	ATCAGAAGCAGCCAATACAG
RG1PA	TCGTTCCCTGACCTACTCCA
FG1PA	TTGCGTTTTAGGCGTTAGAA
RFRB	CCTTTCAGCATTGTCACGAT
FFRB	ATGGTGGTGTGTTGGAGAT
RPK	GGGTCCTGCTGTTTCTACT
FPK	TTCAATTGGTATGGGGTGTA
FSTA1	TATTTGGCTTTTCTCAGGC
RSTA1	GTCCTTCCCTGTTTCTGCT
FST4	GCTTTTATGGCAGGTTCTTT
RST4	CAAATAGCCGCAAGACTCAG
RSRS1	GTCTGCATGGAGCCACTT
FSRS1	CCTGGAGACATTTGGCTT
RSRL1	CCTGGCCTGTCTGTTGCT
FSRL1	TCGCCCTCTTGTTGGTTG
SRF	CTCTCGGTTGAGGAAAGTC
SRR	CCTTGCCTGTGCTCTATG

1.3.2. Cebadores para la clonación de *melB* en *Synechococcus elongatus* PCC 7942

La tabla 20 muestra los cebadores utilizados en este trabajo para la clonación del gen *melB* de *Prochlorococcus* SS120 en *Synechococcus elongatus* PCC7942.

Tabla 20. Cebadores para la clonación de *melB*

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función
melB-1F	GGAGGTCCATGGTTTCCTATGGAT	Amplificación de <i>melB</i> del DNAg de <i>Prochlorococcus</i> sp. SS120. MelB-1F contiene el sitio de restricción NcoI y melB-1R HindIII
melB-1R	TGCCAAGCTTTTAAAGCCAACGG	
pcMM1-1F	P-GTTAACAACAGCATATGCTTTCCTATGGATTAGGAG	Amplificación del fragmento <i>melB</i> + los terminadores rrnB_T1 + rrnB_T2 pcMM1-1F contiene sitios de restricción HpaI y NdeI y pcMM1-1R XhoI
pcMM1-1R	P-CATTCTCGAGGTTATTGTCTCATGAGCGG	
7942_asnS_3F	TTCGCGCTGAGAACTCCAATACC	PCR inversa de PC12
7942_asnS_3R	AAGTCGGGCCAAAGGTGTAGACG	
melB-2R	CATAACCATCTTCCATGATTGG	“Comprobación de los insertos por PCR”
7942_asnS_4F	GCGTTCAGCAACGTCTACACCTT	“Comprobación de los insertos por PCR”
7942_asnS_4R	TGACGGGAGGTATTGGAGTTCTC	“Comprobación de los insertos por PCR”
7942_asnS_5R	TTCGGATGGTTGTTATTGCAGTA	“Comprobación de los insertos por PCR”
CK3-3 (*)	GGTGCCTTAAACGCCTGGTG	“Comprobación de los insertos por PCR”
CK1-2 (*)	GGGATCTCATGCTGGAGT	“Comprobación de los insertos por PCR”

(*) Cebadores cedidos por el grupo de la Dra. Antonia Herrero del IBVF (Sevilla)

1.3.3. Cebadores para estudiar la expresión de *melB* mediante PCR en tiempo real en los transformantes C.K1 y C.K3

La tabla 21 muestra los cebadores utilizados para estudiar la expresión del gen *melB* clonado en *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Tabla 21. Cebadores para estudiar la expresión de *melB* en los transformantes

Nombre	Secuencia (5'-3')
FST4	GCTTTTATGGCAGGTTCTTT
RST4	CAAATAGCCGCAAGACTCAG
FSrnpb	TCCCAAAGACCAGACTTGCT
RSrnpb	GTATGTTTCTGTGGCACTCTCCT

1.3.4. Cebadores para estudiar la expresión de *melB* en muestras marinas

La tabla 22 muestra los cebadores utilizados para estudiar la expresión del gen *melB* en las muestras naturales recogidas durante la campaña oceanográfica AMT-21.

Tabla 22. Cebadores para estudiar la expresión de *melB* en muestras marinas

Nombre	Secuencia (5'-3')
FST4	GCTTTTATGGCAGGTTCTTT
RST4	CAAATAGCCGCAAGACTCAG
SRF	CTCTCGGTTGAGGAAAGTC
SRR	CCTTGCCTGTGCTCTATG
rnpRTfwd (*)	GGCAAGGGTGCAAAGGTG
rnpRTrev (*)	GCCGGGGTTTACCTAGCC

(*) Cebadores según (Holtzendorff et al., 2002)

2. Aislamiento de DNA genómico de *Prochlorococcus*

2.1. Volúmenes de cultivo pequeños

Para la purificación de DNA genómico de *Prochlorococcus* a partir de un volumen pequeño de cultivo, se utilizó el método previamente descrito (Cai & Wolk, 1990). El cultivo de 50 mL se centrifugó a 27.200 x g, a 4 °C, durante 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en 400 µL de tampón Tris-HCl 12,5 mM, pH 7,5, con EDTA 0,1 mM, y transferido a un tubo *eppendorf* de 1,5 mL con 150 µL de perlas de vidrio de 0,10–0,11 mm de diámetro, 20 µL de SDS al 10% (p/v), 225 µL de fenol, pH 6,6, y 225 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

La mezcla se sometió durante 4 veces seguidas a un proceso de 1 minuto de agitación fuerte, seguido de 1 minuto en hielo. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 23.700 x g, a 4 °C, y la fase superior fue transferida a otro tubo *eppendorf* de 1,5 mL; se añadió entonces 250 µL de fenol, pH 6,6 + 250 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó a 23.700 x g, 4 °C, durante 10 minutos. La fase acuosa superior fue transferida a un tubo *eppendorf* de 2 mL, completando con etanol absoluto.

El tubo *eppendorf* se mantuvo a –20 °C durante 2-3 h, al término de las cuales se centrifugó 30 minutos a 23.700 x g, a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar hasta la desaparición por evaporación de los restos que pudieran quedar de etanol.

Finalmente, se añadieron 50 µL de agua destilada y esterilizada, y se dejó el tubo *eppendorf* a 4 °C durante 24 h sin resuspender, para que el DNA genómico se disolviera en el agua por sí mismo. La solución de DNA genómico se conservó a 4 °C.

2.2. Volúmenes de cultivo grandes

Para la purificación de DNA genómico de *Prochlorococcus*, a partir de un volumen grande de cultivo, se utilizó el método descrito por Franche y Damerval (Franche & Damerval, 1988). El cultivo de 1 L se centrifugó a 30.100 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Seguidamente, el precipitado fue resuspendido en 0,5 mL de tampón SET (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 + EDTA 1 mM + sacarosa 25%) a 4 °C, y transferido a un tubo *Falcon* de 10 mL, donde se le añadió 2 mg de lisozima y 1/4 de su volumen de EDTA 0,5 M, pH 7,0, de forma que la concentración de este último compuesto en la mezcla fuera 100 mM.

Tras incubar el tubo 1 hora a 37 °C con agitación suave, se le añadió 0,5 mg de proteinasa K y SDS al 10% hasta alcanzar una concentración final de 2,5%. La mezcla

fue incubada 2 h a 45 °C, y entonces, transferida a un tubo *COREX II* de 15 mL donde se le realizó una extracción con fenol, pH 6,6, y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Al concluir la extracción, se le añadió 1 volumen de isopropanol que provocó la condensación del DNA genómico. El DNA se recogió y transfirió a 50 µL de TE, donde se mezcló con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol. Después de centrifugar 15 minutos a 23.678 x g y 4 °C, se lavó con etanol al 70% y volvió a centrifugarse. A continuación, se retiró el sobrenadante y se dejó secar hasta la evaporación de los restos que pudieran quedar de etanol. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100 µL de agua destilada y esterilizada, y se dejó a 4 °C durante 24 h sin resuspender, para que el DNA genómico se disolviera en el agua por sí mismo. La solución de DNA genómico fue conservada a 4 °C.

3. Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico se usó el protocolo previamente descrito (Ish-Horowicz & J.F, 1981, Birnboim & Doly, 1979) con algunas modificaciones. Tras incubar durante toda la noche la colonia en 3 mL de medio LB a 37 °C en agitación, se centrifugaron los 3 mL en *ependorf* de 1,5 mL en una microcentrífuga a 16.000 x g durante 30 segundos.

A continuación, se resuspendió el precipitado en 100 µL de solución 1 mantenida a 4 °C con ayuda de un agitador (tabla 23). Una vez resuspendido el precipitado, se añadieron 200 µL de la solución 2 (tabla 23) y se mezcló invirtiendo el *ependorf* 5 veces. Se añadieron 150 µL de la solución 3 mantenida en hielo (tabla 23) y se invirtió nuevamente durante 10 segundos apareciendo un lisado viscoso. Se mantuvo en hielo el *ependorf* durante 5 minutos y se centrifugó otros 5 minutos a 16.000 x g. Al precipitado se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo y se agitó mediante vortex. De nuevo se centrifugó durante 2 minutos y se eliminó la fase acuosa superior. Se añadió cloroformo para eliminar los restos de fenol existentes, se agitó en el vortex y de nuevo se centrifugó a 16.000 x g, 2 minutos. Para precipitar el DNA se añadió dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se agitó en el vortex y se dejó 2 minutos más a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante mediante una pipeta. Para lavar el precipitado de DNA una vez más se añadió 1 mL de etanol al 70 %, se invirtió varias veces y se eliminó de nuevo con la pipeta. Por último se dejó secar el DNA en la

campana de flujo y se resuspendió en 25 μ L de tampón TE (pH 8) y 0,5 μ L de RNasa 1 mg/mL y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Tabla 23. Componentes de la soluciones 1, 2 y 3

Solución 1	
Componente	Concentración final
Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
Esterilizada mediante autoclave y guardada a 4 °C	
Solución 2	
Componente	Concentración final
NaOH	0,2 N
SDS	1%
La solución 2 se prepara en el momento de añadirla	
Solución 3	
Componente	Volumen
Acetato potásico 5 M	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
H ₂ O	28,5 mL
La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. Esterilizada mediante autoclave y guardada a 4 °C	

4.

Aislamiento de RNA en cianobacterias

4.1. Extracción con fenol/cloroformo

El precipitado obtenido al centrifugar el cultivo, se resuspendió en 1 mL de 50 mM Tris pH 7,5-8 y 100 mM de EDTA y se transfirió a un *ependorf* de 2 mL. Se centrifugó 1 min y se eliminó el sobrenadante, congelando el precipitado en nitrógeno líquido. A continuación, se añadieron 300 μ L de un tampón de resuspensión (0,3 M de

sacarosa y 10 mM acetato sódico pH 4,5), 100 μ L de 250 mM Na₂EDTA pH 8, 400 μ L de tampón de lisis (2% SDS y 10 mM de acetato sódico pH 4,5) y 1 mL de fenol a 65 °C sometidos a fases de agitación mediante vortex e incubaciones de 2,5 min a 65 °C durante tres veces.

Finalmente se centrifugó a 25.931 x g durante 5 min y se hicieron extracciones de fenol, fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo centrifugando en cada fase durante 5 min a 25.931 x g. La fase acuosa de la superficie se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen de isopropanol, congelándose nuevamente en nitrógeno líquido y centrifugándose a 4 °C durante 30 min. Para acabar, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado en etanol al 70%.

A continuación se realizó un tratamiento con DNAsa de Ambión, añadiendo 44 μ L de H₂O DEPC (agua bidestilada en un aparato *Q-PODTM Milli-Q (Millipore)*, tratada con dietilpirocarbonato y posteriormente esterilizada para inactivar el DEPC), 5 μ L de tampón 10x y 1 μ L de DNAsa y se incubó a 37 °C durante 30 min. Se eliminó la DNAsa, añadiendo 5 μ L de *DNase Inactivation Reagent* como indica el fabricante. Finalmente se centrifugó y el sobrenadante se pasó a un *ependorf* nuevo, obteniendo el RNA puro libre de DNA.

4.2. Extracción con un *kit* comercial

Como método alternativo para el aislamiento de RNA total de *Prochlorococcus* se utilizó el *Aurum Total RNA Mini Kit* de *Bio-Rad*, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

4.3. Extracción en muestras marinas

Para la extracción de RNA de las muestras marinas se realizó una modificación del método descrito por Lindell and Post (Lindell & Post, 2001). Para ello, se incubaron 200 μ L de SDS 10% (concentración final 1%) junto con 18 U de proteínasa K (de *Tritirachium album*, SIGMA) en las muestras de agua de mar filtrada, a 60 °C durante 20 min. A continuación, se pasaron las muestras a tubos corex esterilizados y se añadió 1 mL de fenol. Se agitaron los tubos en un vortex y se centrifugaron durante 15 min a 15.344 x g. Tras dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico en una proporción de (25:24:1) y otra de cloroformo:isoamílico (24:1) (todas ellas con tiempos de centrifugación de 15 minutos

a 15.344 x g), se añadieron 2 mL de isopropanol al 70% y 800 µL de acetato amónico, pH 7,5, y se guardó a -20 °C durante toda la noche. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo durante 30 minutos a 15.344 x g, a 4 °C, lavadas con etanol al 70%, y finalmente resuspendidas en 17 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de tampón de DNAsa 10x (*Ambion*) y 2 µL DNAsa (4 U) y se incubó durante 30-40 min a 37 °C. Finalmente, se eliminó la DNAsa mediante 2 µL de *DNase Inactivation Reagent*. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó otros 5 min quedando el RNA libre de DNA en el sobrenadante.

5. Electroforesis de ácidos nucleicos

Las electroforesis de ácidos nucleicos se realizaron en geles de agarosa (con agarosa D-1 de baja EEO de *Pronadisa*) al 1% (p/v) o al 1,7% si se trataba de productos de PCR, todos ellos preparados en tampón TBE 1x (tabla 24) que incluían bromuro de etidio a una concentración de 0,8 µg/mL. La separación de las muestras se realizó en cubetas de 7x10 cm (*Mini-Sub Cell GT*) y 15x10 cm (*Wide Mini-Sub Cell GT*) de *Bio-Rad*, aplicando una diferencia de potencial constante de 100 V durante 30-60 minutos.

Las muestras de ácido nucleico se aplicaron tras añadirles tampón de carga 10x (tabla 24) en proporción 5:1, utilizando como marcadores de tamaño molecular los fragmentos resultantes de la digestión del DNA de un plásmido preparado y que contiene pUC, fago I, y secuencias de genoma de levadura. Tras electroforesis en gel al 1,7% de agarosa y tinción con bromuro de etidio, se observaron las siguientes bandas (en pares de bases): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100. Se cargaron 2 µL del marcador en cada pocillo. También se empleó el marcador “*1Kb DNA ladder*” de *GeneRuler* observándose los siguientes tamaños: 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 y 250 pares de bases. Se cargaron 6 µL del marcador en cada pocillo. La preparación de los distintos marcadores se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La determinación del número de pares de bases se realizó mediante la representación del logaritmo decimal del tamaño molecular de los fragmentos de DNA marcadores frente a la movilidad electroforética relativa de cada uno de ellos respecto al frente de electroforesis, obteniéndose así una recta patrón.

Tabla 24. Composición de las soluciones para la electroforesis en gel de agarosa

TBE 5x	Tris base 450 mM
	Ácido bórico 450 mM
	EDTA 10 mM, pH 8,0
Tampón de carga 10x	Ficoll (tipo 400) 17,5% (p/v)
	Azul de bromofenol y cianol xileno 0,12% (p/v)

6. Visualización de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se visualizaron con un transiluminador *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS +Imaging System* de *BIO RAD*, al irradiar los geles con luz ultravioleta de 302 nm. Las imágenes tomadas por el sistema *ChemiDoc* se analizaron con el programa informático *Quantity one® 1-D Analysis Software*, también de *BIO RAD*.

7. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de DNA incluidos en el interior de los geles de agarosa se empleó el *GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit* de *Amersham Biosciences/GE Healthcare*, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para su aplicación, se utilizaron indistintamente tres termocicladores diferentes: *GeneAmp PCR System 2400* de *Perkin Elmer*, *iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System* de *Bio-Rad* y *Mastercycler Personal* de *Eppendorf*; los gradientes de temperatura, sin embargo, se realizaron solamente en el aparato de *Bio-Rad*, el único equipado para tal efecto.

La composición estándar de la reacción, en un volumen final de 50 μ L, fue la siguiente: tampón de la *Taq* polimerasa 10x con $MgCl_2$, dNTPs 0,2 mM, 3 pmoles de cada cebador y 1 U de *Taq* polimerasa (*Biotoools*).

Como sustrato de la amplificación se utilizó tanto DNA genómico como células intactas de *Prochlorococcus* preparadas mediante centrifugación de 2 mL de cultivo, y posterior resuspensión en 30 μ L de agua destilada, de los cuales se

añadieron 1-2 μL a la mezcla de reacción y se sometió al programa de amplificación descrito en la tabla 25.

El tamaño y número de las bandas amplificadas se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa, tal y como se describe en el apartado J.6.

La polimerasa *iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio Rad)* incrementó la fidelidad de la reacción de PCR disminuyendo la incorporación de nucleótidos erróneos cuando se amplificó el fragmento de *melB* de *Prochlorococcus* sp. SS120 para clonarlo en pTRc99A. También se usó la *iProof* en la PCR inversa para clonar regiones desconocidas de DNA adyacentes a secuencias conocidas.

Tabla 25. Protocolo común de amplificación utilizado en la PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	Temperatura según cebador diseñado	30 s	50
Elongación	72 °C	30 s -1,5 min (según tamaño del amplicón)	1
Elongación final	72 °C	5 min	

9. Purificación de productos de PCR

Para la purificación de productos de PCR se empleó el *GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit* de *Amersham Biosciences/GE Healthcare* con la mezcla de reacción, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

10. Transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) en tiempo real

10.1. Transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó empleando el *iScript cDNA Synthesis Kit* de *Quanta*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis del DNAc se añadió 0,4 μg de RNA total de *Prochlorococcus* a un tubo de 0,2 mL con 4 μL de la mezcla de reacción 5x, que incluía el tampón de la enzima, dNTPs y cebadores de unión aleatoria, 1 μL de transcriptasa inversa (concentración no indicada), y el volumen

necesario de agua libre de nucleasas (proporcionada también por el fabricante) hasta completar los 20 μL finales. Se realizó un control negativo con el DNAc y sin la enzima retrotranscriptasa para comprobar que no amplificaba en la PCR semicuantitativa en tiempo real. Este control nos confirmaba que la expresión detectada en la PCR provenía del DNA copia y no de DNA genómico que no se hubiera eliminado con el tratamiento de DNasa, durante la extracción de RNA (apartado J.4).

La síntesis se realizó en un termociclador de acuerdo con el siguiente protocolo: 5 minutos a 25 °C; 30 minutos a 42 °C; 5 minutos a 85 °C.

10.2. PCR semicuantitativa en tiempo real

10.2.1. Preparación de la PCR en tiempo real

Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos (*Bio-Rad* y *Axygen Scientific*), empleando un termociclador *iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System* de *Bio-Rad*. Al preparar las mezclas de PCR, se utilizó como sustrato el DNAc previamente sintetizado, permitiendo así la comparación entre los diferentes niveles de expresión de los genes en estudio respecto a *rnpB*, el gen de referencia. Por otra parte, se incluyeron en cada placa mezclas de reacción que recibieron agua destilada o células intactas de *Prochlorococcus* en lugar de DNAc, utilizando los mismos reactivos y condiciones de PCR que las muestras problema; estos controles permitieron verificar el correcto desarrollo de la amplificación.

Las mezclas de reacción, con un volumen final de 10 μL , tenían la composición descrita en la tabla 26.

La cantidad de cebadores añadida a la mezcla de reacción dependió de los valores de eficiencia de amplificación obtenidos para cada una de las parejas.

Una vez cargados los pocillos, evitando la aparición de burbujas que pudieran impedir la correcta detección de la fluorescencia, se cubrió la placa con una lámina transparente y adhesiva de plástico (*Bio Rad*).

Tabla 26. Composición de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real

Componentes	Volumen (μL)
<i>SsoFastTM Evagreen[®] Supermix</i> (Bio Rad)	5
Cebador <i>forward</i> (3 pmoles/ μL)	0,5-1,5
Cebador <i>reverse</i> (3 pmoles/ μL)	0,5-1,5
Agua destilada y esterilizada	1,5-3,5
DNAc /agua destilada/células intactas de <i>Prochlorococcus</i> (*)	0,5

(*) Según se tratara de una mezcla problema o control (negativo o positivo)

El protocolo de PCR fue común para todas las parejas de cebadores, diseñadas para unirse al DNAc a una misma temperatura de hibridación (tabla 27).

Tabla 27. Protocolo de amplificación utilizado en la PCR en tiempo real

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	
Hibridación	58 °C	30 s	50
Elongación	72 °C	30 s	

El protocolo de PCR fue seguido por un aumento progresivo de la temperatura desde 65 hasta 95 °C, con un incremento de 0,5 °C cada 10 segundos; este paso adicional proporcionó una curva de fusión para cada una de las muestras, que permitía detectar la presencia de productos de amplificación indeseados en la mezcla de reacción.

10.2.2. Análisis de los datos de expresión

Tras concluir la PCR en tiempo real se obtuvo una curva sigmoideal, para cada una de las mezclas de reacción, que representaba el incremento de la fluorescencia en la muestra conforme crecía exponencialmente el número de productos de amplificación.

De esta forma, a cada una de las curvas obtenidas le correspondió un ciclo umbral (Ct), definido como el ciclo a partir del cual la fluorescencia resulta estadísticamente significativa respecto al ruido de fondo.

Los valores de Ct para cada una de las mezclas de reacción vinieron dados automáticamente por el programa *iCycler iQ v3.0* de *Bio-Rad*, a partir de la intersección de las curvas de amplificación con una línea base.

Los valores de Ct obtenidos para cada uno de los genes problema fueron normalizados posteriormente con los del gen de referencia, *rnpB*, y a continuación con los valores de Ct correspondientes a la condición experimental control.

El incremento de la expresión para un determinado gen, en una determinada condición experimental, se obtuvo aplicando la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$\text{Incremento de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{donde } \Delta\Delta Ct = (\text{Ct gen problema} - \text{Ct gen de referencia})_{\text{condición problema}} - \\ - (\text{Ct gen problema} - \text{Ct gen de referencia})_{\text{condición control}}$$

11. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

Para la digestión de los plásmidos se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante en lo referente al tampón, temperatura y cantidad de enzima. De forma general, las mezclas de digestión se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Todas las digestiones se comprobaron mediante geles de agarosa al 1% (p/v). El programa *Serial Cloner 2.1* ayudó en la observación previa de los plásmidos digeridos y del tamaño de los fragmentos obtenidos con cada digestión.

12. Clonación de fragmentos de DNA

12.1. Desfosforilación del vector

Los vectores pTRc99A y pcA12 digeridos con una o dos enzimas de restricción, fueron desfosforilados para disminuir su frecuencia de religación. Para ello, se trataron con fosfatasa alcalina de camarón ártico SAP (*Roche*), preparando la siguiente mezcla de reacción: tampón de la enzima 10x, 3U de SAP y 0,2-0,4 pmoles de vector, todo ello incubado durante 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se añadieron otras 3U de SAP y se incubó otros 30 minutos a 37 °C y a 65 °C durante 20 minutos.

12.2. Fragmento *Klenow*

El fragmento *Klenow* es un fragmento perteneciente a la enzima DNA polimerasa I, procedente de *E. coli* (*Promega*) que mantiene la actividad polimerasa 5'→3' y la actividad exonucleasa 3'→5' para eliminar nucleótidos previos a la secuencia codificante y por tanto dejando el extremo romo. Se rellenó con *Klenow* el extremo del fragmento CK3 cortado con Sall del plásmido pcMN38, dejando de esta forma el extremo romo y preparado para ligarse con el otro extremo romo de pcMM-2 que originó la enzima de restricción HpaI. El tratamiento se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante.

12.3. Ligación del DNA

Para la ligación de productos de PCR con los vectores pTRc99A y pcA12 o bien fragmentos digeridos de plásmidos (CK1 y CK3) con el vector pcMM-2 se utilizó una DNA ligasa del fago T4 (*Dominion MLB*). Con un volumen final de 10-15 µL, la mezcla de ligación estaba compuesta por el tampón de la enzima 10x, 4 U de DNA ligasa T4 y las cantidades apropiadas de vector e inserto, manteniendo una relación de moles entre ambos de 1:3 siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vector} \times (\text{longitud inserto} / \text{longitud vector}) \times 3$$

En cualquiera de los dos casos, la mezcla de ligación permaneció en un baño termostático durante toda la noche, a una temperatura de 22 °C. En todas las ligaciones se realizó un control negativo sin el inserto, de tal forma que nos daba una idea del porcentaje de colonias con el vector religado entre sí o de posibles contaminaciones.

12.4. Transformación de células de *Escherichia coli*

12.4.1. Preparación de células competentes

Tras inocular 50 mL de medio LB con una colonia aislada de *Escherichia coli* BL21 que había crecido sobre una placa de LB agar durante toda la noche a 37 °C, se colocó el cultivo en un incubador rotatorio a 37 °C, con una agitación de 250 r.p.m., hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 600 nm situado entre 0,4 y 0,5. Seguidamente, se centrifugó a 2.500 x g durante 15 minutos, a 4 °C, y el precipitado

fue resuspendido con suavidad en 5 mL de TSS, una solución de conservación preparada de la siguiente forma: 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl, 10 g de polietilenglicol 4000, 5 mL de DMSO y 5 mL de MgCl₂ 1 M, en 100 mL de agua destilada, ajustando posteriormente su pH a 6,5, y esterilizando por filtración.

Las células así tratadas se emplearon en el proceso de transformación durante las siguientes 2-3 h, o bien fueron repartidas en alícuotas de 500 µL con un 15% de glicerol, y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Estas alícuotas se conservaron a -80 °C para su uso posterior (Sambrook & Russell, 2001a).

Las células competentes de la estirpe DH5 α de *E. coli* fueron suministradas por el Servicio Técnico de Cultivos Biológicos del Instituto de Biquímica Vegetal y Fotosíntesis, donde se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1983) como se describe en el apartado de estirpes de *E. coli*.

12.4.2. Transformación por choque térmico

El protocolo seguido para la introducción de los plásmidos en las células competentes se basó en una transformación por choque térmico.

Para ello, se añadió el volumen de la ligación (10-15 µL) a una alícuota de 100 µL de *E. coli* DH5 α (descongelada en hielo) y se dejó en hielo durante 30 minutos. Se incubó la mezcla 1,5 minutos a 42 °C y otros 5 minutos en hielo. A continuación se añadió 1 mL de SOC o LB (durante la estancia en el IBVF) y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación.

Tras la incubación se sembró en una placa de LB con el antibiótico determinado en cada caso 100 µL de la mezcla y en otra placa el volumen resultante de centrifugar la mezcla, obteniendo dos placas con distinta concentración de transformantes cada una. Se realizó la misma operación al control interno. El resultado de la transformación pudo observarse tras incubar las cajas de *Petri* toda una noche a 37 °C.

12.5. Transformación de células de *Synechococcus elongatus* PCC 7942

Se recogieron los cultivos en tubos de centrifuga de 25 mL estériles a 9.820 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con medio BG11 agitando el precipitado en el vortex antes de lavar, para eliminar posibles nucleasas

extracelulares. El precipitado se resuspendió en un volumen de medio BG11 hasta una concentración final de 20-100 μg clorofila/mL que equivale a $1-2 \cdot 10^9$ células/mL. Dicho cultivo se separó en alícuotas de 100 μL en *ependorf* de 1,5 mL y se añadió a cada uno un volumen de DNA que fue como máximo 1/10 del de la suspensión a una concentración final de 200-300 ng de DNA plasmídico (pcMM3 y pcMM4).

Las mezclas de transformación se incubaron durante 5 h a temperatura ambiente y a continuación se sembraron en placas de medio BG11 sólido sobre un filtro *Millipore* de 0,45 μm de tamaño de poro. Para ello, se añadieron justo antes de sembrar 200 μL de BG11 para que tuviera más volumen y se repartieran mejor los transformantes sobre el filtro. Estos filtros se usaron sin antibiótico para que crecieran todos los transformantes posibles en la placa. Las placas se incubaron durante dos días en una cámara termostatazada a 30 °C sin luz. Tras 48 h cambiamos el filtro a placas con BG11 más kanamicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron en condiciones normales de iluminación. Las colonias resistentes a antibiótico aparecían a las 2-4 semanas de incubación procediéndose entonces a su análisis fenotípico y genotípico.

Paralelamente, se puso como control negativo una mezcla de transformación sin DNA incubada en los mismos medios sólidos y condiciones que las transformaciones.

12.6. Secuenciación de DNA

Las secuenciaciones de fragmentos de DNA requeridas durante el desarrollo de este trabajo se realizaron por *SECUGEN* (Madrid) y los Servicios Centralizados de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Las muestras de DNA se proporcionaron disueltas en agua destilada: 10–30 ng según los pares de bases del fragmento amplificado si se trataba de un producto de PCR; 100 ng/ μL en caso de ser un plásmido. En ambos casos, con un volumen final de 15 μL , conteniendo 1 μL del cebador 5 μM y así para cada uno de los cebadores que se utilizaron para la secuenciación.

12.7. Estudios filogenéticos

12.7.1. Con secuencias de todas las cianobacterias

Para la elaboración de este árbol filogenético se buscó la secuencia proteica de Pro1404 en la la base de datos CYORF y se realizó una búsqueda utilizando el

algoritmo *blastp* frente a todas las secuencias disponibles de cianobacterias usando el portal NCBI (Altschul *et al.*, 1997).

A continuación se realizó un alineamiento múltiple con todas las homologías.

Con las 100 secuencias obtenidas con mejor score, se realizó un árbol filogenético en este mismo portal usando el método basado en distancia Neighbor-Joining.

12.7.2. Con secuencias del proyecto *Global Ocean Sampling*

Para la elaboración de este árbol filogenético se buscó la secuencia proteica de Pro1404 entre las de la base de datos GOS (*Global Ocean Sampling*) usando el algoritmo *blastp* del NCBI en el portal Camera (*Community Cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research & Analysis*) donde están todas las secuencias disponibles (<http://camera.calit2.net/index.shtm>).

El proyecto GOS realizado por el Dr. Venter y su equipo ha proporcionado la base de datos de metagenómica de dominio público con más secuencias (7,7 millones). Las muestras se recogieron entre el 8 de Agosto del 2003 y Enero del 2006 por los Océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Figura 17).

Por otra parte se realizó una búsqueda con el algoritmo *blastp* de la proteína Pro1404 frente a todas las estirpes de *Prochlorococcus* y *Synechococcus*.

Pro1404 posee 452 aminoácidos. Las secuencias GOS encontradas con un alineamiento mayor de 339 pb (> 75% de la secuencia) se alinearon a su vez con las secuencias con máximo Score de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* mediante un alineamiento múltiple con el programa *SeaView* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>).

El árbol filogenético se realizó con este mismo programa usando el método basado en distancia Neighbor-Joining.



Figura 17. Localizaciones de las muestras recogidas durante el proyecto GOS

K. APARATOS E INSTRUMENTOS

1. Incubación de cultivos

El crecimiento de los cultivos de *Prochlorococcus* se realizó en una cámara de cultivo de gran volumen, que mantuvo las condiciones indicadas en el apartado B.1.2.

Para el crecimiento con agitación de cultivos líquidos de *Escherichia coli*, se utilizaron dos incubadores rotatorios *Infors AG*, modelos *Aerotron* y *Unitron*.

El crecimiento sobre medio sólido, sin agitación, se llevó a cabo en una estufa *Selecta Incubat 80-L*.

2. Condiciones de esterilidad

Los medios de cultivo, el material utilizado para la manipulación de ácidos nucleicos, las soluciones que así lo requirieron y todo el material que estuviese en contacto con los cultivos, fueron esterilizados en un autoclave *Selecta* modelo *Presoclave 75*.

Cuando fue necesario trabajar en condiciones de esterilidad se emplearon dos cámaras de flujo laminar: *Telstar AV-100* y *Telstar BIO-II-A*.

3. Centrífugas y rotores

Las centrifugaciones se realizaron en los siguientes aparatos:

- Volúmenes inferiores a 2 mL: en microfugas *Eppendorf*, modelos *5415D* y *5415R*, y en centrífuga *Beckman Avanti J-25* equipada con un rotor *JA-18.1*.
- Volúmenes entre 2 y 10 mL: en centrífuga de mesa *Mixtasel* de *Selecta*.
- Volúmenes superiores a 10 mL: en centrífuga *Beckman Avanti J-25* equipada con los rotores *JA-20*, *JA-14* y *JLA-10.500*.

4. Determinaciones espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro *Beckman DU-640*, con capacidad para seis cubetas, acoplado a un baño termostatzado *Haake* modelo *DCI-V* que permitió controlar la temperatura de las muestras cuando fue necesario.

Las determinaciones a longitudes de onda inferiores a 340 nm se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo; por encima de este valor, se utilizaron cubetas de plástico o vidrio.

Para medir la concentración de los ácidos nucleicos se usó un espectrofotómetro *NanoDrop “ND-1000 Spectrophotometer”* (*NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA*).

5. Determinación de pH

Las medidas de pH de las distintas soluciones y tampones utilizados se realizaron con un pHmetro *CRISON* modelo *MicropH2001*, equipado con un electrodo suministrado por esta misma casa comercial.

6. Pesadas

Se realizaron en una balanza *METTLER PB303 DeltaRange*, y en una balanza analítica (sensibilidad de 0,1 mg) *Sartorius BP1215*.

7. Agitación de soluciones

Las soluciones que necesitaron una agitación fuerte se homogeneizaron en agitadores *Heidolph* modelo *Reax Top*.

Para la disolución de reactivos en medios líquidos se empleó un agitador magnético *Selecta Asincro*; y cuando fue necesario el calentamiento simultáneo de la

solución se utilizó un agitador *Selecta Agimatic-N*, equipado con una placa calefactora de temperatura regulable.

8. Destilación de agua

El agua destilada se obtuvo con un aparato *Elix 3* de *Millipore* acoplado a un depósito de 30 L. Para la obtención de agua ultrapura se utilizó un aparato *Millipore Milli-Q*.

9. Termostatación

La termostatación de las muestras se llevó a cabo en baños *Selecta*, modelo *Unitronic 320 OR* y *Univeba*, el primero de los cuales permitió además la agitación de las muestras. Cuando fue requerida una temperatura más precisa y estable, se utilizó un baño *Haake* modelo *DC1-V*.

Las incubaciones a 30 °C se realizaron en una estufa *Selecta* modelo *205*; las incubaciones a 37 °C, en una estufa *Selecta Incubat 80-L*.

10. Refrigeración

Las muestras que así lo requirieron (reactivos, soluciones de nucleótidos o DNA, enzimas y otros compuestos) se conservaron a -20 °C en congeladores de compañías comerciales estándar. Las soluciones de RNA, células y extractos de *Prochlorococcus*, *Escherichia coli* e hígado de rata se conservaron a -80 °C en un congelador *REVCO*. Los tampones y demás soluciones se guardaron en frigorífico o en cámara fría a 4 °C.

El hielo en escamas utilizado para la conservación de las muestras a 4 °C mientras éstas se encontraban fuera de los dispositivos refrigeradores indicados, se obtuvo mediante un aparato *ITV* modelo *IQ 135*.

11. Fuentes de alimentación

Habitualmente, se emplearon dos fuentes de alimentación de *Bio-Rad*, modelos *250/2.5* y *PowerPac Basic*.

RESULTS AND DISCUSSION

1. STUDY AND CHARACTERIZATION OF THE MECHANISM OF GLUCOSE UPTAKE

1.1. Construction of recombinant *Synechococcus* sp. PCC 7942 strains

The Pro1404 gene (*melB*) is currently annotated as a putative melibiose/sodium symporter in the genome of *Prochlorococcus marinus* strain SS120. Previous studies in our group demonstrated a clear increase in the expression of this gene upon glucose addition (Gómez-Baena et al., 2008). Furthermore, this gene is present in all strains of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* that have been sequenced like a putative GPH family sugar transporter (Kettler et al., 2007, Chisholm et al., 1988, Dufresne et al., 2003, Coleman et al., 2006, Palenik et al., 2003, Dufresne et al., 2008).

So the main objective of my thesis was to determine the mechanism of glucose uptake by *Prochlorococcus* looking for the possible involvement of the Pro1404 gene. To investigate the putative role of the Pro1404 (*melB*) gene in the uptake of glucose by *Prochlorococcus*, we chose to express this gene ectopically in a cyanobacterium naturally incapable of glucose transport, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Two constructions were made where the promoterless Pro1404 gene was placed downstream of kanamycin resistance cassettes C.K1 or C.K3, respectively. In these constructions, expression of Pro1404 is driven by the promoters of the C.K1 or C.K3 cassettes that show different activity in cyanobacteria, C.K1 (moderate) and C.K3 (strong) (Paz-Yepes et al., 2009).

The Pro1404 gene from *P. marinus* SS120 was amplified by PCR using genomic DNA as a template and primers MELB-1F and MELB-1R. The amplified fragment was cloned between the NcoI and HindIII sites of the pTRc99A (*Fermentas*) plasmid vector generating plasmid pcMM1. This molecule was used as a template for subsequent PCR amplification with phosphorylated primers PcMM1-1F and PcMM1-1R to generate a PCR fragment, including the *melB* gene and the downstream *rrnB* transcriptional terminator from pTRc99A, which was ligated with pCA12 plasmid linearized by PCR with divergent primers 7942_AsnS_3F and 7942_AsnS_3R. The resulting plasmid, pcMM2, contained the *melB* gene from *Prochlorococcus* with a downstream *rrnB* terminator interrupting the *Synechococcus* sp. PCC 7942 *asnS* ORF, which has been shown to be dispensable for this organism (Luque et al., 2008). Kanamycin-resistance cassettes C.K1 and C.K3 were cloned in the same orientation as the *melB* gene upstream of the HpaI site in pcMM2, generating plasmids pcMM3 and pcMM4, respectively. The construction of plasmids is outlined in Figure 18.

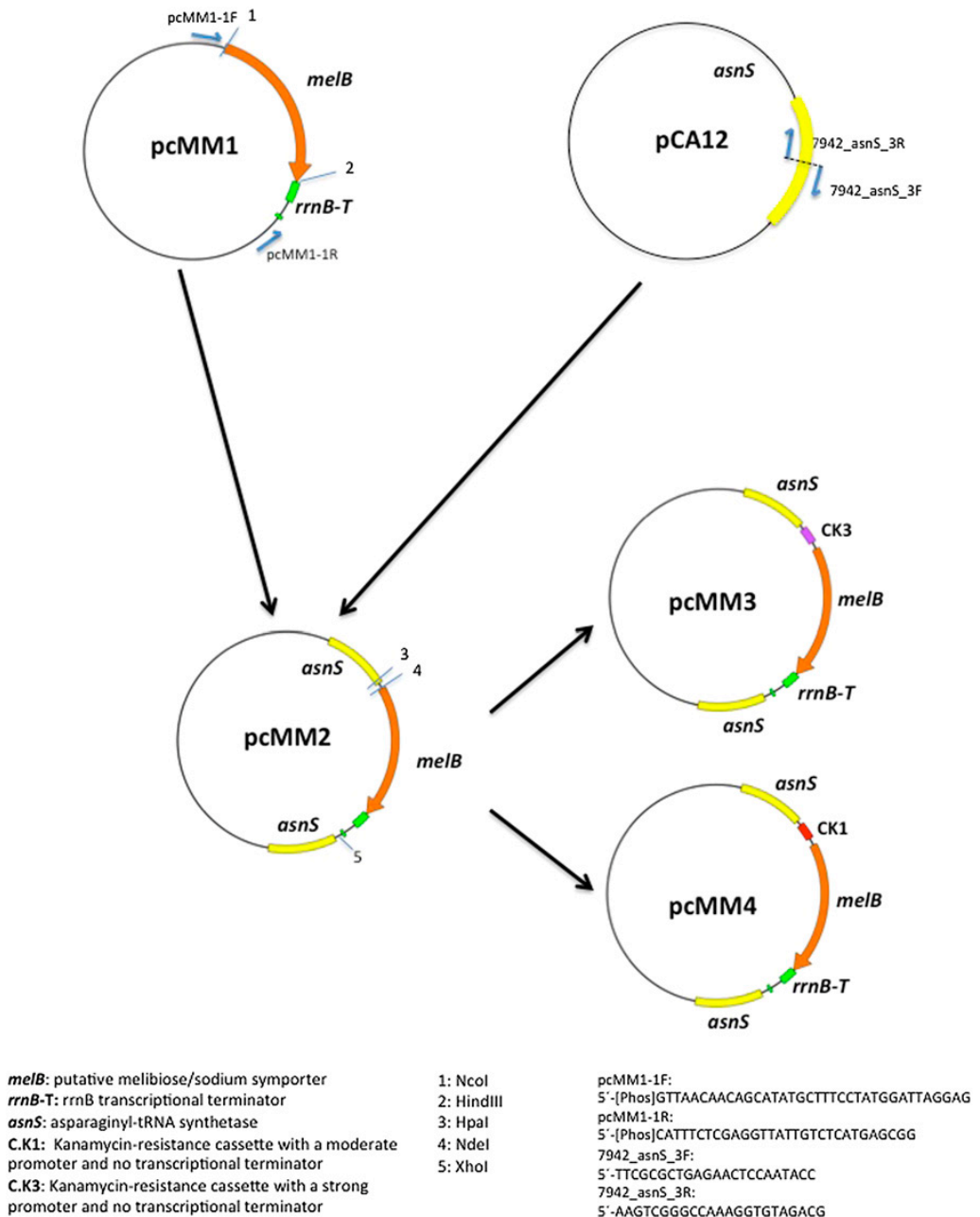


Figure 18. Outline of the strategy used to construct the recombinant *Synechococcus elongatus* strains used in this work.

Plasmids pcMM3 and pcMM4, which do not replicate in cyanobacteria, were introduced by transformation in *S. elongatus* sp. PCC 7942. Kanamycin resistant transformants were selected where the C.K1::Pro1404 and C.K3::Pro1404 constructs were introduced by recombination in the *S. elongatus* chromosome splitting the dispensable *asnS* locus (coding for asparaginyl-tRNA synthetase).

The genomic structure of the recombinants was analysed by PCR and sequenced. In order to analyse it, specific primers for each gene and cassette were designed (Figure 19). With the forward AsnS-4F primer and the reverse AsnS-5R primer we could verify that all the constructions had the Pro1404 transporter and the cassette. A fragment of 2.6 Kb was observed in the case of the constructions with C.K1 and an amplified fragment of 2.4 Kb in the constructions with the cassette C.K3. The size of the fragments corresponded to the size of each cassette (C.K1 = 1.3 Kb and C.K3 = 1.1 Kb) (Figure 19.a).

To check the constructions with the cassettes C.K1 and C.K3, we used the primer ck1-2 (present in both cassettes) with the reverse melB-2R primer, in the recombinant strains (C.K1-1, C.K1-2, C.K3-5, C.K3-1) and in the negative control (*S. elongatus* PCC 7942). All the constructions were amplified except the negative control; consequently all the constructions of C.K1 and C.K3 had a cassette.

To test the constructions with the cassette C.K3 we used the forward ck3-3 (present only in the cassette C.K3) with the reverse melB-2R primer in the recombinant strains and in the negative control. We only had a fragment amplified in the constructions with the cassette C.K3 as expected (Figure 19.b).

Finally, to check the whole construction we used the primers AsnS-4F with the reverse AsnS-4R (Figure 19.c). We could observe that all the constructions had the correct order.

Apart from these tests by PCR, all the plasmids were sequenced and each sequence carefully analysed.

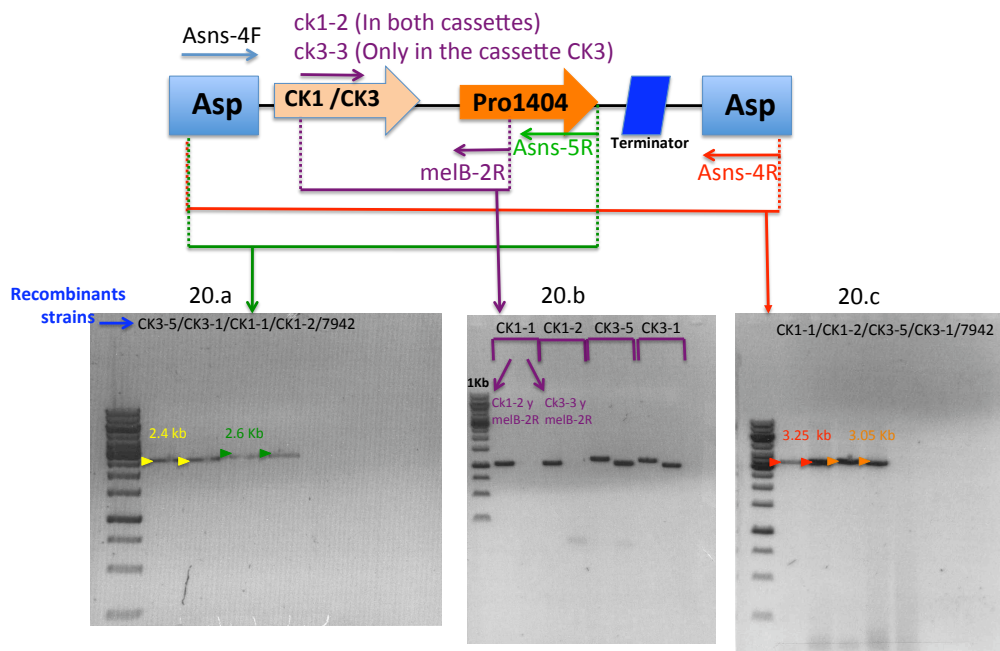


Figure 19. Genomic structure of the recombinant strains analysed by PCR. 19.a. PCR to analyse that all the constructions had the Pro1404 transporter and the cassette with the primers AsnS-4F and AsnS-5R. **19.b.** PCR to test the constructions with the cassette C.K1 and C.K3 with the primers ck1-2, ck3-3 and melB-2R. **19.c.** PCR to check the whole construction with the primers AsnS-4F and AsnS-4R.

2.3 ¹⁴C-Glucose uptake in recombinant strains of *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942

Two recombinant strains C.K1-1 and C.K3-1, commonly named C.K1 and C.K3, were grown and used to study the uptake of $1 \mu\text{M}$ ¹⁴C-glucose. *Synechocystis* sp. PCC 6803 was used as positive control, whereas a *S. elongatus* recombinant strain with a cassette insertion in the *asnS* gene (AsnS-1) was used as a negative control. *P. marinus* SS120 was also used as a reference. The results are shown in Figure 20.

The ectopic expression of Pro1404 in *S. elongatus* conferred the capability for glucose uptake to the derived recombinant strains C.K1 and C.K3. Therefore, Pro1404 encodes a glucose transporter in *P. marinus* SS120 and we can infer that this gene probably has the same function in the rest of *Prochlorococcus* and marine *Synechococcus* strains that have been sequenced. Unexpectedly, both recombinant strains exhibited similar glucose transport rates, suggesting that the expression level in

the C.K1 strain was sufficient to populate the plasma membrane of the host cell with saturating amounts of the transporter.

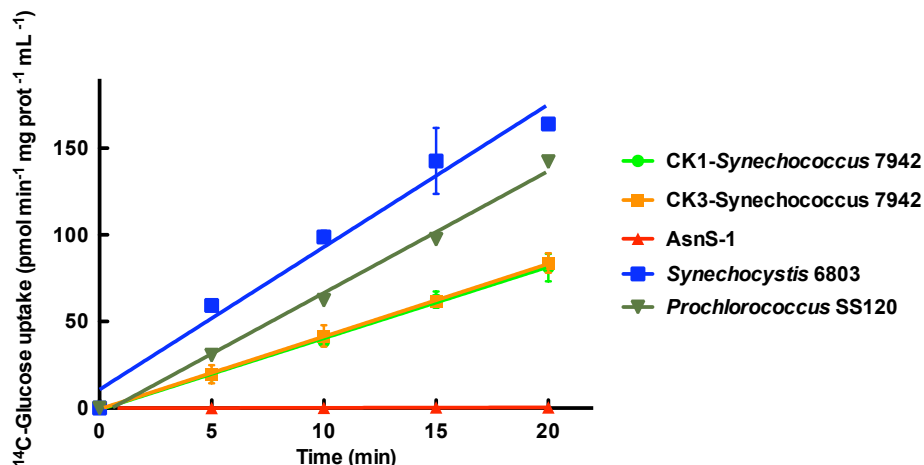


Figure 20. ^{14}C -Glucose uptake in recombinant strains of *S. elongatus* sp. PCC 7942 expressing the gene Pro1404 from *P. marinus* SS120. *Synechocystis* sp. PCC 6803 was used as positive control, AsnS-1 like negative control and *Prochlorococcus* sp. SS120 like reference. Bars show SD for each sample.

We could observe a clear glucose uptake in *Synechocystis* sp. 6803 used as positive control (Figure 20) and the absence of uptake in the negative control (AsnS-1). Moreover, we saw the expected glucose uptake in *Prochlorococcus* sp. SS120, as previously shown (Gómez-Baena et al., 2008).

1.2.1. Pro1404 expression in recombinant strains

Both recombinant strains exhibited similar glucose transport rates (Figure 20), therefore we wanted to measure the Pro1404 expression in C.K1 and in C.K3 to test if the transporter expression was similar in the two strains.

We measured the expression by real time qRT-PCR with the primers FST4 and RST4 amplifying a DNA fragment of 164 pb (Figure 21A) and by final time RT-PCR with the primers FmelB and RmelB amplifying a DNA fragment of 1,796 pb (Figure 21B) We used as negative control the cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942, strain incapable of glucose uptake. Two cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120 were used as positive control.

During the study of the transporter we had some problems in the maintenance

of the different strains. In the period of several months, the strains lost the capability of glucose uptake despite the fact that they kept the Pro1404 gene in the construction. Therefore, we measured too the Pro1404 expression in the strains C.K1 and C.K3 that had lost the glucose uptake capability, to prove if these strains were still expressing Pro1404, or if its expression had been also lost.

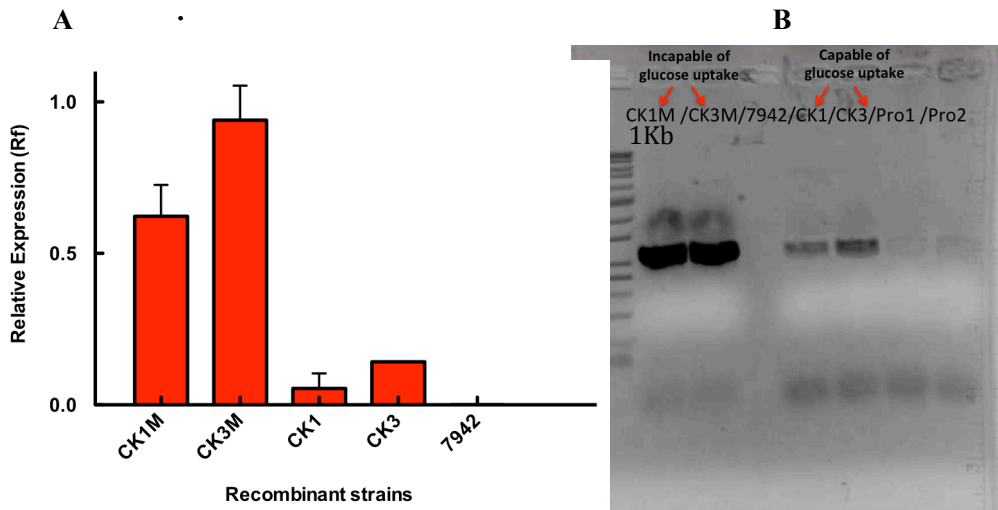


Figure 21. RT-PCR of the recombinant strains. A, Real time qRT-PCR of the recombinant strains. The strains C.K1-1 and C.K3-1 are incapable strains of glucose uptake and C.K1 and C.K3 capable strains of glucose uptake. Bars show SD for each sample. B, Final time RT-PCR of the recombinant strains. As negative control we used *S. elongatus* PCC7942 and as positive control and reference two strains of *P. marinus* SS120 (Pro1 and Pro2). 400 ng of DNAc were loaded into a gel of agarose 1%.

The strains without the ability of glucose uptake were called C.K1M and C.K3M. Unexpectedly, we could observe a higher expression in the recombinant strains with the incapability to glucose uptake than in the recombinant strains with capability of glucose uptake. We propose that the expression level in these strains was too high and the membrane was saturated with transporters.

Moreover, all the recombinant strains with the cassette of high activity (C.K3) had a higher expression than those with the cassette of moderate activity (C.K1). The two cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120 showed a low expression, consistent with the presence of the gene under normal regulation.

1.3. Recombinant strain C.K1

1.3.1. Glucose uptake kinetics

Kinetic properties of glucose uptake were studied in the recombinant *S. elongatus* C.K1 strain and we observed multiphasic kinetic behaviour, showing a high affinity K_s constant in the nanomolar range (123.4 nM), in good agreement with the low glucose concentrations estimated in the oligotrophic Atlantic Ocean (Results and Discussion part 3.1).

An interesting aspect of our results is the fact that a single gene product shows multiphasic uptake kinetic, although the third phase could not be fully characterized due to the elevated concentrations of glucose required to reach saturation (Figure 22A).

The two phases showed Michaelis–Menten kinetics with K_s affinity constants of 123.4 nM and 0.9 μ M. These two phases are reflected in the two lines with clearly different slopes shown in the representation of Eadie-Hofstee (Figure 22 B). Thus, we will refer to Pro1404 as a dual affinity transporter.

Glucose concentration in the ocean is generally low, but fleeting glucose enrichments may occur locally by transient fluxes of the sugar (Flores & Schmetterer, 1986, Stocker, 2012). Moreover, there are different algae like the marine diatoms, which excrete organic compounds or detrital particles creating microenvironments around these sources (Introduction 1.4.2.1).

Therefore, the behaviour of this transporter will depend on the glucose concentration in the environment, changing from high-affinity, low capacity mode to low-affinity, high-capacity mode and back to the high-affinity, low-capacity mode when the concentration drops and *Prochlorococcus* needs to scavenge traces of the sugar.

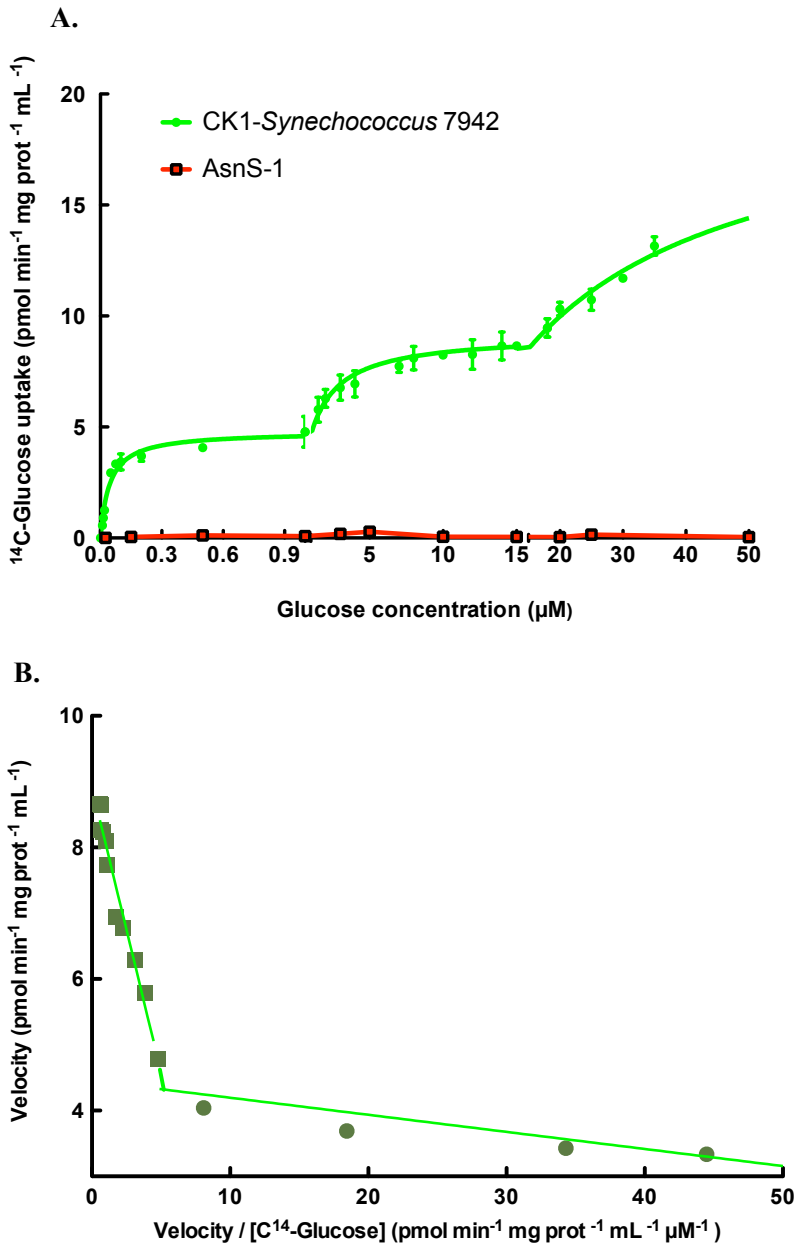


Figure 22. Kinetics studies of glucose uptake in recombinant *S. elongatus* C.K1.

A, ^{14}C -Glucose concentration versus its uptake by recombinant *S. elongatus* C.K1 strain and the control strain AsnS-1. Data presented are the average of three independent biological replicates. Bars show standard deviation for each sample. B, Eadie-Hofstee representation of the kinetics of glucose uptake shown in 22A. The phases are separated by sharply-defined inflection points (Nissen & Martín-Nieto, 1998).

The kinetics constants of membrane transport systems (K_s and V_{max}) are designed to optimize the uptake of nutrients in response to the metabolic needs of the cell and nutrient availability in the environment. Therefore, K_s and V_{max} values might reflect the nutrient regimes encountered in the environment. Moreover, we think that low K_s and high V_{max} *Prochlorococcus* probably make sense with the concentration gradients and accumulations existing where DOM (dissolved organic material) is being produced.

This is not the first time that a multiphasic glucose transport has been described in marine oligotrophic bacteria (Nissen *et al.*, 1984, Hodson *et al.*, 1979), showing a high affinity K_s constant also in the nanomolar range. However, in these cases, it has not been addressed how many transporters were involved.

1.3.2. Specificity of the Pro1404-encoded transporter

To study the specificity of the transporter for glucose, we did competition experiments mixing ^{14}C -glucose $0.5\ \mu\text{M}$ (hot glucose) with different unlabeled sugars (cold sugars) at two different concentrations: 5 and $50\ \mu\text{M}$, using glucose, fructose, melibiose, sucrose and galactose.

The results obtained with $0.5\ \mu\text{M}$ ^{14}C -glucose alone were considered as 100% of uptake (Figure 23). The unlabeled sugars competed with the labelled glucose to go into the cells. The amount of cold sugars used was higher than the hot glucose so the unlabeled sugars induced a decrease in the quantity of radiolabeled glucose. This decrease corresponds with the unlabeled sugar transport.

The presence of other sugars caused only a partial decrease in the glucose uptake, suggesting that Pro1404 has a preference for glucose (according to the Student's *t* test).

Sucrose was the sugar that affected glucose uptake the most (a 50% decrease in glucose uptake when added at 100-fold higher concentration than glucose). Although these concentrations are too high to be actually happening in the ocean, our results indicate that Pro1404 does not transport exclusively glucose.

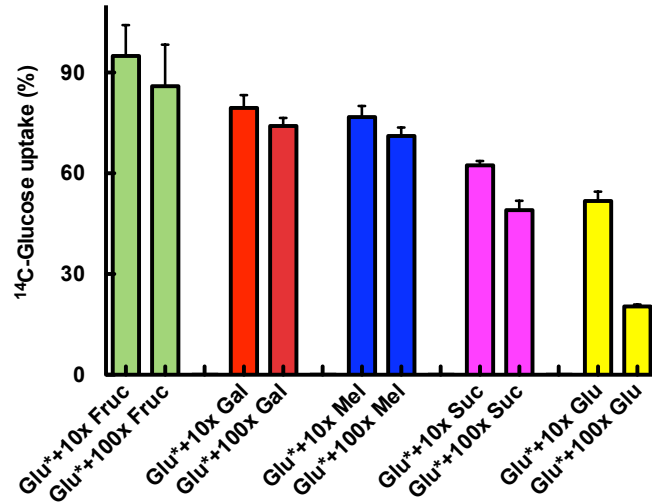


Figure 23. ¹⁴C-Glucose uptake in *S. elongatus* C.K1 in the presence of additional concentrations of different sugars. Fruc, fructose; Gal, galactose; Glu, glucose; Mel, melibiose; Suc, sucrose. Data presented are the average of three independent biological replicates. Bars show SD for each sample.

Consequently our data suggest that, despite its annotation as a melibiose transporter, the main function of this gene product is the uptake of glucose, and its name should be changed to sugar transporter.

In the open ocean the concentrations of monosaccharides are generally low, from 0.002 to 0.8 μ M, glucose being the most abundant sugar in the ocean (Nagata, 2008) (introduction part 1.4.2). Due to the high concentrations of sugars (galactose, melibiose, sucrose and fructose) required to observe an effect on glucose uptake and that glucose is the most abundant sugar in the ocean, these data could suggest that Pro1404 is essentially a glucose transporter.

1.4. *Prochlorococcus marinus* SS120

1.4.1. Glucose uptake kinetics

Consequently, we decided to perform comparative experiments addressing the glucose uptake capabilities of *P. marinus* SS120. With these experiments we wanted to check if the transporter in *Prochlorococcus* had the same kinetic characteristics than when it was cloned in *S. elongatus*.

Figure 24A shows glucose uptake by *Prochlorococcus* sp. SS120 along the

same range of concentrations studied in experiments with the recombinant strains. It is worth mentioning that the glucose uptake observed cannot be explained on the basis of the minimal contamination observed in cultures, as described in detail in a previous manuscript (Gómez-Baena et al., 2008).

As stated above, multiphasic kinetics were observed in cultures of *P. marinus* SS120 (Figure 24), remarkably similar to that observed in recombinant *S. elongatus* C.K1 (Figure 22A), with measurable K_s values of 124.6 nM and 2.37 μ M. Both values were not significantly different from those found in the recombinant C.K1, as compared by the t test ($P < 0.05$).

The kinetic diversity can be clearly visualized in an Eadie-Hofstee plot of the same data (Figure 24B). This linear transformation of Michaelis-Menten equation is particularly useful for demonstrating the presence of multiphasic kinetics since it distributes the data points more evenly than other linear transformations (Eadie, 1952, Hofstee, 1952).

These results show that the Pro1404 transporter is responsible for glucose uptake in *Prochlorococcus* sp. SS120. Furthermore, they suggest too that Pro1404 is the only functional transporter in this strain and probably in all strains of *Prochlorococcus*, because genes homologous to Pro1404 exist in all the genomes of this cyanobacterium.

Multiphasic transport is often considered an adaptation to use the fluctuating concentrations of nutrients (like glucose) in the ocean. In spite of the high energetic cost of the maintenance and synthesis of a multiphasic transport, it appears beneficial for the cyanobacterium.

Moreover although the free energy for the transport of a glucose molecule by Pro1404 would need to be calculated, it is predicted to be much lower than the metabolic effort required for the synthesis of a molecule of glucose from CO_2 (18 molecules of ATP and 12 of NADPH). Therefore, taking up glucose by the transporter is energetically more advantageous for *Prochlorococcus* than to synthesize it de novo.

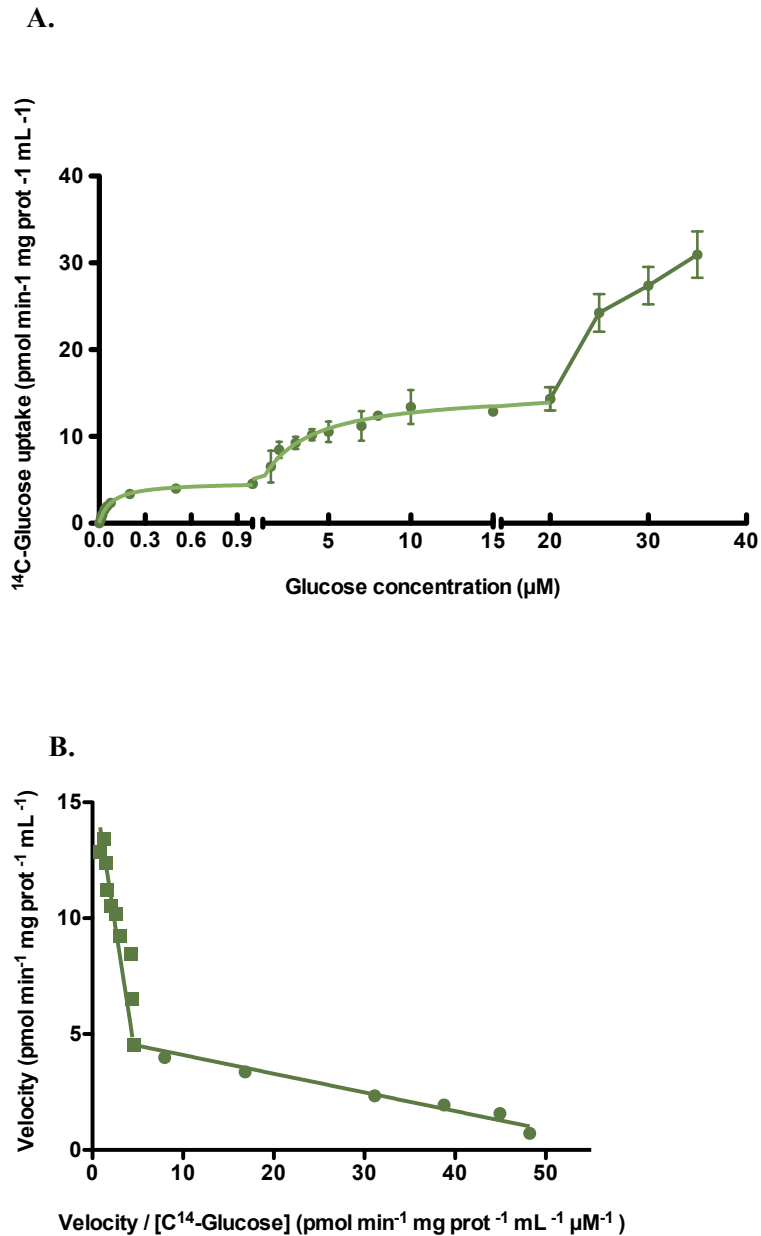


Figure 24. Kinetics studies of glucose uptake in *Prochlorococcus* sp. SS120. A, ^{14}C -Glucose concentration versus its uptake. Data presented are the average of three independent biological replicates. Bars show SD for each sample. B, Eadie-Hofstee representation of the kinetics of glucose uptake shown in 24A. The phases are separated by sharply-defined inflection points (Nissen & Martín-Nieto, 1998).

1.4.2. Effect of inhibitors on the glucose uptake

The energetics of the glucose transport system of *Prochlorococcus* sp. SS120 was also studied. Our initial hypothesis considered that glucose uptake could be most useful for *Prochlorococcus* under conditions of energy limitation; however, previous results in our group observed that the glucose uptake rate was higher under light, with a circa 40% decrease when cells were subjected to darkness (Gómez-Baena et al., 2008). These results are in accordance with what is described in other cyanobacteria where light also enhances the uptake of sugars (Rubin *et al.*, 1977, Michelou et al., 2007), and of amino acids in *Prochlorococcus* (50% increase) (Michelou et al., 2007, Mary et al., 2008b, Church et al., 2004, Church *et al.*, 2006) (Introduction 4.3). For this reason, we used different inhibitors of active transport to analyse if Pro1404 is a primary or secondary active transporter.

In contrast to the primary active transport, in the secondary transport there is not direct coupling of ATP; an electrochemical potential difference is used in this kind of transport (Figure 25).

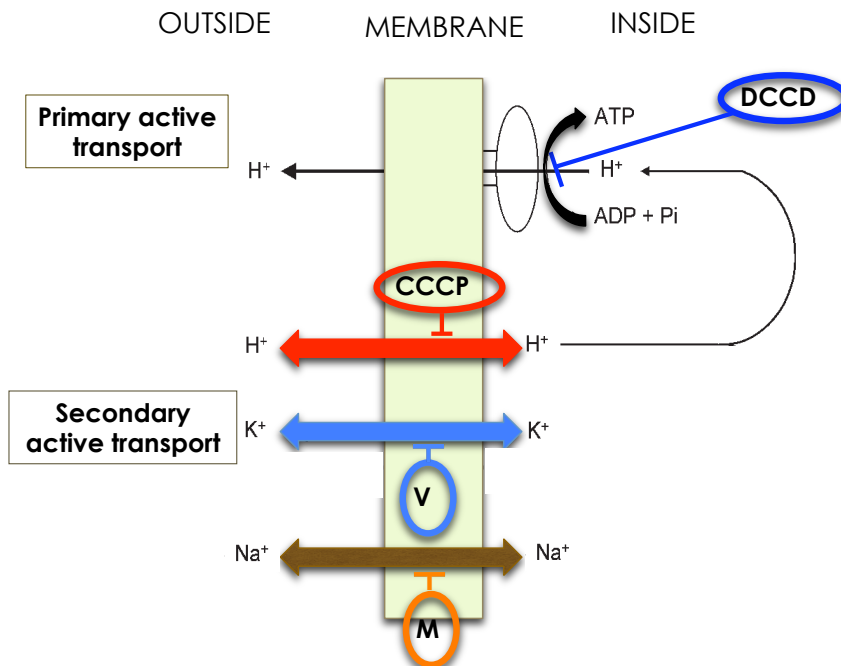


Figure 25. Different mechanisms of active transport. Different inhibitors were used like N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), valinomycin (V) and monensin (M).

Monensin is a monocarboxylic polyether antibiotic which shows a particularly high selectivity for sodium over other alkali metal cations (Hilgenfeld & Saenger, 1982). Previous studies of monensin-mediated transport have been reported by several groups, notably by Degani and Hamilton (Degani & Elgavish, 1978), (Hamilton & Nilsen-Hamilton, 1980). Other monocarboxylic polyether antibiotic is valinomycin, which shows a high selectivity for potassium (Hilgenfeld & Saenger, 1982).

The inhibitor DCCD (N,N-dicyclohexylcarbodiimide) reacts with the carboxyl group of the conserved amino acid residue in the *c*-subunit present in all ATP synthases to inactivate the enzyme, causing the loss of a nucleotide binding site (Shoshan & Selman, 1980, Yoshida *et al.*, 1981).

The last inhibitor used in this experiment was CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) which is classified as an uncoupler increasing the proton permeability of the mitochondrial membrane, thereby preventing formation of the proton gradients postulated to be the energy source for ATP synthesis from ADP and phosphate, according to Mitchell's chemiosmotic mechanism for oxidative phosphorylation (Hopfer *et al.*, 1968, Eisenman *et al.*, 1975).

Because the Pro1404 transporter is annotated like a putative melibiose/sodium symporter, two cations, Na⁺ and K⁺, were tested for their effect on glucose uptake with the ionophores monensin (sodium ionophore) and valinomycin (potassium ionophore). In the figure 26 we can see that the ionophores for sodium and potassium did not affect glucose uptake.

The involvement of a proton-motive force in glucose uptake was further investigated by measuring glucose uptake in the presence of CCCP. The protonophore inhibited glucose transport up to 90%, but the kind of transport was still not clear because it could be a glucose:proton symport mechanism (secondary active transport) or a primary active transport. In order to clear out this, we used a specific inhibitor of membrane ATPases in cyanobacteria DCCD (Lee-Kaden & Simonis, 1982) to distinguish between primary and secondary active transport.

With both inhibitors (DCCD and CCCP) we could see a strong inhibition. Therefore, these results showed that glucose uptake in *Prochlorococcus* needs energy from ATP and so the carrier system seems to be a primary active transport.

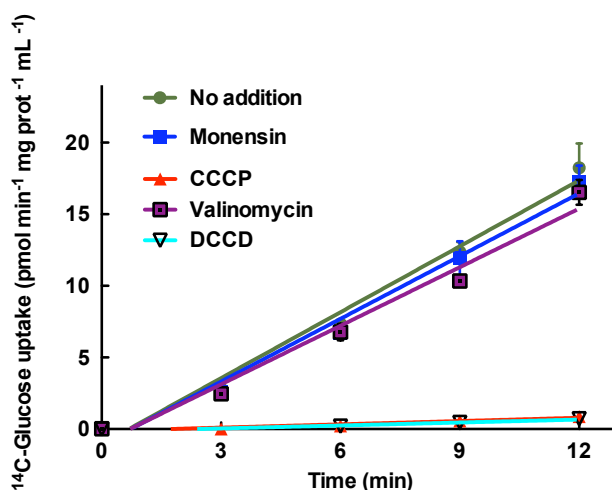


Figure 26. Effect of different inhibitors on glucose uptake in *Prochlorococcus* sp. SS120. Data presented are the average of three independent biological replicates. Bars show standard deviation for each sample. See concentrations in table 15 of the section F.9.3 of Materials and Methods.

Photosynthetic organisms generate reactive oxygen species (ROS) through the photosynthetic electron transport chain, especially when the amount of energy absorbed exceeds the capacity of electron transfer. Inhibition of this transport by 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB) and 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea (DCMU) causes an increased production of reactive oxygen species and alters the cellular energy balance (Trebst, 1980, Haehnel & Trebst, 1982, Heber, 2002).

DCMU blocks the transfer of electrons between the PSII and the plastoquinone pool (Trebst, 1980), meanwhile DBMIB prevents electron transfer between the plastoquinone pool and cytochrome *b₆f* (Rich *et al.*, 1991) (Figure 27).

We wanted to study the effect of these inhibitors to analyse the possible participation of photosynthetic electron transport through the redox state of the plastoquinone pool, in the regulation of glucose uptake. In the case of inhibition of DCMU glucose uptake decreases a little but when the culture is subjected to the action of DBMIB it decreases considerably, up to 90% (Figure 28).

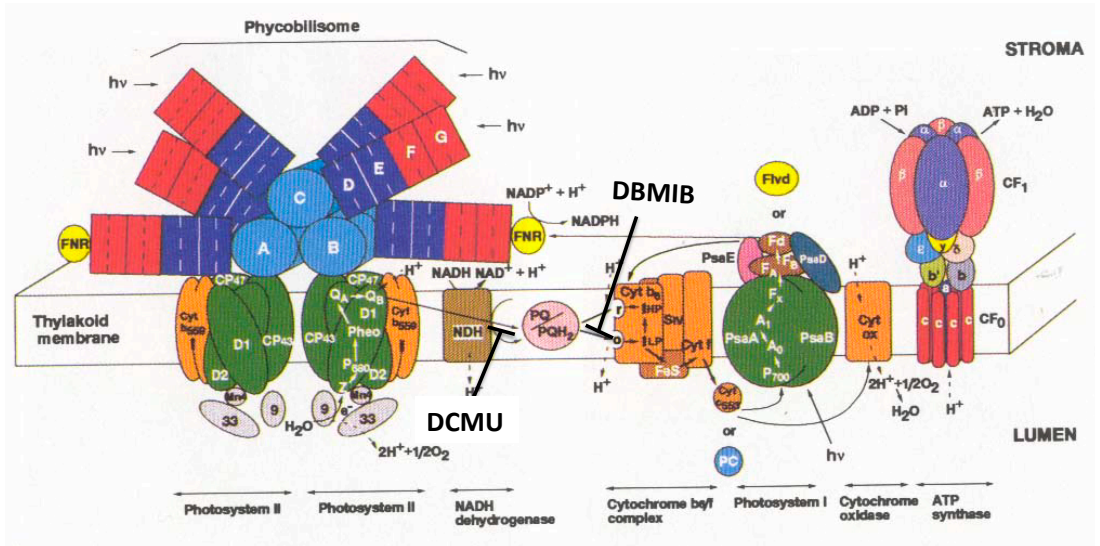


Figure 27. Effect of the inhibitors DCMU and DBMIB on the photosynthetic electron transport chain. Adapted and modified from (Bryant, 1995).

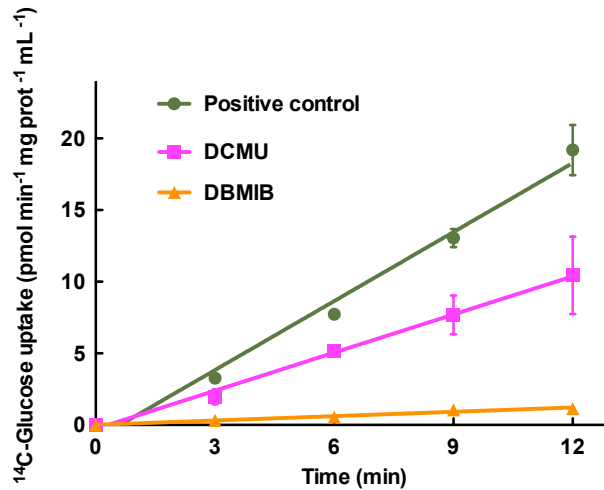


Figure 28. Effect of DCMU and DBMIB on glucose uptake in *Prochlorococcus* sp. SS120.

The inhibitory effects of DBMIB on PS I and the lower effect of DCMU could indicate that the ATP generated by cyclic electron flow of PS I is required for glucose uptake. The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus* cells harvests light and

transfers this energy into ATP that is used for additional powering of the active uptake of glucose.

Therefore, these results support the hypothesis that glucose uptake in *Prochlorococcus* is a primary active transport.

Previous results studying amino acid uptake by *Prochlorococcus* are in accordance with our results on glucose uptake (Mary et al., 2008b). In these experiments it was observed a higher amino acids uptake in the presence of light as well as in our experiments on glucose uptake. Nevertheless, additional experiments are required to confirm this hypothesis.

1.5. Glucose uptake kinetics in *Synechococcus*. sp strain WH 7803

1.5.1. Glucose uptake kinetics

Genes homologous to Pro1404 exist in the genomes of all marine cyanobacteria. Consequently, we decided to perform comparative experiments addressing the glucose uptake capabilities of *P. marinus* SS120 and *Synechococcus* sp. strain WH 7803, which belongs to clade V in the marine *Synechococcus* phylogenetic tree (Scanlan et al., 2009), and is representative of one of the open ocean *Synechococcus* strains inhabiting oligotrophic environments, therefore being a potential competitor of *Prochlorococcus*.

Figure 29A shows glucose uptake by *Synechococcus* along the same range of concentrations studied in experiments with recombinant strains and *Prochlorococcus*, although lower concentrations were required to determine the first phase. We could observe two phases of the multiphasic kinetics with measurable K_s values of 21.55 nM and 2.86 μ M. The third phase again could not be fully characterized due to the elevated concentrations of glucose required to reach saturation. The kinetic diversity can be visualized clearly in an Eadie-Hofstee plot of the same data (Figure 29B).

In figure 29 we can observe that the K_s value of *Synechococcus* sp. WH 7803 is 21.55 nM which means it is roughly six-fold lower than that of *P. marinus* SS120 (124.6 nM). However, the maximum glucose uptake rate is much higher in *Prochlorococcus* than in *Synechococcus* (6.4 vs. 0.16 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). If we take both parameters to calculate the uptake efficiency (maximum uptake rate/ K_s) for each strain, the result is that *Prochlorococcus* is 6.7 times more efficient in glucose uptake than *Synechococcus*. These results would need comparative

studies in the field.

This possible competency for glucose could help to explain the difference of localization in the sea between these two cyanobacteria. *Prochlorococcus* is present from the surface to a depth of approximately 150 m in the open ocean between 40°N and 40°S, different from *Synechococcus* that does not extend in depth. Nevertheless, *Synechococcus* has a wider distribution, covering polar and high-nutrient waters (Partensky et al., 1999a). Differences in their respective uptake capabilities could be an additional factor to be taken into account to understand their different distributions, together with previously described differences in other aspects, such as photosynthetic apparatus or temperature adaptation.

In recent studies using projections of sea surface temperature as a result of increased concentration of greenhouse gases at the end of the 21st century, it has been predicted that the localization of these cyanobacteria will follow being geographically differentiated in the future. Furthermore the cell numbers of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* have been predicted to increase 29% and 14% for *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Flombaum et al., 2013). The possible effect of global warming on the availability of DOC in the open oceans remains to be investigated.

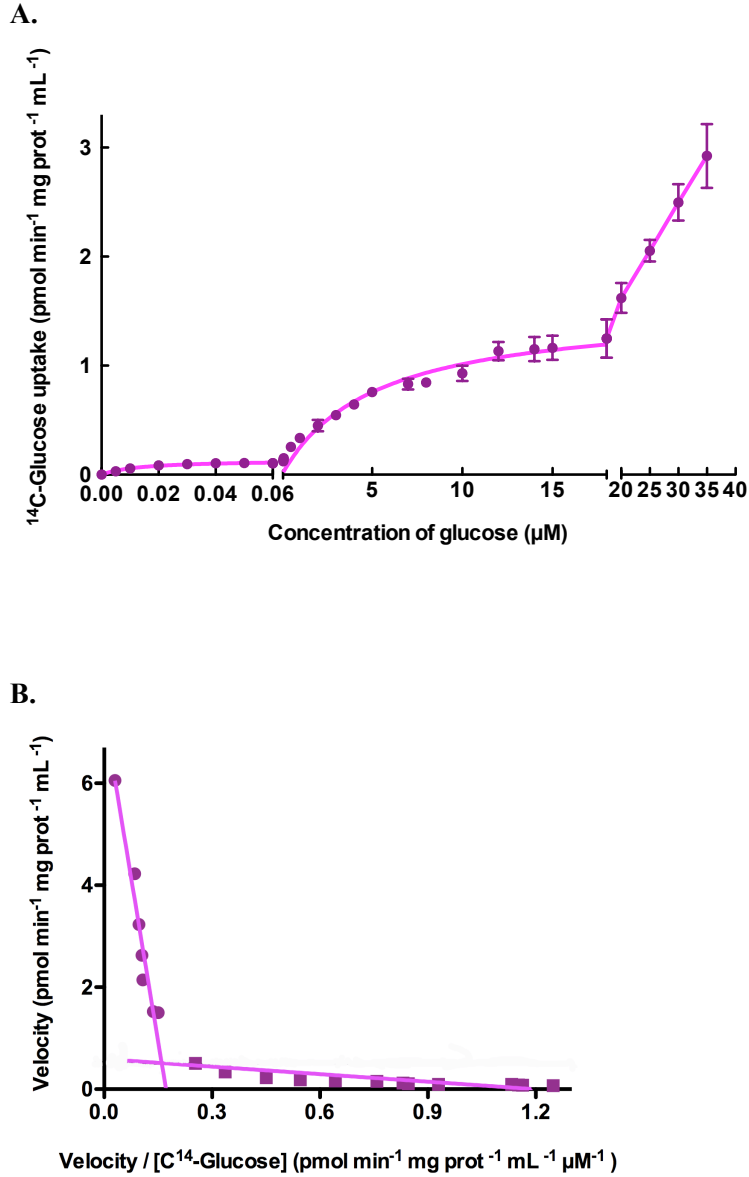


Figure 29. Kinetics studies of glucose uptake in *Synechococcus* sp. WH 7803. A. ^{14}C -Glucose concentration versus its uptake. Data presented are the average of three independent biological replicates. Bars show SD for each sample. B. Eadie-Hofstee representation of the glucose uptake kinetics shown in 29A. The phases are separated by sharply-defined inflection points (Nissen & Martín-Nieto, 1998).

1.6. Sequence features and phylogenetic analysis of Pro1404 in cyanobacteria

The Pro1404 gene (*melB*) is annotated as a putative melibiose/sodium symporter in the genome of *Prochlorococcus marinus* strain SS120. Moreover, it is present in all strains of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* that have been sequenced like a putative GPH family sugar transporter (Kettler et al., 2007, Chisholm et al., 1988, Dufresne et al., 2003, Coleman et al., 2006, Palenik et al., 2003, Dufresne et al., 2008). However, we did not know if this gene is present in all the cyanobacteria and if the sequence has some conserved domain in common with the rest of cyanobacteria.

This is why we did a blast search against all the genomes of the marine and freshwater cyanobacteria thus far available. We screened for genes encoding proteins similar to the glucose transporter (*melB*) from all the marine and freshwater cyanobacteria and we made multiple alignment. With the 100 sequences obtained with a maximum score, we made a phylogenetic tree (Figure 30).

The phylogenetic tree was based on proteins sequences similarity using neighbour-joining. The phylogenetic analysis of the sequences revealed that these sequences fall mostly within 2 large clades, the marine cyanobacteria and freshwater cyanobacteria. This classification could suggest that, although the transporter of glucose of *Prochlorococcus* sp. SS120 is annotated as a melibiose/sodium symporter, it is actually a glucose transporter, since the Pro1404 sequence in marine cyanobacteria is too different from the rest of freshwater cyanobacteria. This is in agreement with our *in vivo* results.

In addition, in the clade II, which includes the marine cyanobacteria, there is a subclade including *Synechococcus* and LL *Prochlorococcus* eMIT9313 and eMIT9303 strains, and a second subclade including HL *Prochlorococcus*. Curiously this tree shows a structure similar to that described when studying possible nitrate assimilation in *Prochlorococcus* ecotypes (Martiny et al., 2009).

On the other hand, we searched if the protein had some conserved domain or hydrophobic zone present in others cyanobacteria.

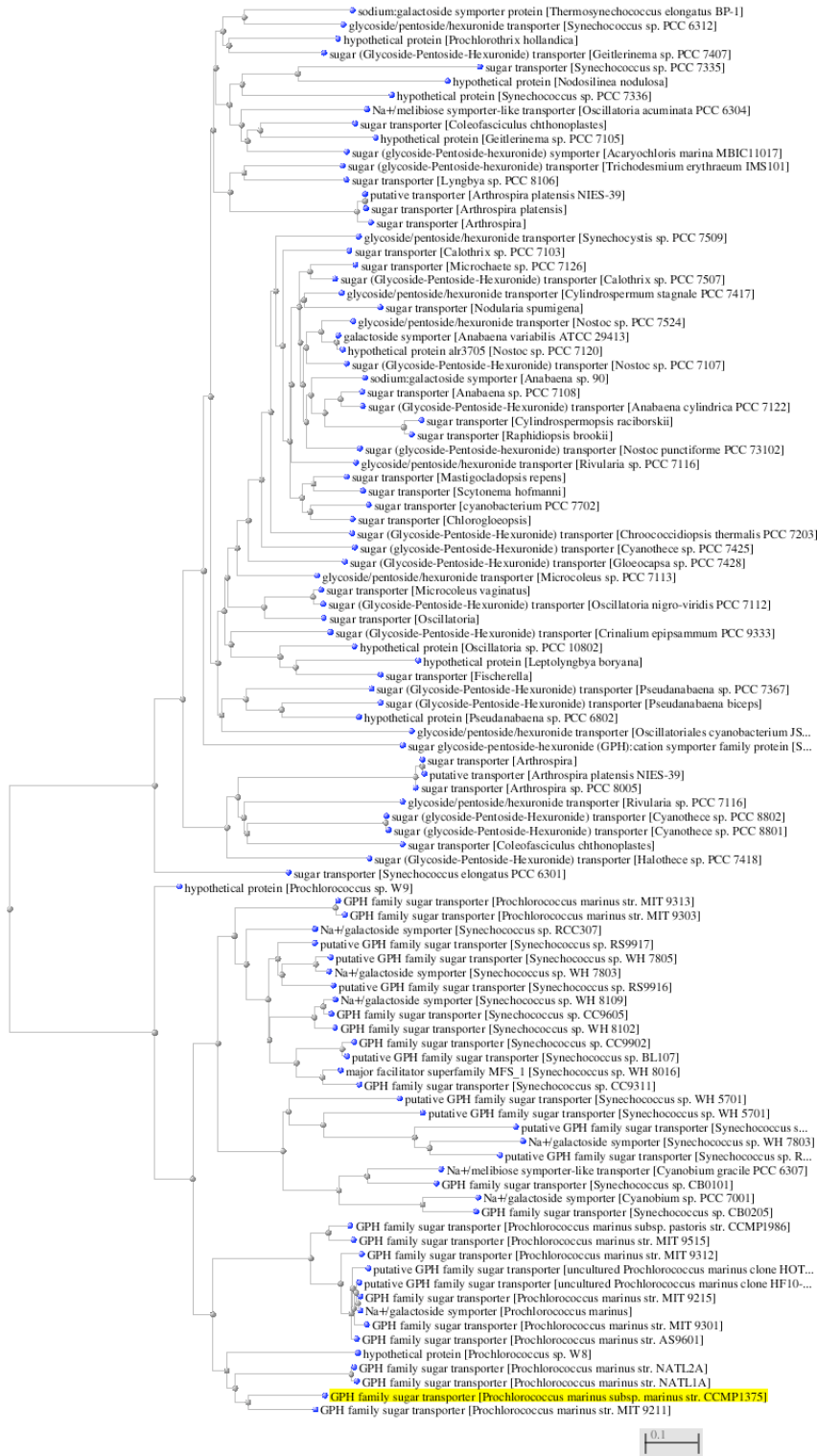


Figure 30. Neighbour-Joining phylogenetic tree of *melB* based on protein sequence similarity with the sequences of all the cyanobacteria. All strains of cyanobacteria were analysed using the neighbour-joining method. Bootstrap values of > 70% are shown. 0.1 is the scale that represents the number of differences between organisms or sequences.

We observed two conserved domain in the sequence: the domain called vacuole effluxer Atg22, which works during stress conditions and the domain called MSF/sugar transport protein. This domain is part of the major facilitator superfamily of membrane transport proteins “mayor facilitator superfamily (MSF)” domain, which consists of twelve transmembrane helices. The MFS transporters are annotated like secondary carriers capable only of transporting small solutes in response to chemiosmotic ion gradients, containing members that function as uniporters, symporters or antiporters. In addition, their solute specificity are also diverse, depending on the cyanobacterium; therefore the transporter Pro1404 could transport other solute like glucose, despite being annotated like a melibiose/sodium symporter.

Our results indicate, however, that Pro1404 does not act like a secondary carrier, but as a primary transporter (Figure 26). Whether this is a specific feature of the Pro1404 transporter, despite the MFS motifs of its sequence, remains to be investigated.

2. GLUCOSE UPTAKE IN NATURAL
***PROCHLOROCOCCUS* POPULATIONS**

2.1. Estimation of the glucose concentration in the Atlantic Ocean with bioassays

Elevated concentrations of DOC usually appear in surface waters (generally within the range of 45-90 μM), decreasing with depth, followed by a low, uniform value in the deep water (35-50 μM) (Ogawa & Tanoue, 2003, Hansell et al., 2009).

The concentration of diverse organic molecules have been estimated using bioassays (Wright & Hobbie, 1966, Zubkov et al., 2003, Zubkov & Tarran, 2005, Zubkov et al., 2004, Zubkov et al., 2008). The samples used in these experiments were obtained between 3 and 10 m depth, because there is where the highest concentrations of DOC are found.

However, the objective of this experiment was to measure the glucose concentration at the same depth and station that the measures of glucose uptake. With this experiment we wanted to compare if the areas where the highest glucose concentration occurred, were also those with *Prochlorococcus* highest glucose uptake.

The glucose concentrations, turnover times and total glucose uptake measured during the AMT-21 cruise are shown in Table 28. Glucose bioavailability, determined using ^3H -glucose, was in the nanomolar range, with measured values ranging from 0.07 to 2.67 nM, in agreement with previous studies (Zubkov *et al.*, 2008).

In Figure 31 the total microbial glucose uptake was plotted against the glucose concentration in each station. However, there was not a clear correlation between the uptake and the concentration.

The highest turnover times of glucose in the deep water (78-130 m) are shown in yellow. These high turnover times are in agreement with the component resistant to microbial degradation which remains at depth (Barber, 1968).

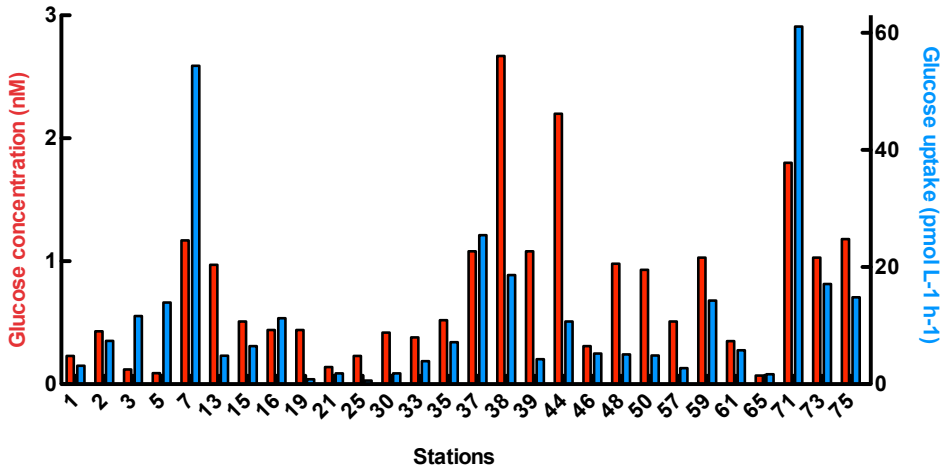


Figure 31. Relation between the glucose concentration found in the sea and the total glucose uptake in bacteria.

Despite the fact that in the deep waters there were higher glucose turnover times than in surface waters, the turnover times were generally low, indicating that glucose is biologically important. Turnover time for glucose shows that the bacteria are actively using glucose and the glucose is continually being produced. Assuming that the supply is fairly continuous, it seems reasonable to suggest that glucose does not accumulate in the water because of the uptake abilities of the bacteria (Wright & Hobbie, 1966). In agreement with our results, the concentrations of sugars were generally higher than those of amino acids in the surface waters of the open ocean, including the oligotrophic gyre and equatorial provinces (Zubkov & Tarran, 2008).

However the uptake of glucose was slower than the to amino acids one (Zubkov & Tarran, 2008).

These results suggest that the energy demand of bacterioplankton is not as high as might be expected in a carbon-stressed situation (Zubkov & Tarran, 2008).

Therefore, it is possible that planktonic microbes prefer other sugars instead of glucose. For this reason we checked this possibility (Figure 32).

Table 28. Concentrations, microbial uptake rates and turnover times of glucose in the Atlantic Ocean. Samples with high glucose concentration and high uptake rate are shown in red. Deep waters are shown in yellow, where in general the turnover time was higher than in the surface waters.

Depth (m)	Station	Date	Turnover (h)	Concentration (nM)	Uptake (pmol L ⁻¹ h ⁻¹)
2	1	30/09/11	75.80	0.23	3.15
10	2	30/09/11	59.22	0.43	7.40
20	3	01/10/11	11.05	0.12	11.62
20	5	02/10/11	6.69	0.09	13.96
20	7	03/10/11	21.62	1.17	54.39
78	13	06/10/11	200.68	0.97	4.86
80	15	07/10/11	77.74	0.51	6.51
103	16	07/10/11	39.42	0.44	11.26
102	19	09/10/11	530.39	0.44	0.84
105	21	10/10/11	75.91	0.14	1.86
120	25	12/10/11	392.00	0.23	0.60
100	30	14/10/11	231.62	0.42	1.83
20	33	16/10/11	97.95	0.38	3.92
47	35	17/10/11	73.48	0.52	7.17
44	37	18/10/11	42.77	1.08	25.45
55	38	18/10/11	143.26	2.67	18.64
80	39	19/10/11	252.76	1.08	4.27
80	44	22/10/11	205.64	2.20	10.71
94	46	23/10/11	59.64	0.31	5.22
115	48	24/10/11	194.62	0.98	5.08
130	50	25/10/11	191.07	0.93	4.88
20	57	29/10/11	188.51	0.51	2.73
20	59	30/10/11	72.77	1.03	14.28
20	61	31/10/11	61.90	0.35	5.79
90	65	02/11/11	41.05	0.07	1.71
20	71	06/11/11	29.59	1.80	61.07
20	73	07/11/11	60.26	1.03	17.12
20	75	08/11/11	80.00	1.18	14.85

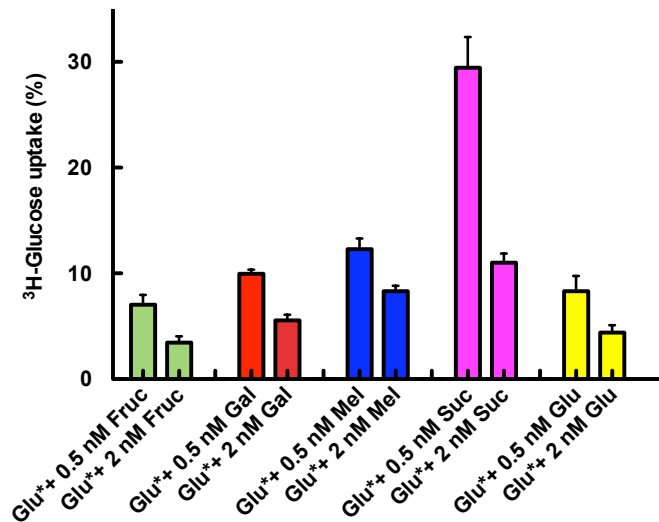


Figure 32. ³H-Glucose uptake in bacteria in the presence of additional concentrations of different sugars. Fruc, fructose; Gal, galactose; Glu, glucose; Mel, melibiose; Suc, sucrose. Data presented are the average of eleven independent biological replicates. Bars show SD for each sample. See section F.9.2 of Materials and Methods for the depth, time and localization of the samples used.

The unlabeled sugars competed with the labelled glucose to go into cell by the transporter. The concentrations of sugars used in the experiment were similar to those found in the ocean. The results showed a general utilization of all sugars although we could observe a preference for fructose and glucose in bacteria. These compounds are important representatives of the small but biologically active fraction of the dissolved organic matter.

2.2 Determination of glucose uptake by natural *Prochlorococcus* populations using flow cytometry

To confirm our laboratory results that *Prochlorococcus* takes up glucose at low concentrations (shown above), we assessed uptake of glucose by *Prochlorococcus* in the Atlantic Ocean on the Atlantic Meridional Transect 21 (AMT-21) research cruise, September–November 2011 (Figure 33).

To compare uptake rates of glucose by *Prochlorococcus* and average bacterioplankton cells, DNA-stained cells were flow sorted after 4 h labeling with 2 nM ³H-glucose. The gated population in the three samples (Figure 34) correspond to

Prochlorococcus, showing its distinctive higher red chlorophyll fluorescence, compared with the total bacterioplankton population (Zubkov et al., 2003, Zubkov & Tarran, 2005).

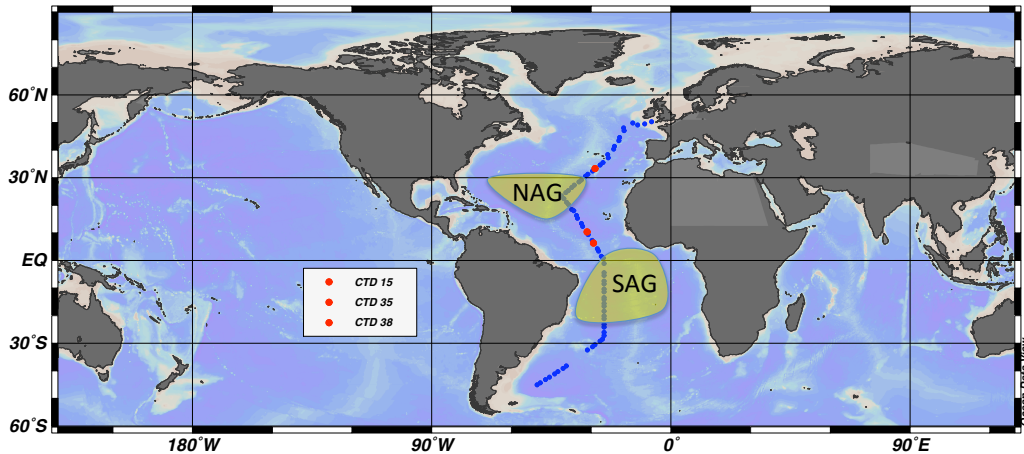


Figure 33. Outline of the Atlantic Meridional Transect 21 cruise. Blue dots represent sampling points along the cruise. Red dots indicate sampling points where glucose uptake by *Prochlorococcus* was observed; the depth of the corresponding samples is shown in Table 28. Green area represent the oligotrophic regions: NAG (North Atlantic Gyre) and SAG (South Atlantic Gyre). Further information is available at the AMT-21 cruise report (www.amt-uk.org/pdf/AMT21_Cruise_Report.pdf).

This type of measurement is technically challenging because of the low specific activity of the glucose tracer and relatively slow uptake of glucose by *Prochlorococcus* cells. Apart from this, the population of bacteria was too big and there were problems to separate the *Prochlorococcus* cells from them, since there were significant overlaps in many samples. Despite these technical limitations, we could determine glucose uptake by *Prochlorococcus* at three stations (Table 29 and Figure 35). We observed measurable rates of glucose import, demonstrating that *Prochlorococcus* does indeed take up glucose in its natural habitat. Furthermore, we analyzed the relative contribution of *Prochlorococcus* populations to total glucose uptake, finding this cyanobacteria was responsible for 2.6–3.7% of total bacterioplankton glucose uptake observed at those stations. On average, the *Prochlorococcus* population contribution to total bacterioplankton glucose uptake was $3.2 \pm 0.56\%$; *Prochlorococcus* cellular glucose uptake relative to the average

bacterioplankton cell uptake was $13 \pm 2\%$.

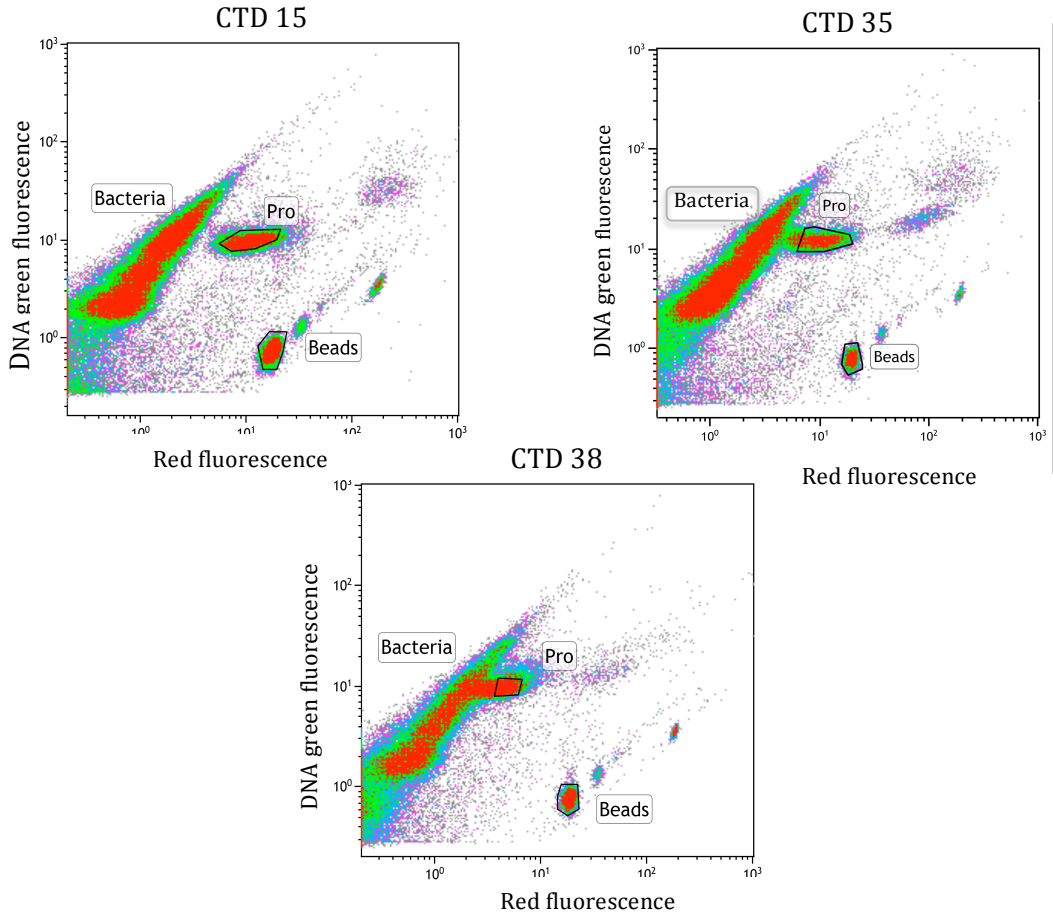


Figure 34. Flow cytometric scatter plot showing a signature of *SYBR Green I*-stained DNA picoplankton from stations 15, 35 and 38 of the AMT-21 cruise (80, 47 and 55 m depth). *Prochlorococcus* cells were identified by their extra red chlorophyll fluorescence, gated (area marked “Pro”) and sorted to determine their ^3H -glucose uptake.

Table 29. ^3H -Glucose uptake determined onboard during the AMT-21 cruise. The table shows the results obtained with sorted *Prochlorococcus* populations vs. total bacterial uptake.

Geographical coordinates	Station	Depth, m	Total <i>Prochlorococcus</i> uptake, $\mu\text{Ci}/\text{mL}$	Total bacterial uptake, $\mu\text{Ci}/\text{mL}$	% total uptake by <i>Prochlorococcus</i>	[Glucose], nM
33° 30.11' N 28° 45.21' W	15	80	4.24×10^{-5}	128×10^{-5}	3.3	0.50
10° 45.43' N 31° 52.40' W	35	47	17.7×10^{-5}	480×10^{-5}	3.7	0.52
06° 31.34' N 29° 07.96' W	38	55	4.18×10^{-5}	160×10^{-5}	2.6	2.7

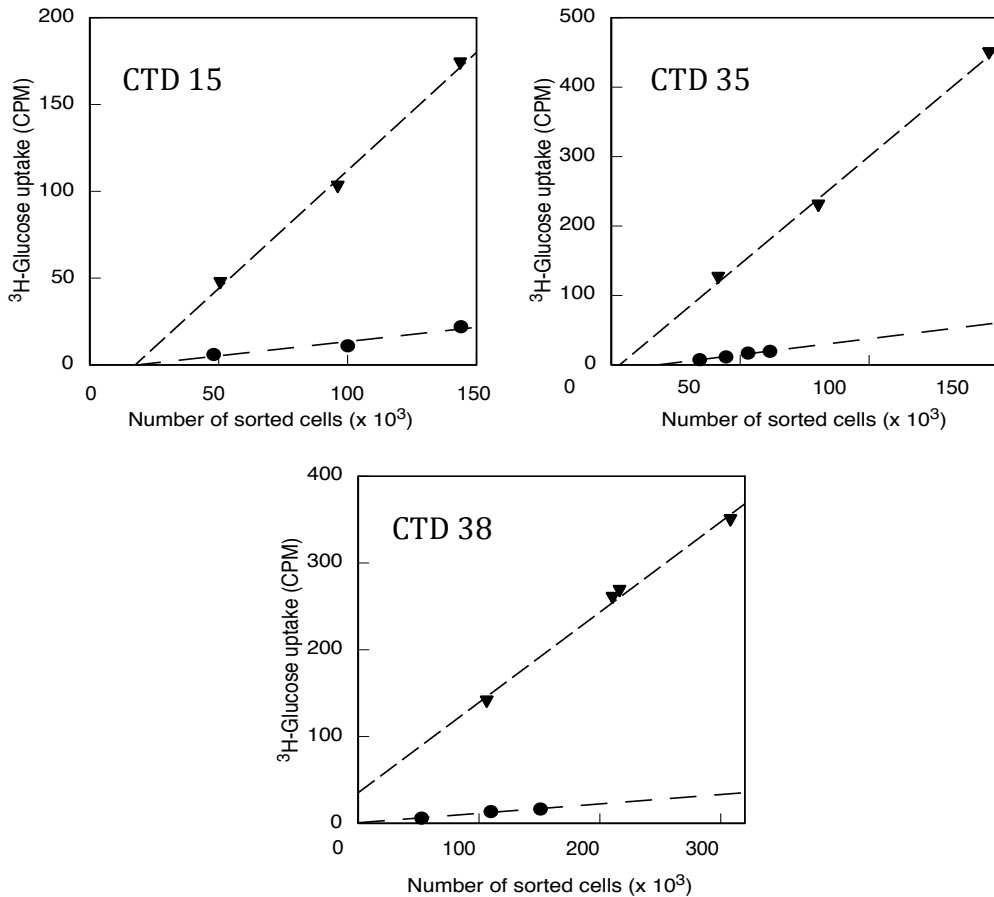


Figure 35. ³H-Glucose uptake vs. number of sorted *Prochlorococcus* or total bacterioplankton cells. These measures correspond with the stations 15 (A), 35 (B), and 38 (C). Further details on the results obtained at those stations are shown in Table 29.

The zones where glucose uptake in *Prochlorococcus* was observed were placed in the border of the oligotrophic gyres. These areas are dominated by large anticyclonic convergent gyres that act to deepen the pycnocline (boundary separating two liquid layers of different densities) and prevent nutrients from the deep water coming up to the euphotic zone. In the Northern hemisphere, northeast trade winds in combination with the Coriolis force (apparent deflection of the path of an object that moves within a rotating coordinate system) and increased solar heating close to the equator result in a westward flowing North Equatorial Current, generating a clockwise circulation in the northern gyre. Similarly, south of the equator, southeast winds force water westwards to form the South Equatorial Current, contributing to the anti-

clockwise circulation of the southern gyre (Niiler, 2001).

The glucose uptake in bacteria showed a pronounced decrease in the North and South oligotrophic gyre provinces (Figure 36). Furthermore, in the surface the concentration of bacteria was very high and both populations (*Prochlorococcus* and bacteria) were superimposed. That is the reason why glucose uptake in *Prochlorococcus* could not be measured within the gyres or in the surface.

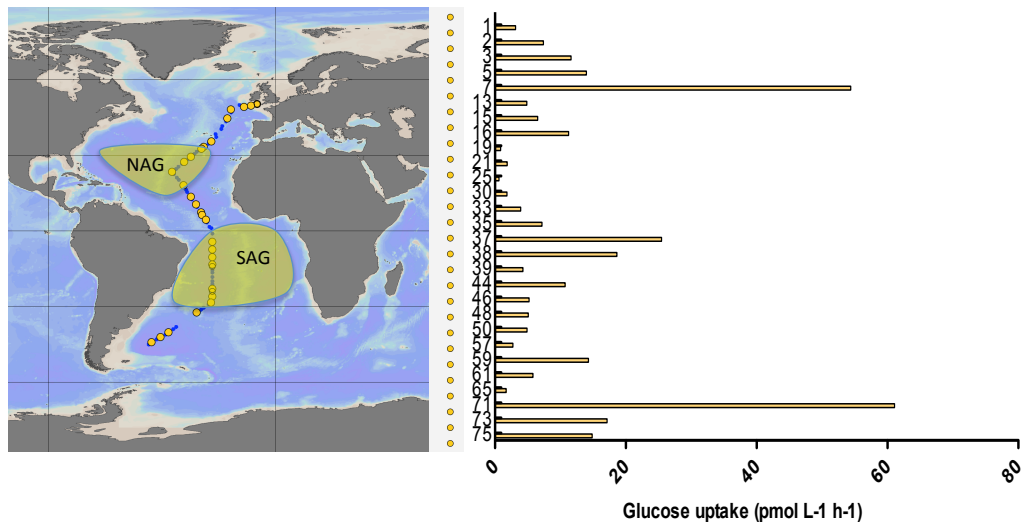


Figure 36. Glucose uptake in bacteria measured during the transect for the Atlantic Ocean in the stations marked. The ordinate axis shows the different stations where glucose uptake was measured. The Green areas represent the oligotrophic regions: NAG (North Atlantic Gyre) and SAG (South Atlantic Gyre).

However, in these areas where nutrients are extremely scarce, *Prochlorococcus* predominates. Therefore, a balance was necessary between high concentration of *Prochlorococcus*, low concentration of bacteria and extra red fluorescence to measure the glucose uptake in *Prochlorococcus*. This equilibrium was possible in the borders of both gyres.

On the other hand, the uptake values shown in Figure 35 are rather low, compared with previous results from our team obtained with *Prochlorococcus* cultures (Gómez-Baena et al., 2008). When we calculated the specific uptake values per cell in natural populations, we obtained 0.642×10^{-10} , 1.597×10^{-10} , and 0.321×10^{-10} $\mu\text{Ci} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for samples obtained at stations 15, 35, and 38 (Table 29), respectively.

By contrast, the results by (Gómez-Baena et al., 2008) with flow sorted cells from cultures of *P. marinus* strain PCC 9511 were $1.02 \times 10^{-8} \mu\text{Ci}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. This fact might be due to the large differences between natural *Prochlorococcus* populations from the open ocean vs. *Prochlorococcus* cells growing in the laboratory under optimized conditions of light, nutrients, temperature, etc. Furthermore, it has to be taken into account that glucose uptake of natural populations was determined after incubations with 2 nM glucose (Table 29) whereas glucose uptake in cultures of *P. marinus* PCC 9511 was determined after incubations with 1 μM glucose (Gómez-Baena et al., 2008), which correspond to two different phases of the uptake kinetics, as shown in sections 1.3.1 (figure 22A) and 1.4.1 (figure 24A) of Results and Discussion.

Previous results in our group demonstrated a higher glucose uptake in *Prochlorococcus* in the light than in the dark. These results could suggest that this cyanobacterium has the potential to gain energy from sunlight as a photoautotroph and at the same time, from organic compounds like glucose. Mixotrophy may offer *Prochlorococcus* the ability to dominate aquatic environments due to their capability to use more resources than either photoautotrophic or organoheterotrophic bacteria.

Previous work has shown that *Prochlorococcus* carried out CO_2 fixation at a rate of $1.2 \text{ fg C}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Jardillier et al., 2010) in the same sampling area used in the present study. Our data showed that *Prochlorococcus* take up carbon from glucose at rates of $0.16\text{-}0.31 \text{ fg C}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. If we compare these data, we can see that the ratio of glucose with respect to that incorporated from CO_2 would be roughly 1/6. Although this is an initial estimation that needs confirmation, it appears that glucose uptake may contribute to supply an amount of C very important for *Prochlorococcus*.

Finally, were measured *Prochlorococcus* abundance in those stations where the population of this bacterium could be separated correctly from heterotrophic bacteria. In the table 30 we can observe that *Prochlorococcus* was abundant in these waters with highest concentrations above $5.34 \cdot 10^5$ at the surface (20 m).

Table 30. *Prochlorococcus* abundances during the cruise AMT-21. In the table is showed the CTD, geographical coordinates and the depth of each sample. DCM, deep chlorophyll maximum.

CTD	Geographical Coordinates	<i>Prochlorococcus</i> abundance (cells/mL)	Depth (m)
3	49° 16.86'N 12° 43.19'W	$6.95 \cdot 10^4$	20
4	49° 08.76' N 14° 30.95'W	$2.93 \cdot 10^5$	20
7	44° 54.47'N 19° 13.38'W	$4.13 \cdot 10^5$	20
11	38° 30.91'N 23° 07.63'W	$4.49 \cdot 10^5$	20
13	35° 41.51'N 25° 48.89'W	$3.64 \cdot 10^5$	78 DCM
15	33° 30.11'N 23° 45.21'W	$1.91 \cdot 10^5$	80 DCM
19	29° 29.07'N 33° 58.30 W	$1.23 \cdot 10^5$	102 DCM
21	27° 34.85'N 36° 22.84'W	$1.69 \cdot 10^5$	95 DCM
23	25° 37.52'N 38° 48.24'W	$7.77 \cdot 10^4$	120 DCM
28	20° 23.43'N 38° 33.00'W	$9.81 \cdot 10^4$	135 DCM
33	13° 47.12'N 33° 53,72'W	$5.34 \cdot 10^5$	20
35	10° 45.43'N 31° 52.40'W	$5.01 \cdot 10^5$	47 DCM
38	06° 31.34'N 29° 07.96'W	$2.27 \cdot 10^5$	55 DCM
39	04° 37.59'N 27° 55.16'W	$2.71 \cdot 10^5$	80 DCM
44	04° 40.59'S 25° 01.35'W	$4.90 \cdot 10^5$	80 DCM
50	13° 34.85'S 25° 04.09'W	$1.93 \cdot 10^5$	130 DCM

2.3 Expression of *melB* in natural *Prochlorococcus* populations of the Atlantic Ocean

In order to check whether the glucose transporter Pro1404 was expressed by natural populations of *Prochlorococcus*, we obtained RNA from samples obtained along the AMT-21 cruise and used them to determine *melB* expression, by using primers designed for the *Prochlorococcus* sp SS120 strain, adapted to grow at depth and whose presence has been described in oligotrophic areas of the Atlantic Ocean (Johnson et al., 2006).

Marine samples were collected and filtered from the surface (2-20 m) and from the deep chlorophyll maximum (DCM) at 17 stations, in order to obtain RNA

preparations (Table 31). These samples were analysed by qRT-PCR to quantify the expression of the glucose transporter *melB*, in order to complement the results obtained in this cruise.

The depth of the DCM varied in the different stations, being higher at the gyres. In these zones, the DCM has been suggested to be the result of a physiological acclimation of phytoplankton to low light levels in the presence of high nutrient concentrations (Cullen, 1982) resulting in an increase in cellular chlorophyll a (Chl-a) content and, consequently, in a decrease in the carbon to Chl-a (C:Chl-a) ratio. Furthermore, these oligotrophic areas are characterised by an upper mixed layer, where nutrients are usually undetectable, a light limited deep layer, and the presence of a Chl-a maximum located in the vicinity of the nutricline (Cullen, 1982, Gould, 1987, Pérez *et al.*, 2006).

Table 31. CTD casts sampled for RNA

CTD	Geographical coordinates	Depths sampled (m)
7	44°54.473N 19°13.387 W	2, 55 DCM
11	38° 30.91' N 23° 07.63' W	20, 60 DCM
18	30°52.871N 32°11.715W	2, 103 DCM
23	25° 37.52' N 38° 48.24' W	2, 120 DCM
25	23° 37.72' N 41° 00.66' W	2, 120 DCM
28	20° 23.43' N 38° 33.00' W	2, 135 DCM
33	13° 47.12' N 33° 53.72' W	20, 85 DCM
35	10° 45.43' N 31° 52.40' W	2, 47 DCM
38	06° 31.34' N 29° 07.96' W	2, 75 DCM
39	04° 37.59' N 27° 55.16' W	2, 80 DCM
41	01° 55.70' N 26° 13.20' W	2, 85 DCM
46	07° 42.52' S 25° 02.34' W	2, 94 DCM
50	13° 34.85' S 25° 04.09' W	2, 130 DCM
53	16° 57.62' S 25° 05.65' W	2, 160 DCM
55	20° 00.85' S 25° 05.46' W	20, 160 DCM
57	23° 04.58' S 25° 03.43' W	2, 140 DCM
63	30° 44.11' S 28° 43.84' W	2, 70 DCM

Only in 13 out of 24 samples could be obtained enough RNA to analyse expression by qRT-PCR real time.

Control PCR reactions were carried out to show the absence of DNA after DNase digestion using primer pairs *rnpRTfwd/ rnpRTrev* (primers according to (Holtendorff et al., 2002)). Other control was made to test the absence of DNA by removing reverse transcriptase in the reverse transcription reactions. The primers used in these experiments were the same used with the laboratory cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120. FST-4/RST-4 primers for the glucose transporter *melB* and SRF/SRR primers for the housekeeping *rnpB*.

The expression of *melB* showed a maximum in the CTDs 18, 28, 35, 39 and 50. This corresponded with the areas where the strain SS120 is especially abundant (Figure 37).

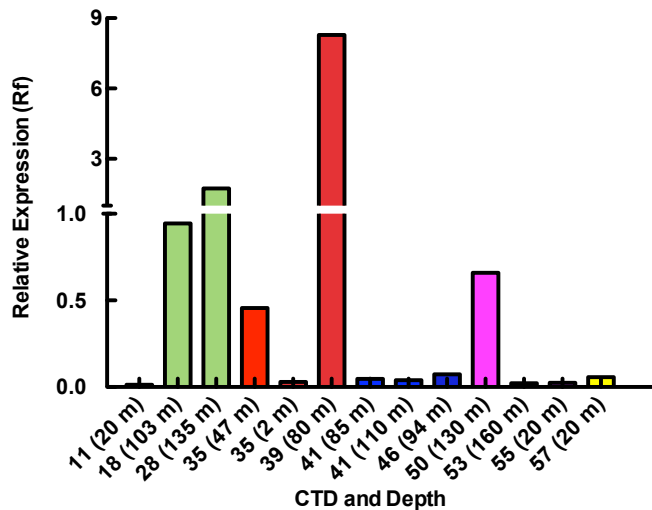


Figure 37. Relative expression of *melB* in natural samples of *Prochlorococcus* obtained during the AMT-21 cruise.

We can observe in Figure 37 that the samples with the highest expression of *melB* were collected either in the oligotrophic regions or in their border, where *Prochlorococcus* is more abundant (Figure 38).

Moreover, this zone is the same (CTD 35) where we could measure the maximum glucose transport; at this sample, the *Prochlorococcus* population

contributed 3.7 % of the total bacterioplankton glucose uptake (Results and Discussion, part 2.2).

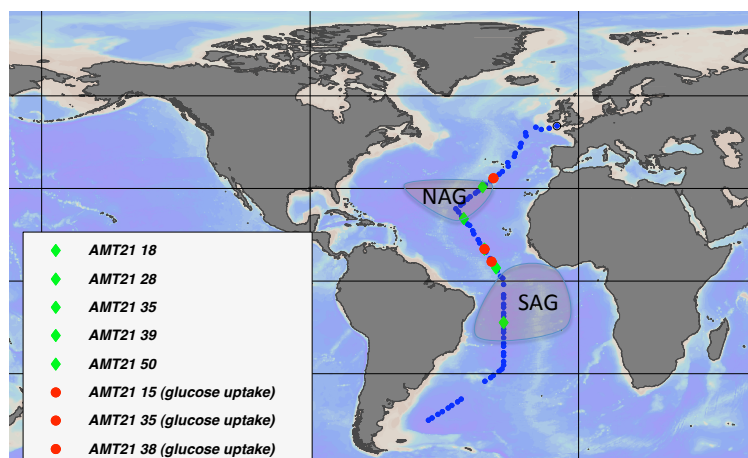


Figure 38. Stations where *melB* expression was observed during the AMT-21 cruise. Blue dots represent sampling points along the cruise. Red dots indicate sampling points where glucose uptake by *Prochlorococcus* was observed. Green dots indicate sampling points where the *melB* expression was higher. The orange areas represent the oligotrophic regions: NAG (North Atlantic Gyre) and SAG (South Atlantic Gyre).

On the other hand, we wanted to see if *melB* expression was related with the glucose concentration measured during the cruise (Results and Discussion, part 2.1). Therefore, we represented the data of the same samples in which we measured the glucose concentrations together with *melB* expression. Unfortunately, we could not estimate the glucose concentration in all CTD where samples for study the expression were collected, so we only could compare 5 samples.

Figure 39 shows a certain positive correlation between the glucose concentration and the *melB* expression determined in natural samples. These results suggest that Pro1404 is being expressed in areas where glucose is available, supporting once more the results shown previously in this work.

The results obtained in natural populations suggest that *Prochlorococcus* has the potential to incorporate organic C within the cell, hinting at a possible mixotrophic mode in this cyanobacterium.

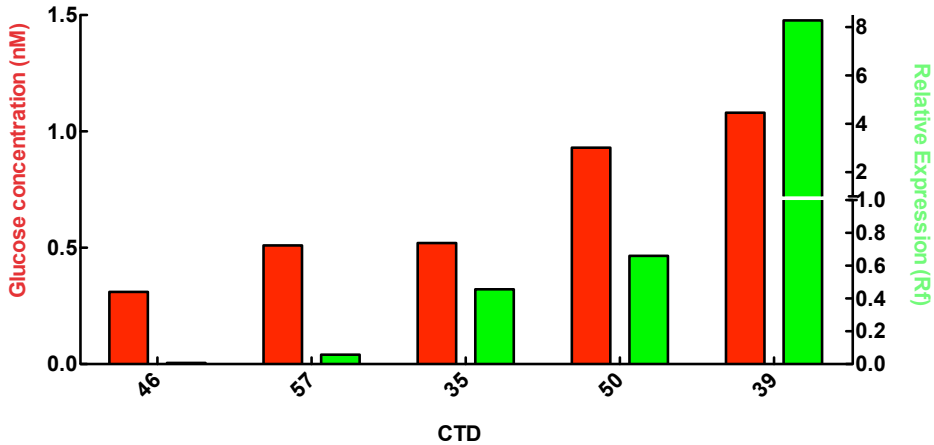


Figure 39. Relation between the glucose concentration found in the sea and the *melB* expression in natural samples of *Prochlorococcus*.

Previously published works and our data suggests that *Prochlorococcus* can use organic compounds such as DMSP, glucose or amino acids to be more “efficient” in these oligotrophic areas (Zubkov et al., 2003, Zubkov & Tarran, 2005, Zubkov et al., 2004, Zubkov et al., 2008, Mary *et al.*, 2008a, Gómez-Baena et al., 2008, Vila-Costa et al., 2006, Ruiz-González et al., 2012, Muñoz-Marín *et al.*, 2013), although there are some questions to answer, like: is it possible for *Prochlorococcus* to grow heterotrophically? Is there any level of heterotrophy required to turn off the photoautotroph mode and turn on the photoheterotrophy? Further work is required in order to solve these questions.

2.3.1. Identification of glucose uptake genes in GOS samples

We searched in the metagenomic libraries for the glucose transporter gene Pro1404 of *Prochlorococcus* in order to check whether similar genes are abundant in the ocean. The samples used were the Global Ocean Survey (GOS), collected between August 2003 and January 2006 covering sites in the Atlantic, Pacific and Indian Oceans (Materials and Methods, part J.12.7 Figure 17) and published results from other expeditions (Yooseph *et al.*, 2007, Rusch *et al.*, 2007, Williamson *et al.*, 2008).

To search for the transporter in public databases, we used the *blastp* algorithm from the NCBI in the portal CAMERA (*Community Cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research & Analysis*) portal (<http://camera.calit2.net/index.shtml>).

We screened for genes encoding proteins similar to the glucose transporter (*melB*) from *Synechococcus* and *Prochlorococcus* and used them to build a phylogenetic tree (Figure 40).

The sequence of Pro1404 has 452 amino acids. GOS sequences giving a maximum score with *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, were aligned using the program *SeaView* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>), imposing a minimum length of 339 amino acids (> 75%) for alignment. The phylogenetic tree was based on proteins sequences similarity using neighbour-joining method. The phylogenetic analysis of the translated GOS sequences revealed three clades, with most *Prochlorococcus* sequences included in Clade 3 (Figure 40). The sequence corresponding to *Synechococcus* sp. PCC 7002 acted as an outgroup in this tree.

Clades 1 and 2 included all the marine *Synechococcus* sequences, and two *Prochlorococcus* strains corresponding to the LL ecotypes (eMIT9313 and eMIT9303) belong to Clade 2. Clade 3 includes sequences related to all *Prochlorococcus* ecotypes (HLI, HLII, LLI, LLII and LLIII; (Malmstrom et al., 2010, Scanlan et al., 2009). This indicates that the GOS sequences included in Clade 3 correspond to *Prochlorococcus*. Curiously this tree shows a similar structure to those obtained with genes related with nitrogen assimilation in *Prochlorococcus* ecotypes (Martiny et al., 2009) and so with the phylogenetic tree of the figure 30.

Finally, the abundance of the sequences showing homology to Pro1404 detected in the GOS database show that this gene is important and relevant for the marine cyanobacteria.

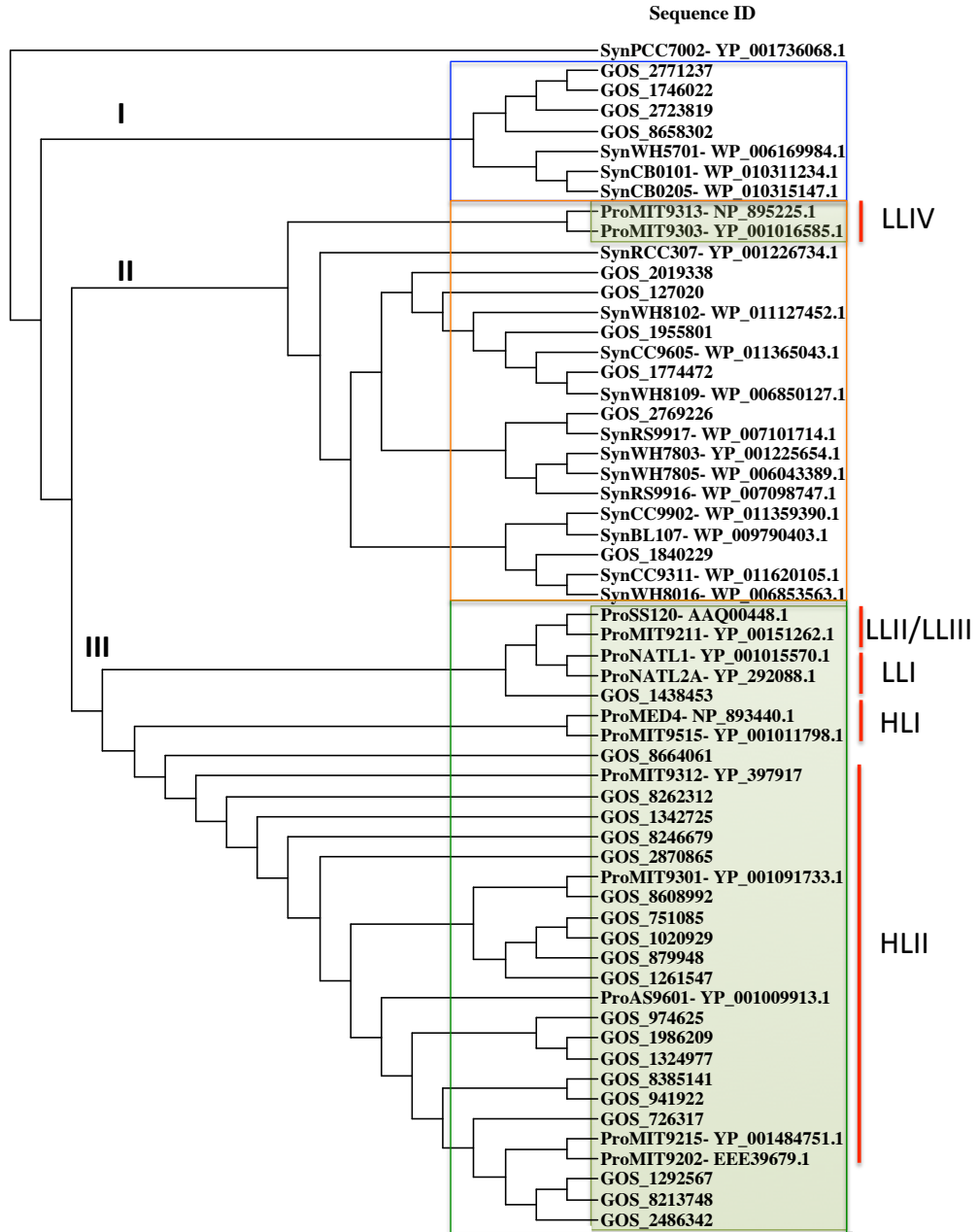


Figure 40. Neighbour-Joining phylogenetic tree of *melB* based on protein sequence similarity with the sequences GOS, *Prochlorococcus* and *Synechococcus* strains were analysed by the Neighbour-Joining method. Bootstrap values of > 70% are shown.

3. EFFECT OF GLUCOSE ADDITION ON THE METABOLISM OF *PROCHLOROCOCCUS*

3.1. Changes in the expression of genes related to glucose metabolism in

Prochlorococcus sp. SS120

Our group reported changes in gene expression after glucose addition to *Prochlorococcus* sp. SS120 cultures (Gómez-Baena et al., 2008). Therefore, we wanted to quantify the expression of genes encoding several of the proteins involved in the metabolism of glucose, like the phosphoribulokinase (*prk*), fructose 1,6-bisphosphate aldolase (*fbaA*), glucose 1-phosphate adenylyltransferase (*glpa*), transaldolase (*tal*), the small and large rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) subunits (*rbsSL*), pyruvate kinase (*pk*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gap*).

Phosphoribulokinase is an enzyme involved in carbon fixation and the transaldolase is a key enzyme in the pentose phosphate, that provides the ribose 5-phosphate for nucleic acid synthesis and NADPH for lipid biosynthesis.

The enzyme fructose-bisphosphate aldolase catalyses the reversible conversion of fructose 1,6-bisphosphate to glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. This enzyme plays important roles in different pathways such as the gluconeogenesis, Calvin cycle and the glycolysis. Other enzyme involved in the glycolysis is the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase which catalyses the sixth step of this pathway.

The glucose 1-phosphate adenylyltransferase catalyses the rate-limiting first step in the biosynthesis of glycogen. On the other hand, the enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, is used in the Calvin cycle to catalyse the first major step of carbon fixation. The enzyme is encoded by large (*rbcL*) and small (*rbcS*) subunit genes that form an operon and are part of a single transcriptional unit (Mohamed & Jansson, 1989).

These enzymes are all involved in carbon metabolism (Figure 41), so we analysed their expressions in the presence of glucose at different times (Figure 42).

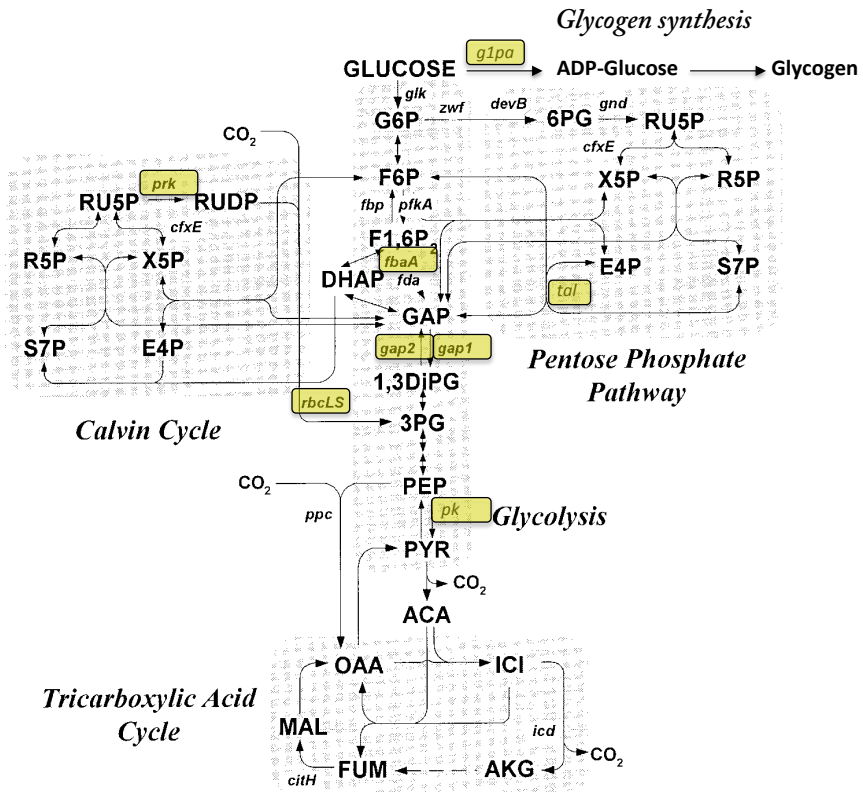


Figure 41. The central metabolic pathway genes of *Prochlorococcus* investigated in this study adapted from (Yang *et al.*, 2002).

In general, the charts show that expression of these genes changed very little after 24 h. At 5 and 8 hours we could observe a major change in the expression of most genes. At 5 hours *tal* and *gap* increased and the rest of the enzymes decreased their expression by half.

Interestingly, *prk* expression experimented a certain increase (2-fold after 8 h since glucose addition) in contrast to the *rbcLS* and *gap*, which strongly decreased their expression at 8 hours. Our data are in agreement with several studies in cyanobacteria and plants which showed that the transcript level of *rbcLS* and other photosynthetic genes decreased under mixotrophics conditions (Nieva & Fernández Valiente, 1996, Yang *et al.*, 2002, Smeekens & Rook, 1997, Quick *et al.*, 1991).

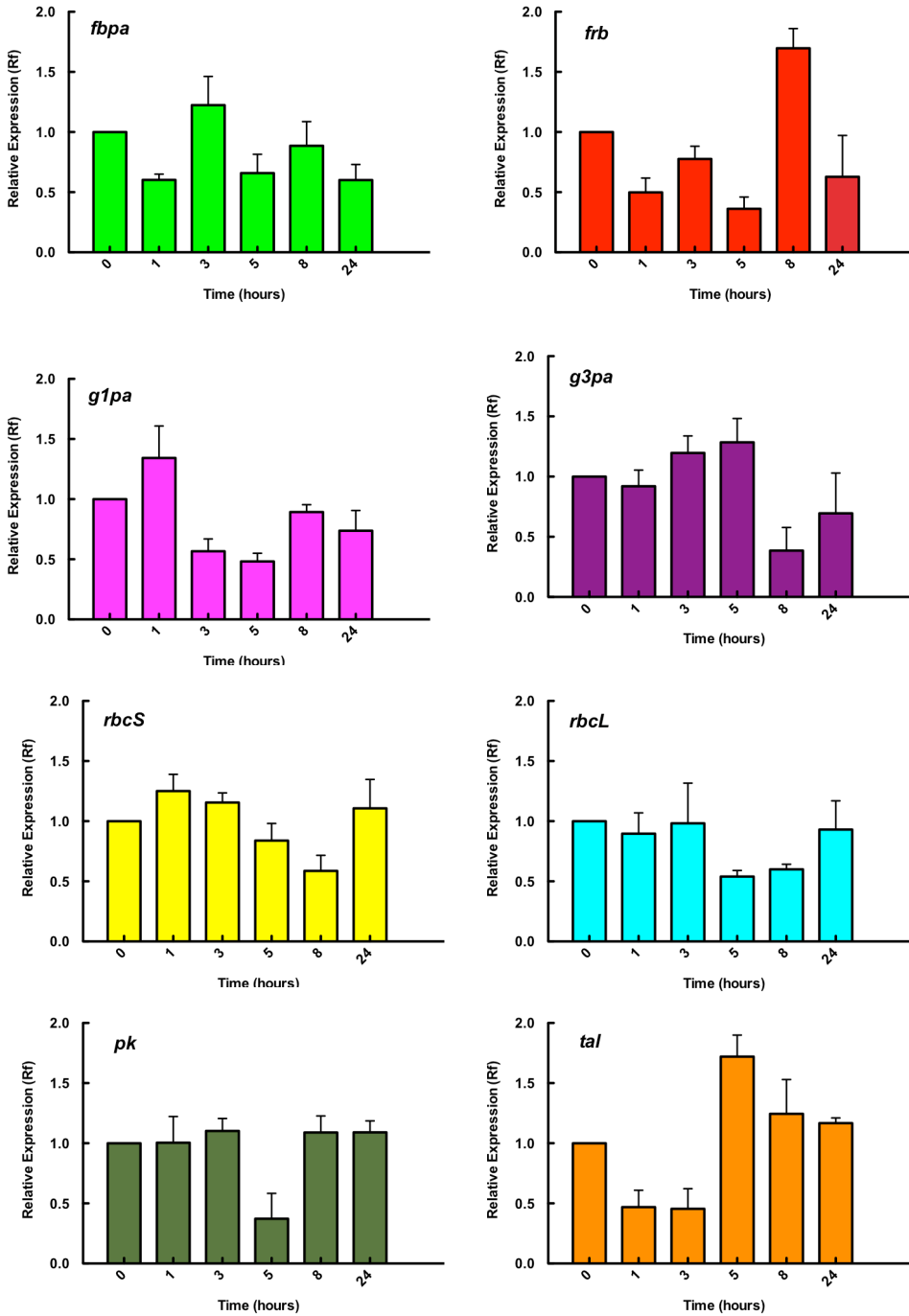


Figure 42. Effect of glucose addition on the gene expression of *Prochlorococcus* sp. SS120. Glucose (1 μ M final concentration) was added to *Prochlorococcus* cultures. Samples were taken at the indicated times and the gene expression measured by real time RT-PCR. Expression level = 1 indicates no changes with respect to the control (no addition). Bars indicate the average of six independent determinations.

In addition, we studied the expression of some genes after addition of different concentrations of glucose at 5 h. We wanted to observe if the expression of *tal* and *rbcLS* changed with the glucose concentration (Figure 43).

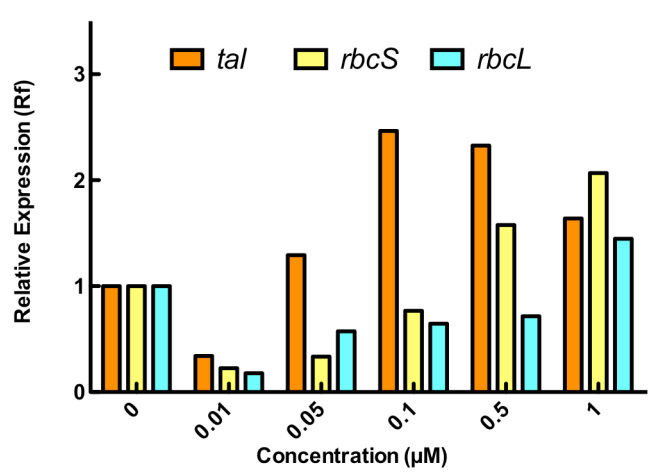


Figure 43. Effect of different glucose concentration on three genes of *Prochlorococcus* sp. SS120. The samples were taken at 5 h and the gene expression measured by real time RT-PCR. Expression level = 1 indicates no changes with respect to the control (no addition). *Tal*, transaldolase; *RbcS*, Rubisco small subunit; *RbcL*, large subunit. Bars indicate the average of seven independent determinations.

In figure 43 we can observe that the expression of *tal* was maximal between 0.1 and 0.5 μM of glucose. However, the expression of the others genes were increasing over time. These expression changes might indicate that the added glucose was being used by *Prochlorococcus*.

Since we observed gene expression changes at different glucose concentrations, we wanted to study if glucose transporter Pro1404 changed its expression too. Therefore, we used the same concentrations as in figure 43, which are close to those observed in the oceans (Figure 44).

In our case, the *melB* expression did not change with the glucose addition, in contrast to previous results in our group, obtained with a higher glucose concentration (Gómez-Baena et al., 2008). These results suggest that *melB* is expressed constitutively.

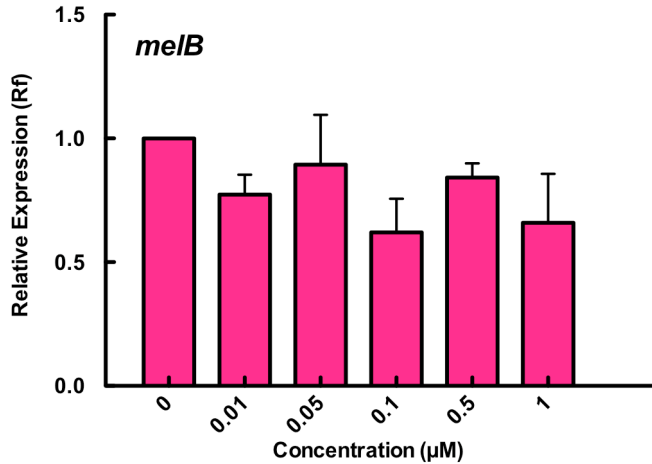


Figure 44. Effect of different glucose concentration on the *melB* expression of *Prochlorococcus* sp. SS120. The samples were taken at 5 h and the gene expression measured by real time RT-PCR. Expression level = 1 indicates no changes with respect to the control (no addition). Bars indicate the average of four independent determinations.

Our studies on gene expression showed that glucose provokes changes in several genes directly involved in its utilization, a logical event if glucose is being utilized by *Prochlorococcus*. On the other hand, some genes did not experiment high changes, suggesting that there are genes involved in the glucose metabolism which are constitutively expressed.

In addition, *Prochlorococcus* lives in a stable environment and has simple systems of regulation (García-Fernández et al., 2004, Rocap et al., 2003, Dufresne et al., 2003), particularly with respect to freshwater model cyanobacteria inhabiting a more variable environment. Therefore it is somehow expectable to observe relatively small changes in *Prochlorococcus*, when subjected to conditions which are not too different from those of its natural environment.

3.2. Changes in the proteome of *Prochlorococcus* sp. SS120 promoted by the presence of glucose

The effect of 0.1 µM glucose addition to *Prochlorococcus* cultures was compared at 5 h and 24 h. The glucose concentration used was in the range of that observed in the oceans (Rich *et al.*, 1996, Azam & Hodson, 1981, Muñoz-Marín et al.,

2013).

Two different biological replicates (control vs glucose) were analysed at 5 hours using the *Synapt G1* (*Waters Corporation*) system and other three different biological replicates (control vs glucose) were analysed at 24 hours with the *Synapt G2* (*Waters Corporation*) system.

The *Waters Synapt HDMS* system is based on quadrupole-TOF MS, enabling the direct analysis of samples after chromatographic separation, without pre-fractionation, providing a highly reliable separation and quantification of proteins. This system enables the analysis of peptides differentiated by size and shape, as well as mass, to deliver increased specificity and sample definition beyond that achievable by conventional mass spectrometers. The absolute quantification is made by the Hi3 method which is based on the theory that the intensity of the three major peptides obtained with trypsin digestion, is proportional to its concentration and constant in all proteins, with a margin of error below 10% (Silva *et al.*, 2006).

The *Synapt G2 HDMS* possesses a higher resolution in ion mobility mode than the *Synapt G1 HDMS*. However, due to the higher nitrogen pressure and despite the presence of the helium cell at the entrance of the ion mobility cell, the ions undergo more energetic collisions prior to their entrance in the mobility cell of the *Synapt G2*. Absolute quantification does not only allow to determine changes between two conditions but also to perform quantitative protein comparisons within the same sample, in contrast with the relative quantification. Typically absolute quantification of proteins requires that a known quantity of intact protein be spiked into the protein mixture of interest prior to digestion with trypsin, or that a known quantity of pre-digested protein be spiked into the mixture after it has been digested. The average MS signal response from the “internal standard protein” is used to determine a universal signal response factor (counts/mol of protein), which is then applied to the other identified proteins in the mixture to determine their absolute concentration. In our experiments 50 fmol of rabbit-phosphorilase B (*Waters Corporation*) were added to the sample in order to use it as internal standard for absolute quantification. On the other hand, we used a whole cell lysate of *E.coli* to evaluate the performance of the instrument.

3.2.1. Optimization of disruption method and identification of proteins with *Synapt G1* at 5 h

Two cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120 (control vs glucose) were analyzed to determine the most appropriate method for cell disruption: cells broken with glass beads or French press. The protein concentration of each sample was the following (Table 32):

Table 32. Protein concentration of the samples obtained with different disruption methods

Experimental condition	Protein concentration (mg/mL)
Control 1 (beads)	1,62
Glucose 1 (beads)	1,41
Control 2 (French press)	1,67
Glucose 2 (French press)	2,51

To evaluate the efficiency of digestion, samples were taken before and after digestion and visualized by SDS-PAGE (Figure 45):

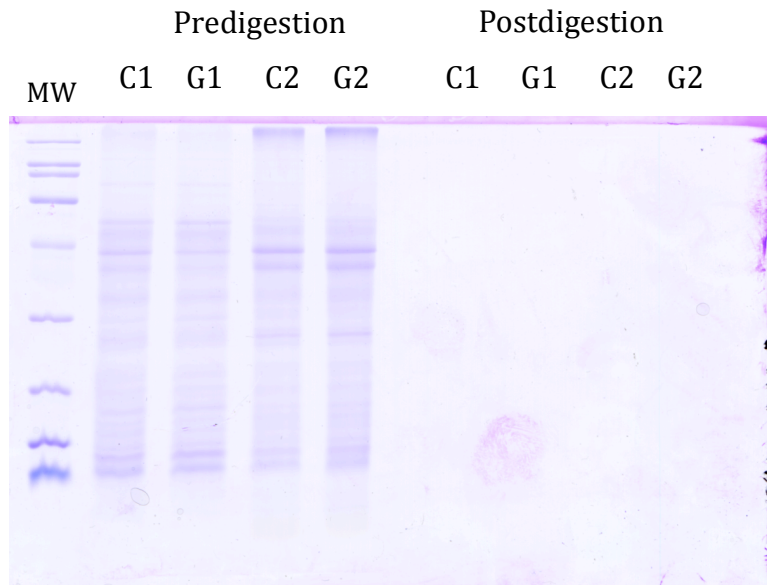


Figure 45. SDS-PAGE (12%) showing pre-digestion and post-digestion of the samples after glucose addition at 5h.

In the gel, we can observe that there are not undigested proteins in the post digestion, therefore it means that all proteins were digested. In all cases 2 μ L of sample were injected (500 ng).

The results showed that more proteins were obtained with the French press (33.8%) than with the glass beads disruption method (figure 46). Therefore, in the following experiments all the samples were broken using the French press.

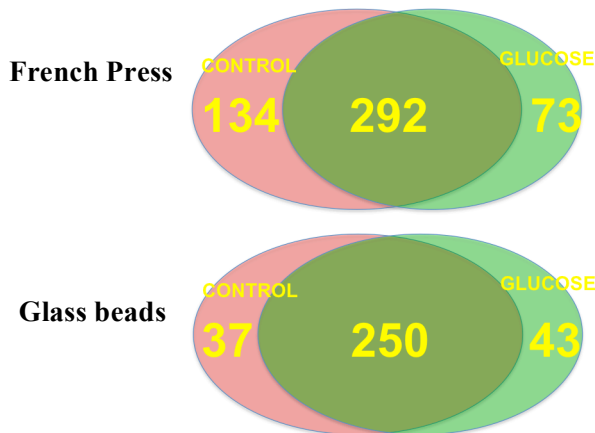


Figure 46. Venn diagrams showing the number of proteins identified with both disruption methods.

These diagrams show the number of proteins identified with two methods of disruption: French press and glass beads. With the first method of disruption 292 proteins were identified both in the control and in the presence of the glucose. In the glucose condition, we could identify 73 proteins which were not identified in the control, 134 proteins were identified only in the control cultures. With the glass beads disruption method 250 proteins were identified in both conditions: control and glucose. In the case of the cultures in the presence of glucose, 43 new proteins were identified only in these conditions and 37 proteins only in the control condition.

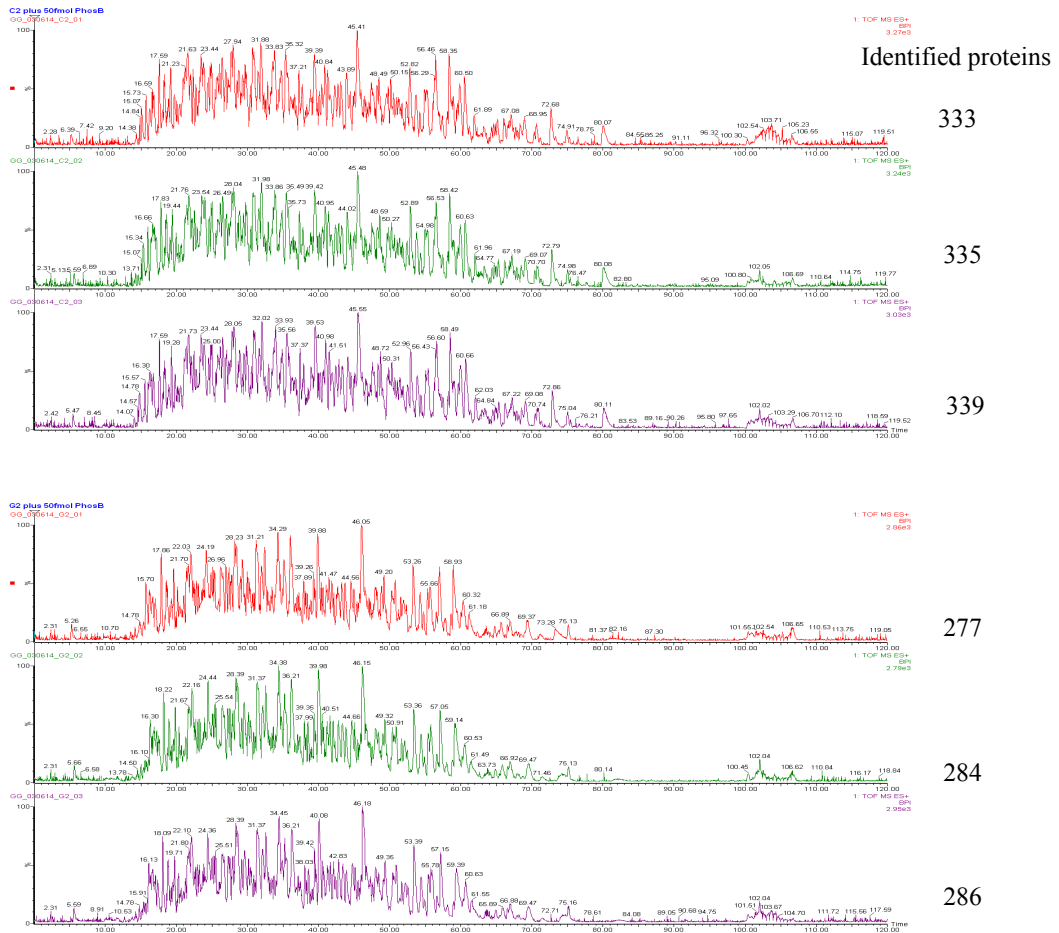


Figure 47. BPI (base peak intensity) chromatograms of the control samples vs samples after glucose addition.

We can see the individual chromatograms of three replicates of culture 2 (French press) with the proteins identified in the control condition and in the presence of glucose (Figure 47). We could observe a good identification in the samples because of the number of proteins identified in the different replicates were similar.

A search against a database composed of entries of *Prochlorococcus marinus* SS120 Uniprot database, with *Waters ProteinLynx Global SERVER* (PLGS) software was performed in order to calculate absolute amount for each protein.

The absolute quantification and the changes in the expression levels of several enzymes involved in central carbon metabolism induced by glucose addition are

shown in the table 33. The concentration of the rubisco large subunit was increased in contrast to the small subunit, which decreased in the presence of glucose in good agreement with gene expression data at the same time point (Figure 42 of Results and Discussion, section 3.1). In line with this, proteins of the CO₂-concentrating mechanism *ccmk* increased too. Another protein detected was the phosphoribulokinase, an enzyme unique to photosynthetic CO₂-fixation, showing a little increase in the expression level under glucose addition.

Moreover, most of the proteins involved in the photosynthesis showed an increase in their expression level after 5 h in the presence of glucose (Table 34).

These proteomic changes suggest that in the presence of glucose the photosynthetic CO₂-fixation is not repressed and *Prochlorococcus* uses the glucose as an extra of energy and carbon sources.

The enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase experimented an increase in its concentration at 5 h, in agreement with the gene expression data.

In addition, the present study revealed changes in pathways involved in the glycolytic/gluconeogenesis/fermentation pathways, showing that the added glucose is being assimilated by *Prochlorococcus*.

Table 33. Effect of glucose addition on proteins involved in the metabolism of the glucose in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of protein in presence of glucose is represented with up and down.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/ μ L)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7VC87	Fructose 1 6 bisphosphate aldolase class II	121.1	9.36	167.55	12.31	Up
Q7VEJ0	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	64.26	0.59	92.44	8.80	Up
Q7VCA0	Glucose 1 phosphate adenylyltransferase	26.99	0.93	44.72	4.14	Up
Q7VBZ6	Glucose 6 phosphate isomerase	8.49	1.57	11.93	0.78	Up
Q7TVA4	D fructose 1 6 bisphosphatase class 2 sedoheptulose 1 7 bisphosphatase	88.16	7.43	127.08	9.15	Up
QVC19	Pyruvate kinase	6.7	0.50	13.53	0.71	Up
Q7VC81	Phosphoribulokinase	95.57	6.19	114.53	0.23	Up
Q7VDZ4	Phosphoglycerate kinase	37.6	3.99	50.07	17.89	Up
Q7VD32	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	131.64	5.71	168.69	14.32	Up
P0A328	Carbon dioxide concentrating mechanism protein ccmK	101.39	5.54	128.65	4.05	Up
Q7VD33	Acyl coenzyme A synthetase	17.27	1.91	25.05	3.08	Up
Q7VC41	Acyl carrier protein	184.37	7.01	261.61	21.63	Up
Q7VD32	Ribulose bisphosphate carboxylase small subunit	53.41	2.10	0	0	Down
Q7VBQ1	Dihydrolipoamide S acetyltransferase	36.36	2.31	0	0	Down
Q7V9R0	Triosephosphate isomerase	6.95	0.92	0	0	Down

Table 34. Effect of glucose addition on proteins involved in the photosynthesis in *Prochlorococcus* sp. SS120. The increase or decrease of the expression of protein after 24 h in the presence of glucose is represented with up and down.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/ μ L)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
P72213	Phycoerythrin class III alpha chain CpeA	81.95	0.85	91.47	1.41	Up
P46895	Photosystem Q B protein	70.33	3.23	111.19	3.67	Up
Q7VC13	Photosystem I reaction center subunit PsaK	154.26	6.27	202.73	15.28	Up
Q7VD76	Photosystem II protein Psb27	0	0	31.69	9.22	Up
Q7VDM2	Photosystem II chlorophyll a binding protein CP47	78.62	5.01	96.03	1.58	Up
Q7VDW1	Photosystem II manganese stabilizing protein PsbO	300.53	13.21	426.26	42.04	Up
Q7VDN2	Phycoerythrin class III beta chain CpeB	71.52	3.89	96.95	1.59	Up
Q7VCF7	Divinyl chlorophyll a b light harvesting protein pcbA	18.613 7	3.34	0	0	Down
Q9L8M5	Divinyl chlorophyll a b light harvesting protein pcbB	36.98	2.50	0	0	Down
Q7VBJ5	Photosystem II protein P PsbP	5.07	0.33	0	0	Down
Q7VCG9	Photosystem II reaction center Psb28	7.54	0.64	0	0	Down
Q7V9U1	Photosystem I reaction center subunit II PsaD	180.91	21.97	143.67	13.78	Down

Other important proteins identified in this study were: regulatory proteins like nitrogen regulatory protein P_{II}, which was absent in presence of glucose (table 35). The inhibition of CO₂-fixation reduces cellular 2-oxoglutarate levels (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995b). The 2-oxoglutarate plays a role like a sensor of the variations in the ratio C:N intracellular of the cyanobacteria (Muro-Pastor *et al.*, 2001, Laurent *et al.*, 2005, Irmiler *et al.*, 1997, Forchhammer, 1999) and it has the capability of activate positively the proteins NtcA and P_{II} (Tanigawa *et al.*, 2002, Vazquez-Bermudez *et al.*, 2002, Forchhammer, 2004, Muro-Pastor *et al.*, 2005).

However, although this is the general diagram in cyanobacteria, the behavior of *Prochlorococcus* is different. In previous results of our group (López-Lozano, 2007), the expression of *glnB* (encoding the P_{II} protein) was measured in the presence of glucose showing that the *glnB* expression at 5 h is down. This is in good agreement with our proteomic results, since the concentration of protein decreased in presence of glucose at 5 h.

Others proteins involved in the regulation (two component response regulators) are identified in presence of glucose. These proteins regulate the gene expression in response to external environmental conditions in bacteria (Parkinson & kofoid, 1992).

Table 35. Effect of glucose addition on regulatory proteins in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of protein in presence of glucose is represented with up and down.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/μL)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7VA51	Nitrogen regulatory protein PII	33.8	1.67	0	0	Down
Q7VBK9	Two component response regulator	21.98	5.31	14.04	0.3	Down
Q7VE20	Two component response regulator	22.85	1.37	32.59	2.13	Up

Finally, we observed a widespread increase of proteins involved in the synthesis of new proteins (table 36), showing once more a change in the proteome of *Prochlorococcus* in the presence of glucose.

Table 36. Effect of glucose addition on proteins involved in the synthesis of new proteins of *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of protein in presence of glucose is represented with up and down.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/ μ L)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7VD53	Ribosomal protein S1	12.41	1.28	23.05	6.36	Up
Q7VDM5	Ribosomal protein S1	37.32	2.46	53.85	3.3	Up
Q7V9Y8	50S ribosomal protein L13	40.36	2.94	61.5	4.64	Up
Q7V9X2	50S ribosomal protein L14	13.37	0.16	22.31	3.67	Up
Q7V9X9	50S ribosomal protein L15	24.98	1.46	42.67	2.17	Up
Q7V9Y6	50S ribosomal protein L17			31.76	3.37	Up
Q7VDB0	50S ribosomal protein L19	21.79	2.63	35.34	5.79	Up
Q7V9X3	50S ribosomal protein L24	14.73	3.97	32.67	0.83	Up
Q7V9X0	50S ribosomal protein L29	30.29	2.38	43.44	1.64	Up
Q7V9W2	50S ribosomal protein L3	20.82	1.21	28.61	1.97	Up
Q7V9W3	50S ribosomal protein L4	27.05	1.59	36.94	3.16	Up
Q7V9X6	50S ribosomal protein L6	18.06	1.5	22.53	1.41	Up
Q7VDY8	50S ribosomal protein L7 L12	165.21	12.81	228.43	15.06	Up
Q7V9J9	50S ribosomal protein L9	27.98	1.33	39.37	2.31	Up
Q7VD62	Ribosome recycling factor	19.72	0.21	33.77	2.62	Up
Q7V9Y3	30S ribosomal protein S13	25.86	1.74	38.07	1.38	Up
Q7V9W8	30S ribosomal protein S3	8.86	1.46	14.71	1.75	Up
Q7VDG7	30S ribosomal protein S4	25.01	1.64	33.68	2.84	Up
Q7V9F9	30S ribosomal protein S6	23.49	0.02	36.82	2.27	Up
Q7VA03	30S ribosomal protein S7	50.09	2.89	70.67	5.56	Up
O07828	30S ribosomal protein S9	13.92	2.83	21.46	2.66	Up
Q7VCB5	Elongation factor Ts	47.72	2.35	60.44	4.62	Up
Q7VA05	Elongation factor Tu	203.17	11.79	297.71	3.82	Up

3.2.2. Changes in the proteome at 24 h with *Synapt HDMS G2*

Given that *Prochlorococcus* could need a longer time to show more marked changes in the proteins, we decided to measure the changes in the proteome after 24 h of glucose addition.

Three cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120 were subjected to glucose addition and compared to their corresponding control. The cells were broken with the

French press and samples sent to the laboratory of Prof. R. Beynon for proteomic analysis. The concentration of protein was measured in the three cultures. The protein concentration in one of them was too low, therefore this culture was not included in the results (table 37).

Table 37. Protein concentration in the presence of 0.1 μ M of glucose in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h.

Experiment	Control	Glucose
22/07/10	1.70 mg/mL	1.77 mg/mL
27/07/10	1.32 mg/mL	2.09 mg/mL

Prior to their analysis by LC-MS/MS, the starting material and post digestion samples were checked by SDS-PAGE (figure 48).

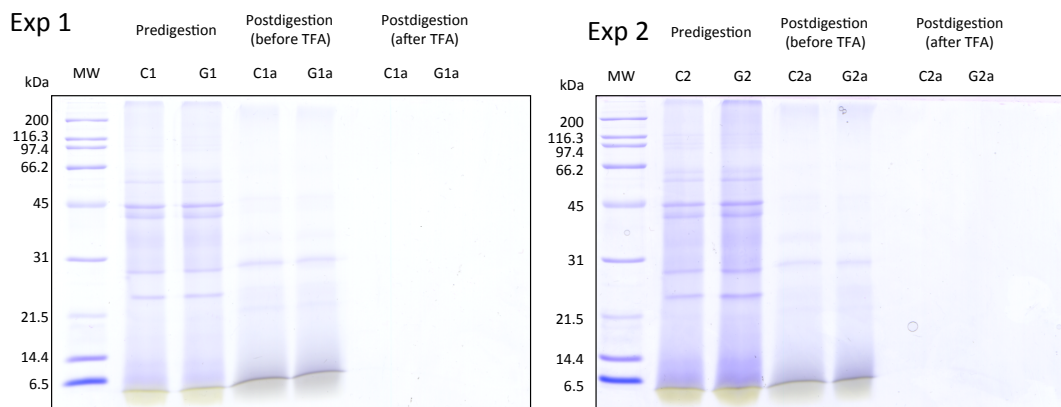


Figure 48. SDS-PAGE (12%) showing pre-digestion and post-digestion of the samples after glucose addition at 24 h.

For this purpose, we took advantage of the new instrumentation acquired by the group in Liverpool. The 24 h experiments were analyzed using the *Synapt G2*. With the *Synapt G2* and at 24 hours, 283 proteins were identified common to glucose and control conditions. Only 83 proteins were identified uniquely in the control and a total of 145 proteins uniquely in the presence of glucose (Figure 49).



Figure 49: Venn diagrams showing the number of proteins identified with the *Synapt G2* at 24 h.

Among the proteins identified, we could find many involved in the glycolytic/ /pentose phosphate/ Calvin cycle/fermentation pathways (table 38).

Table 38. Effect of glucose addition on proteins involved in the metabolism of the glucose in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of protein in presence of glucose is represented with up and down. The proteins that did not change in the presence of glucose is shown like unchange.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/ μ L)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7VAZ1	UDP glucose 6 dehydrogenase	0	0	3.79	0.15	Up
Q7VC87	Fructose 1 6 biphosphate aldolase class II	24.5	2.42	30.43	2.40	Up
Q7TVA4	D fructose 1 6 bisphosphatase class 2 sedoheptulose 1 7 bisphosphatase	9.39	4.03	15.35	1.65	Up
Q7VCA0	Glucose 1 phosphate adenyltransferase	7.99	2.41	13.66	1.76	Up
Q7VEC3	Phosphoglucomutase	7.44	0.77	8.88	0.29	Up
Q7VAU2	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	3.89	0.51	6.63	1.73	Up
Q7VD64	Transaldolase	3.09	0.19	5.95	0	Up
Q7V9S3	L lactate dehydrogenase FMN dependent related enzyme	3.80	1.06	0	0	Down
Q7VC19	Pyruvate kinase	3.64	1.61	3.63	0	Unchange
P0A328	Carbon dioxide concentrating mechanism protein ccmK	80.64	25.54	70.15	17.91	Unchange
Q7VC81	Phosphoribulokinase	40.91	5.29	51.62	4.57	Unchange
Q7VD33	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	58.95	12	74.59	8.87	Unchange
Q7VD32	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit	29.56	6.65	24.13	0.24	Unchange

Some of the enzymes like the fructose 1,6 bisphosphate aldolase class II and the glucose 1 phosphate adenylyltransferase increased the expression at 24 h, in agreement with the data at 5 h of the glucose addition. However, the concentration of several proteins at 24 h did not show changes in the presence of glucose, like the pyruvate kinase and phosphoribulokinase. Phosphoribulokinase did not show changes in the presence of glucose at 24 h, in agreement with the gene expression data previously shown (figure 42). Moreover other proteins related with the CO₂ fixation did not show changes at 24 h, like the carbon dioxide concentrating mechanism protein ccmk or the ribulose bisphosphate carboxylase large and small subunits. These data support our hypothesis that in the presence of glucose CO₂ fixation remains.

Next we decided to do a functional clustering analysis using DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (david.abcc.nifert.gov/summary.jsp) (Dennis *et al.*, 2003), which uses several databases for the classification and identification of the proteins (Figure 50).

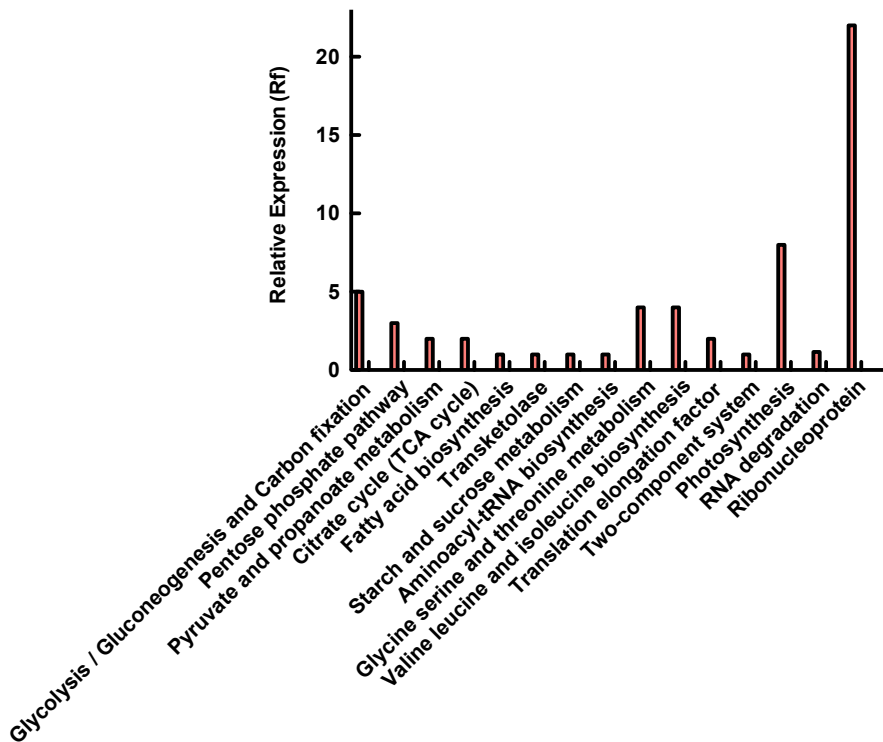


Figure 50. Graph of enrichment score of proteins identified in the presence of glucose.

From the functional clustering analysis, DAVID calculates the enrichment score for each cluster, considering that the p.value is significant when is higher than 1.3.

Photosynthetic proteins function showed changes at 24 h with glucose, as well as at 5 h. The increase in proteins involved in the photosynthesis might be explained due to the active glucose uptake of the transporter Pro1404; this transporter needs energy and reducing power obtained from the photosynthetic electron transport chain according to the results (section 1.4.2 of Results and Discussion).

This contrasted with the results shown in *Synechocystis* PCC 6803 (Kurian *et al.*, 2006) in the presence of glucose, where the photosynthetic capacity was markedly reduced and lack of carboxysomes was observed in heterotrophic cells, suggesting a significant down-regulation of CO₂-fixation during heterotrophic growth. However, it is noteworthy that the glucose concentration used in that study (5 mM) was higher than the glucose used in our experiments and the cultures were cultivated in darkness. Our results suggest that *Prochlorococcus* uses glucose as an additional source of energy and carbon, but possibly is incapable of strictly heterotrophic growth.

On the other hand, the regulatory proteins showed changes at 24 *vs* at 5 h (table 39). The protein P_{II} at 5 h showed a decrease in the expression of gene as in the expression of the protein. However at 24 h, it remained unchanged in the presence of glucose, in agreement with *glnB* expression results described previously (López-Lozano, 2007).

Table 39. Effect of glucose addition on regulatory proteins in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of protein in the presence of glucose is represented with up and down. The proteins that did not change in the presence of glucose is shown like unchange.

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/μL)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7VE63	Two component response regulator	9.94	4.64	7.27	0.8	Unchange
Q7VBK9	Two component response regulator	30.85	6.83	39.25	1.59	Up
Q7VDY8	Nitrogen regulatory protein PII	25.13	2.38	30.51	3.31	Unchange

Finally we can observe an increase in the concentration of proteins involved in the synthesis of new proteins like ribosomal ones (table 40). Therefore, the data could suggest that the glucose is causing changes in the proteome of *Prochlorococcus* at 5 and at 24 h.

Table 40. Effect of glucose addition on proteins involved in the synthesis of new proteins in *Prochlorococcus* sp. SS120 at 24 h. The increase or decrease of the expression of

Accession	Description	Absolute quantification (fmol/ μ L)				Expression Up/down
		Avg C	Std	Avg G	Std	
Q7V9Y3	30S ribosomal protein S13	0	0	6.33	1.4	Up
Q7VAU5	30S ribosomal protein S16	0	0	3.92	0.59	Up
Q7V9F9	30S ribosomal protein S6	0	0	8.23	3.95	Up
Q7V9W9	50S ribosomal protein L16	0	0	13.01	0.51	Up
Q7V9X6	50S ribosomal protein L32	0	0	6.68	0.41	Up
Q7V9J9	50S ribosomal protein L9	0	0	4.9	0.49	Up
Q7VA22	Transcription elongation factor NusA	0	0	6.56	0.87	Up
Q7V9Y8	50S ribosomal protein L13	29.98	2.53	35.23	1.01	Up
Q7VA04	Elongation factor G	27.44	5.86	47.16	2.25	Up
Q7V9W5	50S ribosomal protein L2	23.99	2.48	30.21	1.97	Up
Q7V9X2	50S ribosomal protein L14	21.2	4.63	27.58	1.02	Up
Q7VA74	Probable 30S ribosomal protein PSRP 3	9.85	1.9	13.35	0.91	Up

protein in presence of glucose is represented with up and down.

Figure 51 shows a comparison between mean protein concentrations of control and glucose addition. The points above the line are the proteins that increased the concentration in presence of glucose; and below the line are the proteins that increased the concentration of protein in the control samples.

Because of the values are represented in log scale, the values located on the abscissa axis when x is equal to 0 and in the ordinate axis when y is equal to 0 could not be represented. These values belong to the proteins identified only in the presence of glucose (abscissa axis) or only in the control condition (ordinate axis).

There are proteins that only appear in a condition (control or glucose) but could be present in both. The reason is that very abundant proteins do not allow to see

the changes of those comparatively less abundant.

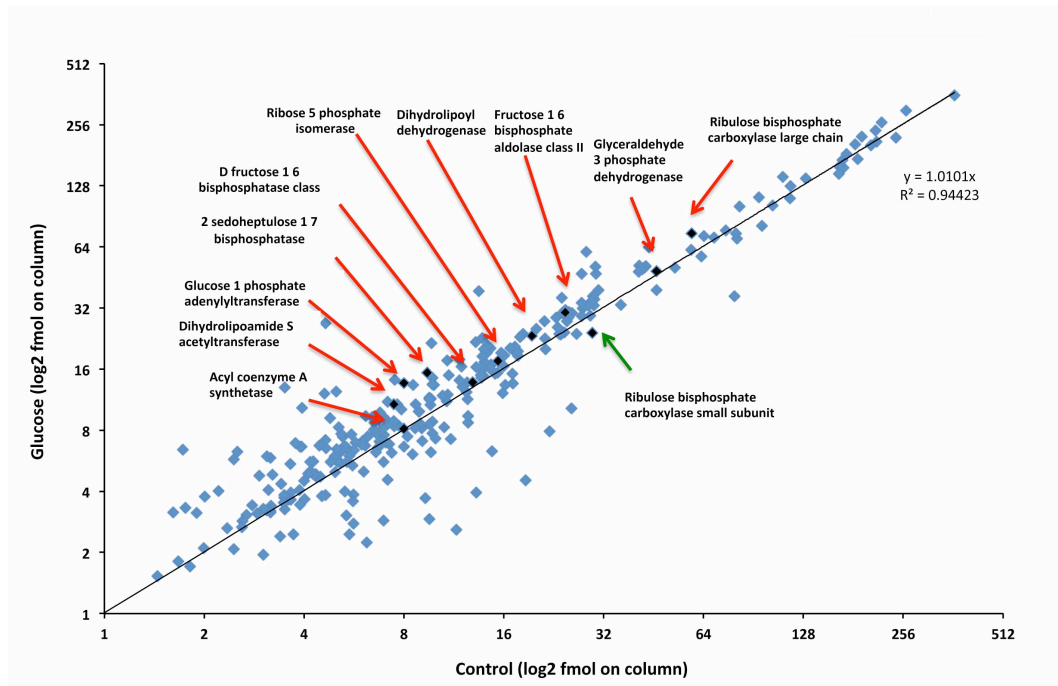


Figure 51. Comparative study of the main proteins in control and glucose cultures.

Comparing the results of proteomics vs gene expression, there was no correlation in some cases; for example, in the case of the enzymes glucose 1-phosphate adenyltransferase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase and transaldolase, whose gene expression remained unchanged at 24 h, while their concentration increased. However, it is not the first time in *Prochlorococcus* that post-transcriptional or post-translational modifications have been observed (Gómez-Baena *et al.*, 2001, Gómez-Baena *et al.*, 2006, Gómez-Baena *et al.*, 2002, Macdonagh *et al.*, 2012). This might help to explain the apparent lack of correlation in proteomics vs gene expression results.

All of our results are being contrasted with new experiments and analysed with a mass spectrometer more sensitive than the *Synapt* systems, called *Q-Exactive Ion Flight* (Thermo Fisher Scientific). Preliminary results with the *Q-Exactive*, allowed the identification of Pro1404, which showed 1.29 fold increase in the presence of glucose. However, these results were obtained in very late stages of this PhD, and consequently they will be described in future publications.

3.3. Changes in some enzymes and metabolites

3.3.1. Effect of glucose addition on the glycogen content

A mutant of *glnB* (coding for the regulatory P_{II} protein) in *Synechococcus* PCC 6803 accumulates glycogen (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995a), indicating that P_{II} influences the regulation of glycogen levels in this organism. Moreover, in the MIT9313 and MED4 strains of *Prochlorococcus* during N starvation, enhanced transcription of the glycogen phosphorylase for glycogen degradation (*glgP*) and decreased expression for glycogen synthesis (*glgABC*) has been described (Tolonen *et al.*, 2006).

Therefore it is possible to think that the regulation of glycogen in *Prochlorococcus* may be influenced by P_{II}. The decrease of P_{II} in the presence of glucose could generate a signal that provokes the synthesis of glycogen, as shown in the gene expression and proteomic results for glucose 1-phosphate adenylyltransferase and P_{II}.

For this reason, we wanted to study the changes of some enzymes and metabolites in the presence of glucose to demonstrate the assimilation of the absorbed glucose, in order to complement the data obtained using gene expression and proteomic studies.

Glycogen is a major reserve carbohydrate in both prokaryotes and eukaryotes. It is α -D -(1 \rightarrow 4)-glucan polymer containing about 10% α -(1 \rightarrow 6)-branch linkages. Cyanobacteria and other bacteria are known to produce glycogen as their reserve carbohydrate. Three major enzymes, ADP-glucose pyrophosphorylase, glycogen synthase, and the branching enzyme, are involved in bacterial glycogen biosynthesis (Yoo *et al.*, 2002). The glycogen branching enzyme (GBE) plays a key role in determining glycogen structure by forming branch linkages. These three enzymes were tested in the database CYORF and are present in all the strains of *Prochlorococcus*.

To study the effect of glucose on the glycogen concentration, we used four different samples of *Prochlorococcus* sp. SS120 (low light adapted).

The results showed little changes in the concentration of glycogen in the presence of glucose (table 41).

Table 41. Effect of glucose addition on the glycogen content in *Prochlorococcus* sp. SS120.

Condition/Sample	Culture 1		Culture 2		Culture 3		Culture 4	
	dΔ/min	[Glyc] (μg/mL)	dΔ/min	[Glyc] (μg/mL)	dΔ/min	[Glyc] (μg/mL)	dΔ/min	[Glyc] (μg/mL)
Control without glucose	0.0178	10.31	0.0148	8.57	0.0130	7.53	0.0187	10.83
Culture + 1 μM glucose	0.0179	10.37	0.0172	9.96	0.0144	8.34	0.0159	9.21
Commercial glycogen 5 mg/mL	0.0932	53.99	0.0899	52	0.0801	46.40	0.0985	57.06

Table 41 shows some differences in glycogen concentration between the control and glucose conditions, but they were not significant. Furthermore, in one of the cultures, the concentration of glycogen in the presence of glucose was lower, so we could not observe a clear relation between the glucose and the glycogen content.

3.3.2 Effect of glucose addition on CO₂ production

A facultative photo- and chemoheterotroph, the unicellular cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. PCC 6714, assimilates glucose with the formation of CO₂ as the only major product (Pelroy et al., 1972). We wanted to study the assimilation of the glucose by *Prochlorococcus*. With that goal, we decided to test whether glucose addition might induce the release of CO₂ in *Prochlorococcus* cultures.

In this experiment, we used two strains of *Prochlorococcus*, SS120 and MED4, adapted to grow at depth and surface, respectively. As in the rest of experiments, we used a glucose concentration similar to that found in the oceans, 0.1 μM. After glucose addition, we measured the CO₂ release over time by gas chromatography. The areas of the chromatogram peaks were quantified using a calibration equation made with different volumes from atmosphere air. These results were plotted against time (Figure 52).

Figure 52 shows a decrease in the CO₂ released in the presence of glucose over time in two cultures of SS120, as well as the control. However, in the other two

cultures, the CO₂ increased. A possible explanation comes from the fact that the determined CO₂ concentrations were close to the detection limits of the system.

Another possible reason might be the possible contaminants present in *Prochlorococcus* sp. SS120; however these contaminants did not have any significant influence in the glucose uptake studies (see section 1.4.1 of Results and Discussion).

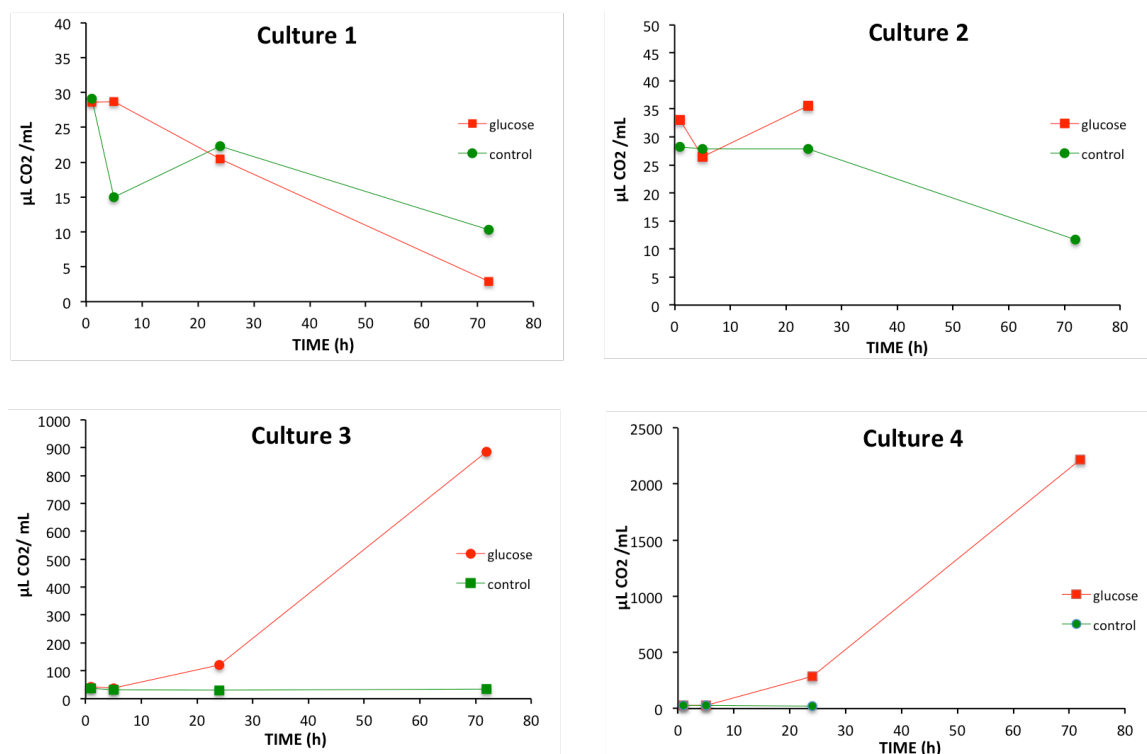


Figure 52. Effect of glucose addition on the CO₂ production in different cultures of *Prochlorococcus* sp. SS120. 2 L of culture were used for each condition. The volume of air analysed and injected into the gas chromatography was 500 μL in all the cultures.

To try to discard the possible influence of the contaminants in our results, we used four cultures of *Prochlorococcus* sp. MED4, which were amended with kanamycin to avoid the growth of contaminants, since this strain has been reported to be naturally resistant to kanamycin (Tolonen et al., 2006). As in the case of the strain

SS120, we used four different samples of *Prochlorococcus* sp. MED4. The results are shown in figure 53.

We could observe an increase of CO₂ over time only in one of the MED4 cultures. In the rest of the cultures, the released CO₂ decreased, as well as in the control. Therefore, we could not observe a clear relationship between the added glucose and the CO₂ produced in the cultures of *Prochlorococcus*. Although there were clear CO₂ increases in some cases (cultures 3 and 4 of SS120, culture 2 of MED4), the lack of reproducibility prevents us from reaching any significant conclusion. Therefore we intend to further study this possibility in future studies.

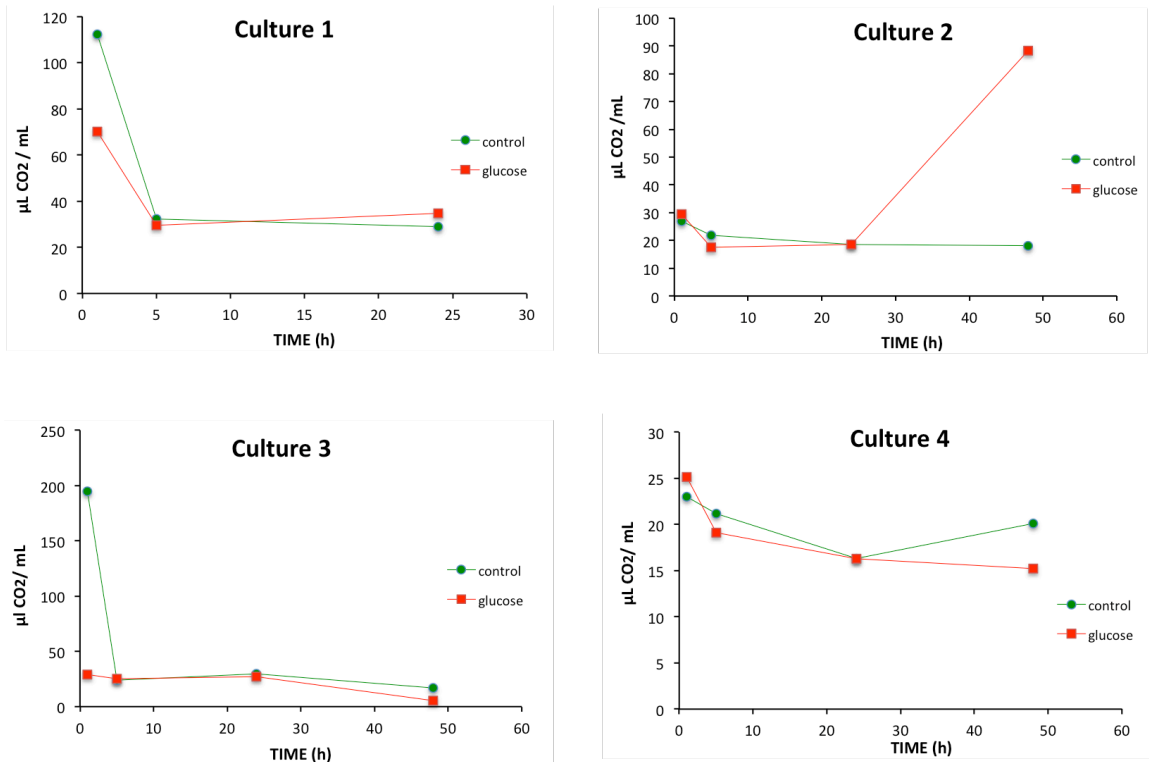


Figure 53 . Effect of glucose addition on the CO₂ production in different cultures of *Prochlorococcus* sp. MED4. To discard the possible influence of the contaminants were added 100 μg/mL of kanamycin to each culture. 2 L of culture were used for each condition. The volume of air analysed and injected into the gas chromatography was 500 μL in all the cultures.

CONCLUSIONS

1. The gene Pro1404, annotated as *melB*, encodes a glucose transporter in *Prochlorococcus*.
2. The Pro1404 transporter shows a multiphasic kinetic with a high affinity K_s constant for glucose which is the lowest described thus far in any microorganism.
3. *Prochlorococcus* takes up glucose at nanomolar concentrations in the ocean.
4. *Prochlorococcus* is a primary producer capable of tuning their metabolism to energetically benefit from environmental conditions.
5. Approximately 3% of total glucose uptake in the open ocean is carried out by *Prochlorococcus*, and it might contribute up to 1/6 of the total carbon incorporated by this organism.
6. Our proteomic and gene expression studies indicate that *Prochlorococcus* maintains the photosynthetic machinery functional in the presence of glucose, using the sugar as an extra source for energy and carbon.

BIBLIOGRAPHY

- Ahlgren, N., G. Rocap & S. Chisholm, (2006) Measurement of *Prochlorococcus* ecotypes using real-time polymerase chain reaction reveals different abundances of genotypes with similar light physiologies. *Environ. Microbiol.* **8**: 441-454.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. Lipman, (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amann, R.L., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux & D.A. Stahl, (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- Ammerman, J.W. & F. Azam, (1985) Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: A novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* **227**: 1338-1340.
- Amon, R. & R. Benner, (1994) Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* **369**: 549-552.
- Anderson, S. & L. McIntosh, (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* **173**: 2761-2767.
- Antia, N., P. Harrison & L. Oliveira, (1991) The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* **30**: 1-89.
- Arrigo, K., (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349-355.
- Atsumi, S., W. Higashide & J. Liao, (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* **27**: 1177-1180.
- Azam, F. & R. Hodson, (1981) Multiphasic kinetics for D-glucose uptake by assemblages of natural marine-bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **6**: 213-222.
- Barber, R.T., (1968) Dissolved organic carbon from deep water resists microbial oxidation. *Nature* **220**: 274-275.
- Beauclerk, A. & A. Smith, (1978) Transport of D-glucose and 3-O-methyl-D-glucose in the cyanobacteria *Aphanocapsa* 6714 and *Nostoc* strain Mac. *Eur. J. Biochem.* **82**: 187-197.
- Beck, C., H. Knoop, I.M. Axmann & R. Steuer, (2012) The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* **13**: 1-17.
- Benner, R., (2002) Chemical composition and reactivity In D.A. Hansell and C.A. Carlson (eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 59-90.
- Benner, R., J.D. Pakulski, M. McCarthy, J.I. Hedges & P.G. Hatcher, (1992) Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* **255**: 1561-1564.
- Berges, J. & P. Harrison, (1995) Nitrate reductase-activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady-state light

- limitation - A revised assay and characterization of the enzyme in 3 species of marine-phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 82-93.
- Beudeker, R., G.C. Cannon, J. Kuenen & J. Shively, (1980) Relations between RuBP carboxylase, carboxysomes and CO₂ fixing capacity in the obligate chemolithotroph *Thiobacillus neapolitana* grown under different limitations in the chemostat. *Arch. Microbiol.* **1241**: 185-189.
- Birnboim, H.C. & J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1513-1523.
- Bjorkman, K.M., A.L. Thomson-Bulldis & D.M. Karl, (2000) Phosphorus dynamics in the North Pacific subtropical gyre. *Aquat. Microb. Ecol.* **22**: 185-198.
- Bouman, H., O. Ulloa, D. Scanlan, K. Zwirgmaier, W. Li, T. Platt, V. Stuart, R. Barlow, O. Leth, L. Clementson, V. Lutz, M. Fukasawa, S. Watanabe & S. Sathyendranath, (2006) Oceanographic basis of the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. *Science* **312**: 918-921.
- Bradford, M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brand, L., W.C. Sunda & R. Guillard, (1983) Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 1182-1195.
- Bronk, D., (2002) Dynamics of DON. In D.A. Hansell and C.A. Carlson (eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 153-249.
- Bruland, K., (1980) Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel, and copper in the North Pacific. *Earth and Planetary Sciences Letters* **47**: 176-198.
- Bruland, K., J. Donat & D. Hutchins, (1991) Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1555-1577.
- Bruland, K. & M.C. Lohan, (2004) Controls of trace metals in seawater. In H.D. Holland and K.K Turekian (eds.), *Treatise on Geochemistry* **6**: 23-47.
- Bryant, D.A., (1995) *Advance in Photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria*. Department of Plant Biology, University of Illinois, Urbana, Illinois, U.S.A.
- Buat-Ménard, P., H. Cachier & R. Chesselet, (1989) Sources of particulate carbon in the marine atmosphere. In J.P. Riley and R. Chester, eds., *Chemical Oceanography*. Academic Press, London. **10**: 251-279.
- Bussmann, I. & G. Kattner, (2000) Distribution of dissolved organic carbon in the central Arctic Ocean: the influence of physical and biological properties. *J. Marine Sys.* **27**: 209-219.

- Cai, Y. & C. Wolk, (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* **172**: 3138-3145.
- Capone, D., (2000) The marine microbial nitrogen cycle. In: Microbial ecology of the oceans. D. Kirchman (ed). New York: Wiley-Liss, Inc., pp. 455-493.
- Capone, D., R. Popa, B. Flood & K. Nealson, (2006) Follow the nitrogen. *Science* **312**: 708-709.
- Carlson, D.J., L.M. Mayer, M.L. Brann & T.H. Mague, (1985) Binding of monomeric organic compounds to macro-molecular dissolved organic matter in seawater. *Mar. Chem.* **16**: 141-153.
- Caron, D.A. & J.C. Goldman, (1990) Protozoan nutrient regeneration. In G.M. Capriula, ed., *Ecology of Marine Protozoa*. Oxford University Press, New York: 283-306.
- Cauwel, G., (2002) DOM in the coastal zone. In D.A. Hansell and C.A. Carlson (eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 579-609.
- Chase, Z. & N.M. Price, (1997) Metabolic consequences of iron deficiency in heterotrophic marine protozoa. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1673-1684.
- Chen, T.H., T.L. Chen, L.M. Hung & T.C. Huang, (1991) Circadian-rhythm in amino acid uptake by *Synechococcus* RF-1. *Plant Physiol.* **97**: 55-59.
- Chisholm, S., S. Frankel, R. Goericke, R. Olson, B. Palenik, J. Waterbury, L. Westjohnsrud & E. Zettler, (1992) *Prochlorococcus marinus* nov genov sp - An oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. *Arch. Microbiol.* **157**: 297-300.
- Chisholm, S., R. Olson, E. Zettler, R. Goericke, J. Waterbury & N. Welschmeyer, (1988) A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**: 340-343.
- Church, M., H. Ducklow & D.M. Karl, (2004) Light dependence of [3H]-Leucine incorporation in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4079-4087.
- Church, M., H. Ducklow, R. Letelier & D.M. Karl, (2006) Temporal and vertical dynamics in picoplankton photoheterotrophic production in the subtropical North Pacific ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **45**: 41-53.
- Cifuentes Lemus, J.L., P. Torres García & M.M. Frías, (2003) *El océano y sus recursos. III. Las ciencias del mar: oceanografía física, matemáticas e ingeniería*. México.
- Coleman, M., M. Sullivan, A. Martiny, C. Steglich, K. Barry, E. Delong & S. Chisholm, (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* **311**: 1768-1770.
- Cottrell, M.T. & D.L. Kirchman, (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1692-1697.

- Cullen, J., (1982) The deep chlorophyll maximum: comparing vertical profiles of chlorophyll a. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 791-803.
- Degani, H. & G. Elgavish, (1978) Ionic permeabilities of membranes: ²³Na and ⁷Li NMR studies of ion transport across the membrane of phosphatidylcholine vesicles. *FEBS Lett.* **90**: 357-360.
- del Giorgio, P.A. & C. Duarte, (2002) Respiration in the open ocean. *Nature* **420**: 379-384.
- Dennis, J., S. BT, D. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. Lane & R. Lempicki, (2003) "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery". *Gen.Biol* **4**: P3.
- Dittmar, T. & G. Kattner, (2003) The biogeochemistry of the river and shelf ecosystem of the Arctic Ocean: A review. *Mar. Chem.* **83**: 103-120.
- Dore, J.E. & D.M. Karl, (1996) Nitrite distributions and dynamics at Station ALOHA. *Deep-Sea Research II* **43**: 385-402.
- Dortch, Q., (1982) Effect of growth condition on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **61**: 243-264.
- Duarte, C., A. Regaudie-de-Gioux, J.M. Arrieta, A. Delgado-Huertas & S. Agustí, (2013) The oligotrophic ocean is heterotrophic. *Annu.Rev.Mar.Sci* **5**: 551-569.
- Ducat, D., J. Way & P. Silver, (2011) Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* **29**: 95-103.
- Ducklow, H., (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. D.L. Kirchman (ed). New York: Willey-Liss, pp. 85-120.
- Ducklow, H. & S.C. Doney, (2013) What is the metabolic state of the oligotrophic ocean? A debate. *Annu.Rev.Mar.Sci* **5**: 525-533.
- Dufresne, A., L. Garczarek & F. Partensky, (2005) Accelerated evolution associated to genome reduction in a free-living prokaryote. *Gen.Biol* **6**: R14.
- Dufresne, A., M. Ostrowski, D. Scanlan, L. Garczarek, S. Mazard, B. Palenik, I. Paulsen, N. Tandeau de Marsac, P. Wincker, C. Dossat, S. Ferriera, J. Johnson, A. Post, W. Hess & F. Partensky, (2008) Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria. *Gen.Biol* **9**: R90.
- Dufresne, A., M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M. Galperin, E. Koonin, F. Le Gall, K. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I. Rogozin, D. Scanlan, N. Tandeau de Marsac, J. Weissenbach, P. Wincker, Y. Wolf & W. Hess, (2003) Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 10020-10025.
- Duursma, E.K., (1965) The dissolved organic constituents of seawater. In *Chemical oceanography, v.l. Academic, New York, N.Y.* 433-475.

- Eadie, G.S., (1952) On the evaluation of the constants V_{max} and K_m in enzyme reactions. *Science* **116**.
- Eberlein, K., K.D. Hammer, U.H. Brockmann & G. Kattner, (1983) Dynamics of carbohydrate development in tank experiments with cultures of *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira rotula*. In: Sundermann, J., Lenz, E. (ed.) *North Sea dynamics*. Springer, Berlin: 549-558.
- Eiler, A., (2006) Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7431-7437.
- Eisenman, G., B. Neumcke & E. Bamberg, (1975) *The action of uncouplers on lipid bilayer membranes*. Dekker, New York.
- El Alaoui, S., J. Diez, L. Humanes, F. Toribio, F. Partensky & J. García-Fernández, (2001) *In vivo* regulation of glutamine synthetase activity in the marine chlorophyll *b*-containing cyanobacterium *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511 (Oxyphotobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2202-2207.
- Elhai, J. & C.P. Wolk, (1998) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**: 747-754.
- Eppley, R.W. & B.J. Peterson, (1979) Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* **282**: 677-680.
- Ernst, A., H. Kirschenlohr, J. Diez & P. Böger, (1984) Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **140**: 120-125.
- Falkowski, P. & R.J. Scholes, (2000) The global carbon cycles: a test of our knowledge of earth as a system. *Science* **290**: 291-296.
- Falkowski, P.G., R.M. Green & R.J. Geider, (1992) Physiological limitations on phytoplankton productivity in the ocean. *Oceanography* **5**: 84-91.
- Feng, X., A. Bandyopadhyay, B. Berla, L. Page, B. Wu, H. Pakrasi & J. Tang, (2010) Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothece* sp. ATCC 51142 under continuous light. *Microbiology* **156**: 2566-2574.
- Ferrier-Pagès, C., M. Karner & F. Rassoulzadegan, (1998) Release of dissolved amino acids by flagellates and ciliates grazing on bacteria. *Oceanol. Acta* **21**: 485-494.
- Ferris, M. & B. Palenik, (1998) Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature* **396**: 226-228.
- Flombaum, P., J.L. Gallegos, R.A. Gordillo, J. Rincón, L.L. Zabala, N. Jiao, D.M. Karl, W.K.W. Li, M.W. Lomas, D. Veneziano, C.S. Vera, J.A. Vrugt & A.C. Martiny, (2013) Present and future global distributions of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 9824-9829.
- Florencio, F. & J. Reyes, (2002) Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. In: Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon Metabolism. C. Foyer & G. Noctor (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 93-113.

- Flores, E. & G. Schmetterer, (1986) Interaction of fructose with the glucose permease of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **166**: 693-696.
- Flynn, K., M. Fasham & C. Hipkin, (1997) Modelling the interactions between ammonium and nitrate uptake in marine phytoplankton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352**: 1625-1645.
- Fogg, G.E., (1983) The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* **26**: 3-14.
- Forchhammer, K., (1999) *The PII protein in Synechococcus PCC 7942 senses and signals 2-oxoglutarate under ATP-replete conditions.* Kluwer Academic Publisher.
- Forchhammer, K., (2004) Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 319-333.
- Forchhammer, K. & N. Tandeau de Marsac, (1995a) Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **177**: 2033-2040.
- Forchhammer, K. & N. Tandeau de Marsac, (1995b) Phosphorylation of the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5812-5817.
- Franche, C. & T. Damerval, (1988) Tests on Nif Probes and DNA Hybridizations. *Methods Enzymol.* **167**: 803-808.
- García-Fernández, J. & J. Diez, (2004) Adaptive mechanisms of the nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. *Res. Microbiol.* **155**: 795-802.
- García-Fernández, J., N. Tandeau de Marsac & J. Diez, (2004) Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 630-638.
- García-Pichel, F., (1998) Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins Life Evol. Biosph.* **28**: 321-347.
- García-Pichel, F., J. Belnap, S. Neuer & F. Schanz, (2003) Estimates of cyanobacterial biomass and its distribution. *Algol. Stud* **109**: 213-228.
- García-Pichel, F. & O. Pringault, (2001) Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* **413**: 380-381.
- García-Ruiz, J.M., S.T. Hyde, A.M. Carnerup, A.G. Christy, M.J. Van Kranendonk & N.J. Welham, (2003) Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science* **302**: 1194-1197.
- Garczarek, L., W. Hess, J. Holtzendorff, G. van der Staay & F. Partensky, (2000) Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4098-4101.

- Goericke, R., R. Olson & A. Shalapyonok, (2000) A novel niche for *Prochlorococcus* sp. in low-light suboxic environments in the Arabian Sea and the Eastern Tropical North Pacific. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **47**: 1183-1205.
- Goericke, R. & D. Repeta, (1992) The pigments of *Prochlorococcus marinus* - The presence of divinyl chlorophyll-A and chlorophyll-B in a marine prokaryote. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 425-433.
- Goericke, R. & N. Welschmeyer, (1993) The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **40**: 2283-2294.
- Gómez-Baena, G., J. Diez, J. García-Fernández, S. El Alaoui & L. Humanes, (2001) Regulation of glutamine synthetase by metal-catalyzed oxidative modification in the marine oxyphotobacterium *Prochlorococcus*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Sub.* **1568**: 237-244.
- Gómez-Baena, G., J. García-Fernández, A. Lopez-Lozano, F. Toribio & J. Diez, (2006) Glutamine synthetase degradation is controlled by oxidative proteolysis in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**: 930-940.
- Gómez-Baena, G., L. Humanes, S. El Alaoui, J. Garcia-Fernandez & J. Diez, (2002) Modificación oxidativa de la glutamina sintetasa de *Prochlorococcus*. In: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Biología Molecular a la Agronomía. P. Aparicio Tejo, C. Arrese-Igor Sánchez, C. González Murua, C. Lamsfus Arrien, M. Llama Fontal, A. Muñoz Rueda, M. Royuela Hernando & J. Serra Ferrer (eds). Pamplona: Universidad Pública de Navarra, pp. 145-153.
- Gómez-Baena, G., A. López-Lozano, J. Gil-Martínez, J. Lucena, J. Diez, P. Candau & J. García-Fernández, (2008) Glucose uptake and its effect on gene expression in *Prochlorococcus*. *PLoS. ONE* **3**: e3416.
- Gould, R., (1987) The deep chlorophyll maximum in the world ocean: a review. *The Biologist* **66**: 4-13.
- Grace, K.S., K.S. Deborah & A.B. Deborah, (2011) The relative importance of sloppy feeding, excretion, and fecal pellet leaching in the release of dissolved carbon and nitrogen by *Acartia tonsa* copepods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **404**: 47-56.
- Grodberg, J. & J.J. Dunn, (1988) *ompT* encodes the *Escherichia Coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245-1253.
- Guillard, R. & P.J. Wangersky, (1958) The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnol. Oceanogr.* **3**: 449-454.
- Haehnel, W. & A. Trebst, (1982) Localization of electron transport inhibition in plastoquinone reactions. *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**: 181-190.
- Hamilton, R. & M. Nilsen-Hamilton, (1980) Conversion of monensin from an ionophore to an inhibitor of Na⁺ uptake by SV3T3 membrane vesicles

- as a function of Na⁺ concentration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 140-147.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hansell, D.A., (2002) DOC in the global ocean carbon cycle. In D.A. Hansell and C.A. Carlson (eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 685-715.
- Hansell, D.A., C.A. Carlson, D. Repeta & R. Schlitzer, (2009) Dissolved organic matter in the ocean. *Oceanography* **22**: 202-211.
- Harrison, J.A., (2003) El ciclo carbónico: siempre de ida y vuelta. In: Vision learning Vol. EAS-2 (3s). pp.
- Hartmann, M., C. Grob, G.A. Tarran, A.P. Martin, P.H. Burkill, D.J. Scanlan & M.V. Zubkov, (2011) Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 5756-5760.
- Hartnett, H., R. Keil, J. Hedges & A. Devol, (1998) Influence of oxygen exposure. Time on organic carbon preservation in continental margin sediments. *Nature* **391**: 572-574.
- Heber, U., (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth. Res.* **73**: 223-231.
- Hedges, J., J. Baldcock, Y. Gélinas, C. Lee, M. Peterson & S. Wakeham, (2001) Evidence for non-selective preservation of organic matter in sinking marine particles. *Nature* **409**: 801-804.
- Hess, W., F. Partensky, G. Van der Staay, J. García-Fernández, T. Börner & D. Vaultot, (1996) Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 11126-11130.
- Hess, W., G. Rocap, C. Ting, F. Larimer, S. Stilwagen, J. Lamerdin & S. Chisholm, (2001) The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. *Photosynth. Res.* **70**: 53-71.
- Hess, W.R., (2011) Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 608-614.
- Hilgenfeld, R. & W. Saenger, (1982) Structural chemistry of natural and synthetic ionophores and their complexes with cations. *Top. Curr. Chem.* **101**: 1-82.
- Hilton, D.R., T.P. Fischer & B. Marty, (2002) Noble gases and volatile recycling at subduction zones. *Rev. Mineral. Geochem* **47**: 319-370.
- Hodson, R.E., A. Carlucci & F. Azam, (1979) Glucose transport in a low nutrient bacterium. *Abstract, 79th Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol. Los Angeles, USA.*
- Hoffman, L., (1999) Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *Eur. J. Phycol.* **34**: 371-379.
- Hoftsee, B.H.J., (1952) On the evaluation of the constants V_{max} and K_m in enzyme reactions. *Science* **116**: 329-331.

- Holtzendorff, J., D. Marie, A. Post, F. Partensky, A. Rivlin & W. Hess, (2002) Synchronized expression of *ftsZ* in natural *Prochlorococcus* populations of the Red Sea. *Environ. Microbiol.* **4**: 644-653.
- Holtzendorff, J., F. Partensky, D. Mella, J.F. Lennon, W.R. Hess & L. Garczarek, (2008) Genome streamlining results in loss of robustness of the circadian clock in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* PCC 9511. *J. Biol. Rhythms* **23**: 187-199.
- Hopfer, U., A. Lehninger & T. Thompson, (1968) Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**: 484-490.
- Houghton, J.T., G.J. Jenkins & J. Ephraums, (1990) *Climate Change: IPCC Scientific Assessment. Report prepared for Intergovernmental Panel on Climate Change by working Group I*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, New York, Ny, USA and Melbourne, Australia.
- Hulthe, G., S. Hulth & P. Hall, (1998) Effect of oxygen on degradation rate of refractory and labile organic matter in continental margin sediments. *Geochim. Cosmoch. Acta* **62**: 1319-1328.
- Irmeler, A., T. Sanner, H. Dierks & K. Forchhammer, (1997) Dephosphorylation of the phosphoprotein PII in *Synechococcus* PCC 7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate regulated phosphatase activity. *Mol. Microbiol.* **26**: 81-90.
- Ish-Horowicz & B. J.F, (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2898.
- Ittekkot, V., U. Brockmann, W. Michaelis & E.T. Degens, (1981) Dissolved free and combined carbohydrates during a phytoplankton bloom in the northern North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **4**: 299-305.
- Jameson, E., I. Joint, N. Mann & M. Mühling, (2008) Application of a novel *rpoC1*-RFLP approach reveals that marine *Prochlorococcus* populations in the atlantic gyres are composed of greater microdiversity than previously described. *Microb. Ecol.* **55**: 141-151.
- Jardillier, L., M.V. Zubkov, J. Pearman & D.J. Scanlan, (2010) Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *ISME J.* **4**: 1180-1192.
- Jenkinson, I.R. & B.A. Biddanda, (1995) Bulk- phase viscoelastic properties of seawater: relation-ship with plankton components. *J. Plankton Res.* **17**: 2251-2274.
- Jensen, L.M., (1983) phytoplankton release of extracellular organic carbon, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 39-48.
- Johnson, Z., E. Zinser, A. Coe, N. McNulty, E. Woodward & S. Chisholm, (2006) Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* **311**: 1737-1740.
- Jones, D., D.M. Karl & E.A. Laws, (1996) Growth rates and production of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the North Pacific subtropical gyre. *Deep-Sea Research* **43**: 1567-1580.

- Joset, F., C. Buchou, C. Zhang & R. Jeanjean, (1988) Physiological and genetic analysis of the glucose-fructose permeation system in two *Synechocystis* species. *Arch. Microbiol.* **149**: 417-421.
- Kamennaya, N.A., M. Chernihovsky & A.F. Post, (2008) The cyanate utilization capacity of marine unicellular Cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 2485-2494.
- Kamennaya, N.A. & A.F. Post, (2011) Characterization of cyanate metabolism in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 291-301.
- Karl, D.M. & G. Tien, (1992) MAGIC-a sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 105-116.
- Kettler, G., A. Martiny, K. Huang, J. Zucker, M. Coleman, S. Rodrigue, F. Chen, A. Lapidus, S. Ferreira, J. Johnson, C. Steglich, G. Church, P. Richardson & S. Chisholm, (2007) Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genet.* **3**: 2515-2528.
- Kiene, R., L.J. Linn & J.A. Bruton, (2000) New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *J. Sea Res.* **43**: 209-224.
- Killops, S. & V. Killops, (1993) An introduction to organic geochemistry. *Harlow: Longman Scientific & Technical*: 265.
- Kirchman, D.L., R.G. Keil & P.A. Wheeler, (1989) The effect of amino acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the arctic Pacific. *Deep-Sea Research I* **36**: 1763-1776.
- Kirchman, D.L. & P.A. Wheeler, (1998) Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Arctic Pacific. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **45**: 347-365.
- Knoll, A., (2008) Cyanobacteria and Earth History. In: *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics, and Evolution.* A. Herrero & E. Flores (eds). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp.
- Knoop, H., Y. Zilliges, W. Lockau & R. Steuer, (2010) The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth. *Plant Physiol.* **154**: 410-422.
- Kurian, D., T. Jansen & P. Maenpaa, (2006) Proteomic analysis of heterotrophy in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **6**: 1483-1494.
- Kuypers, M., A. Sliemers, G. Lavik, M. Schmid, B. Jørgensen, J. Kuenen, J. Sdamsté, M. Strous & M. Jetten, (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**: 608-611.
- La Roche, J., G. van der Staay, F. Partensky, A. Ducret, R. Aebersold, R. Li, S. Golden, R. Hiller, P. Wrench, A. Larkum & B. Green, (1996) Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll *a/b* light-harvesting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 15244-15248.
- Labarre, J., F. Chauvat & P. Thuriaux, (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the

- cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **171**: 3449-3457.
- Lampert, W., (1978) Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 831-834.
- Lancelot, C., (1984) Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the southern bight of the north sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **18**: 65-77.
- Landing, W. & K. Bruland, (1987) The contrasting biogeochemistry of iron and manganese in the Pacific Ocean. *Geochim. Cosmoch. Acta* **51**: 29-43.
- Laurent, S., H. Chen, S. Bedu, F. Ziarelli, L. Peng & C. Zhang, (2005) Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Lazarus, D., B. Bittniok, L. Diester-Haass, P. Meyer & K. Billups, (2006) Comparison of radiolarian and sedimentologic paleoproductivity proxies in the latest Miocene-Recent Benguela Upwelling System. *Mar. Micropaleontol.* **60**: 269-294.
- Lee-Kaden, J. & W. Simonis, (1982) Amino acid uptake and energy coupling dependent on photosynthesis in *Anacystis nidilans*. *J. Bacteriol.* **151**: 229-236.
- Li, R. & S. Golden, (1993) Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 11678-11682.
- Li, W., (1994) Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eukaryotic ultraphytoplankton - Measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 169-175.
- Lichtle, C., J. Thomas, A. Spilar & F. Partensky, (1995) Immunological and ultrastructural characterization of the photosynthetic complexes of the prochlorophyte *Prochlorococcus* (Oxychlorobacteria). *J. Phycol.* **31**: 934-941.
- Lindell, D. & A. Post, (2001) Ecological aspects of *ntcA* gene expression and its use as an indicator of the nitrogen status of marine *Synechococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3340-3349.
- Longhurst, A.R., (1995) Seasonal cycles of pelagic production and consumption. *Prog. Oceanogr.* **36**: 77-167.
- López-Lozano, A., (2007) Caracterización y regulación fisiológica de la isocitrato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* sp. In: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba: Universidad de Córdoba, pp. 154.
- López-Lozano, A., J. Diez, S. El Alaoui, C. Moreno-Vivián & J. García-Fernández, (2002) Nitrate is reduced by heterotrophic bacteria but not transferred to *Prochlorococcus* in non axenic cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 151-160.

- Luque, I., M. Riera-Alberola, A. Andujar & J. Ochoa de Alda, (2008) Intraphylum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 2369-2389.
- Lytle, C. & E. Perdue, (1981) Free, proteinaceous, and humic-bound amino acids in river water containing high concentrations of aquatic humus. *Environ. Sci. Technol.* **15**: 224-228.
- Ma, W. & H. Mi, (2008) Effect of exogenous glucose on the expression and activity of NADPH dehydrogenase complexes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 775-779.
- Macdonagh, B., M.A. Domínguez-Martín, G. Gómez-Baena, A. López-Lozano, J. Diez & J.A. Bárcena, (2012) Nitrogen starvation induces extensive changes in the redox proteome of *Prochlorococcus* sp. SS120. *Environ. Microbiol. Rep* **4**: 257-267.
- Mackinney, G., (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**: 315-322.
- Malmstrom, R., A. Coe, G. Kettler, A. Martiny, J. Frias-Lopez, E. Zinser & S. Chisholm, (2010) Temporal dynamics of *Prochlorococcus* ecotypes in the Atlantic and Pacific oceans. *ISME Journal* **4**: 1252-1264.
- Malmstrom, R.R., R. Kiene, M. Vila & K.L. Kirchman, (2005) Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) assimilation by *Synechococcus* in the Gulf of Mexico and northwest Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **50**: 1924-1931.
- Marie, D., F. Partensky, S. Jacquet & D. Vaultot, (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain Sybr Green-I. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 186-193.
- Martiny, A., M. Coleman & S. Chisholm, (2006) Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: evidence for genome-wide adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 12552-12557.
- Martiny, A., S. Kathuria & P. Berube, (2009) Widespread metabolic potential for nitrite and nitrate assimilation among *Prochlorococcus* ecotypes. *Microbiology (Read.)* **106**: 10787-10792.
- Mary, I., L. Garczarek, G. Tarran, C. Kolowrat, M. Terry, D. Scanlan, P. Burkill & M. Zubkov, (2008a) Diel rhythmicity in amino acid uptake by *Prochlorococcus*. *Environ. Microbiol.* **10**: 2124-2131.
- Mary, I., G. Tarran, P. Warwick, M. Terry, D. Scanlan, P. Burkill & M. Zubkov, (2008b) Light enhanced amino acid uptake by dominant bacterioplankton groups in surface waters of the Atlantic Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 36-45.
- McAllister, C.D., T.R. Parsons, K. Stephens & J.D.H. Strickland, (1961) Measurements of primary production in coastal sea water using a large-volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* **3**: 237-258.

- Michelou, V., M. Cottrell & D. Kirchman, (2007) Light-Stimulated bacterial production and amino acid assimilation by cyanobacteria and other microbes in the North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5539-5546.
- Milessi, A., J. Sellanes, V. Gallardo & C. Langue, (2005) Osseous skeletal material and fish scales in marine sediments under the oxygen minimum zone off northern and central Chile. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **64**: 185-190.
- Mohamed, A. & C. Jansson, (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**: 693-700.
- Moller, E.F., (2007) Production of dissolved organic carbon by sloppy feeding in the copepods *Acartia tonsa*, *Centropages typicus*, and *Temora longicornis*. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 79-84.
- Moore, L. & S. Chisholm, (1999) Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* - Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 628-638.
- Moore, L., A. Coe, E. Zinser, M. Saito, M. Sullivan, D. Lindell, K. Frois-Moniz, J. Waterbury & S. Chisholm, (2007) Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnol. Oceanogr.* **5**: 353-362.
- Moore, L., R. Goericke & S. Chisholm, (1995) Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* - Influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **116**: 259-275.
- Moore, L., A. Post, G. Rocap & S. Chisholm, (2002) Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 989-996.
- Moore, L., G. Rocap & S. Chisholm, (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**: 464-467.
- Mühling, M., (2012) On the culture-independent assessment of the diversity and distribution of *Prochlorococcus*. *Environ. Microbiol.* **14**: 567-579.
- Muñoz-Marín, M.C., I. Luque, M.V. Zubkov, P.G. Hill, J. Diez & J.M. García-Fernández, (2013) *Prochlorococcus* can use the Pro1404 transporter to take up glucose at nanomolar concentrations in the Atlantic Ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 8597-8602.
- Muro-Pastor, M., J. Reyes & F. Florencio, (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* **276**: 38320-38328.
- Muro-Pastor, M., J. Reyes & F. Florencio, (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **83**: 135-150.
- Nagata, N., R. Tanaka, S. Satoh & A. Tanaka, (2005) Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and Implications for the Evolution of *Prochlorococcus* Species. *Plant Cell* **17**: 233-240.

- Nagata, T., (2000a) Production mechanism of dissolved organic matter. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, First Edition. D.M. Karl (ed). New York: Willey-Liss, pp. 121-152.
- Nagata, T., (2000b) Production mechanisms of dissolved organic matter. *Microbial Ecology of the Oceans*. Edited by David L. Kirchman: 121-152.
- Nagata, T., (2008) Organic matter-bacteria interactions in seawater. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, Second Edition. D.M. Karl (ed). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., pp. 207-232.
- Nagata, T. & D.L. Kirchman, (1991) Release of dissolved free and combined amino acids by bacterivorous marine flagellates. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 433-443.
- Nagata, T. & D.L. Kirchman, (1992) Release of dissolved organic matter by heterotrophic protozoa: Implications for microbial food webs. *Archiv.fur.Hydrobiol.Beih.Ergebn.Limnol* **35**: 99-109.
- Napolitano, M., M.A. Rubio, J. Santamaria-Gomez, E. Olmedo-Verd, N. Robinson & I. Luque, (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J. Bacteriol.* **194**: 2426-2436.
- Nieva, M. & E. Fernández Valiente, (1996) Inorganic carbon transport and fixation in cells of *Anabaena variabilis* adapted to mixotrophic conditions. *Plant Cell Physiol.*: 1.
- Niiler, (2001) *The global flow field*. In "ocean circulation and climate".
- Nissen, H., P. Nissen & F. Azam, (1984) Multiphasic Uptake of D-Glucose by an Oligotrophic Marine Bacterium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **16**: 155-160.
- Nissen, P. & J. Martín-Nieto, (1998) Multimodal kinetics: Cyanobacterial nitrate reductase and other enzyme, transport and binding systems. *Physiol. Plant* **104**: 503-511.
- Odum, H.T., (1956) Primary production in flowing waters. *Limnol. Oceanogr.* **1**: 102-117.
- Ogawa, H., Y. Amagai, I. Koike, K. Kaiser & R. Benner, (2001) Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science* **292**: 917-920.
- Ogawa, H. & E. Tanoue, (2003) Dissolved organic matter in oceanic waters. *Journal of Oceanography* **59**: 129-147.
- Olson, R., E. Zettler, M. Altabet, J. Dusenberry & S. Chisholm, (1990) Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **37**: 1033-1051.
- Osanai, T., Y. Kanesaki, T. Nakano, H. Takahashi, M. Asayama, M. Shirai, M. Kanehisa, I. Suzuki, N. Murata & K. Tanaka, (2005) Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2 sigma factor sigE. *J. Biol. Chem.* **280**: 30653-30659.

- Paerl, H., (2000) Marine plankton. In: The ecology of cyanobacteria. B. Whitton & M. Potts (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 121-148.
- Palenik, B., B. Brahmsha, F. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E. Webb & J. Waterbury, (2003) The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037-1042.
- Palinska, K., T. Jahns, R. Rippka & N. Tandeau de Marsac, (2000) *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology (Read.)* **146**: 3099-3107.
- Palinska, K.A., W. Laloui, S. Bedu, S. Loiseaux-De Goer, A. Castets, R. Rippka & N. Tandeau De Marsac, (2002) The signal transducer P_{II} and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. *Microbiology (Read.)* **148**: 2405-2412.
- Parkinson, J. & E. kofoid, (1992) Communication modules in bacterial signaling molecules. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Partensky, F., J. Blanchot & D. Vaultot, (1999a) Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. In: Marine cyanobacteria. L. Charpy & A. Larkum (eds). Monaco: Bulletin de l'Institut Océanographique, Numéro spécial, pp. 457-476.
- Partensky, F. & L. Garczarek, (2010) *Prochlorococcus*: Advantages and Limits of Minimalism. *Annu.Rev.Mar.Sci.*
- Partensky, F., W. Hess & D. Vaultot, (1999b) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 106-127.
- Partensky, F., N. Hoepffner, W. Li, O. Ulloa & D. Vaultot, (1993) Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean sea. *Plant Physiol. (Rockv.)* **101**: 285-296.
- Paz-Yepes, J., E. Flores & A. Herrero, (2009) Expression and mutational analysis of the *glnB* genomic region in the heterocyst-forming Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **191**: 2353-2361.
- Pelroy, R., R. Rippka & R. Stanier, (1972) Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **87**: 303-322.
- Pérez, V., E. Fernández, X.A.G. Morán & M.V. Zubkov, (2006) Vertical distribution of phytoplankton biomass, production and growth in the Atlantic subtropical gyres. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **53**: 1616-1634.

- Pernthaler, A., J. Pernthaler & R. Amann, (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* **68**: 3094-3101.
- Pfaffl, M., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Post, W.M., T.H. Peng, W.R. Emanuel, A.W. King, V.H. Dale & D.L. DeAngelis, (1990) The global carbon cycle. *Am. Sci.* **78**: 310-326.
- Quick, W., U. Schurr, K. Fichtner, E. Schulze, S. Rodermeil, L. Bogorad & M. Stitt, (1991) The impact of decreased RUBISCO on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense *rbcS*. *The Plant Journal* **1991**: 1.
- Quintana, N., F. Der Kooy, M. De Rhee, G. Voshol & R. Verpoorte, (2011) Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 471-490.
- Raboy, B. & E. Padan, (1978) Active transport of glucose and alpha-methylglucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* **253**: 3287-3291.
- Reddy, K., G. Bullerjahn & L. Sherman, (1993) Characteristics of membrane associated carotenoid binding proteins in cyanobacteria and prochlorophytes. *Methods Enzymol.* **214**: 390-401.
- Rich, J., H. Ducklow & D. Kirchman, (1996) Concentrations and uptake of neutral monosaccharides along 140°W in the equatorial Pacific: contribution of glucose to heterotrophic bacterial activity and the DOM flux. *Limnol. Oceanogr.* **41**: 595-604.
- Rich, P., S. Madgwick & D. Moss, (1991) The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. *Biochim. Biophys. Acta* **108**: 1188-1195.
- Riemann, L. & F. Azam, (2002) Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Appl. Environ. Microbiol* **68**: 5554-5562.
- Rippka, R., (1972) Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **87**: 93-98.
- Rippka, R., T. Coursin, W. Hess, C. Lichtlé, D. Scanlan, K. Palinska, I. Itean, F. Partensky, J. Houmard & M. Herdman, (2000) *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll *a₂/b₂*-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1833-1847.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & R. Stanier, (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol* **111**: 1-61.

- Robson, J. & R. Sutton, (2012) Causes of the rapid warming of the North Atlantic Ocean in the Mid-1990s *J. Climate* **25**: 4116-4134.
- Rocap, G., F. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. Hess, Z. Johnson, M. Land, D. Lindell, A. Post, W. Regala, M. Shah, S. Shaw, C. Steglich, M. Sullivan, C. Ting, A. Tolonen, E. Webb, E. Zinser & S. Chisholm, (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047.
- Rosgaard, L., A. De Porcellinis, J. Jacobsen, N. Frigaard & Y. Sakuragi, (2012) Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J. Biotechnol.* **162**: 134-147.
- Rubin, P.M., E. Zetooney & R.E. MCGowan, (1977) Uptake and Utilization of Sugar Phosphates by *Anabaena-Flos-Aquae*. *Plant Physiol.* **60**: 407-411.
- Ruiz-González, C., R. Simó, M. Vila-Costa, R. Sommaruga & J. Gasol, (2012) Sunlight modulates the relative importance of heterotrophic bacteria and picophytoplankton in DMSP- sulphur uptake. *ISME J.* **6**: 650-659.
- Rullkotter, J., (2006) Organic Matter: The driving force for early diagenesis. En: Schultz, H. and Zabel, M. (edit.). *Marine Geochemistry. Berlin: Springer*: 129-172.
- Rusch, D., A. Halpern, G. Sutton, K. Heidelberg, S. Williamson, S. Yooseph, D. Wu, J. Eisen, J. Hoffman, K. Remington, K. Beeson, B. Tran, H. Smith, H. Baden-Tillson, C. Stewart, J. Thorpe, J. Freeman, C. Andrews-Pfannkoch, J. Venter, K. Li, S. Kravitz, J. Heidelberg, T. Utterback, Y. Rogers, L. Falcon, V. Souza, G. Bonilla-Rosso, L. Eguarte, D. Karl, S. Sathyendranath, T. Platt, E. Bermingham, V. Gallardo, G. Tamayo-Castillo, M. Ferrari, R. Strausberg, K. Nealson, R. Friedman, M. Frazier & J. Venter, (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol.* **5**: e77.
- Rusch, D., A.C. Martiny, C.L. Dupont, A. Halpern & J. Venter, (2010) Characterization of *Prochlorococcus* clades from iron-depleted oceanic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 16184-16189.
- Sambrook, J. & D. Russell, (2001a) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J. & D.W. Russell, (2001b) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarmiento, J. & N. Gruber, (2006) Ocean Biogeochemical dynamics. *1st. ed. Princeton, Woodstock: Princeton University Press*: 503.

- Satoh, S. & A. Tanaka, (2006) Identification of chlorophyllide a oxygenase in the *Prochlorococcus* genome by a comparative genomic approach. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1622-1629.
- Scanlan, D., M. Ostrowski, S. Mazard, A. Dufresne, L. Garczarek, W. Hess, A. Post, M. Hagemann, I. Paulsen & F. Partensky, (2009) Ecological Genomics of Marine Picocyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**: 249-299.
- Schlee, J. & E. Komor, (1986) Ammonium uptake by *Chlorella*. *Planta (Berl.)* **168**: 232-238.
- Schmetterer, G., (1990) Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters. *Plant Mol. Biol.* **14**: 697-706.
- Schopf, J., (2000) The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. W.B.a.P. M (ed). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 13-35.
- Sharp, J., (1973) Size classes of organic carbon in sea water. *Limnol. Oceanogr.* **18**: 441-447.
- Sharp, J., (1977) Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.* **22**: 381-399.
- Sharp, J., (1983) The distributions of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. In: Nitrogen in the marine environment. E. Carpenter & D. Capone (eds). New York: Academic Press, pp. 1-35.
- Sherr, E. & B. Sherr, (1994) Bacterivory and herbivory - Key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb. Ecol.* **28**: 223-235.
- Shih, P., D. Wu, A. Latifi, S. Axen, D. Fewer, E. Talla, A. Calteau, F. Cai, N. Tandrau de Marsac, R. Rippka, M. Herdman, K. Sivonen, T. Coursin, T. Laurent, L. Goodwin, M. Nolan, K. Davenport, C. Han, E. Rubin, J. Eisen, T. Woyke, M. Gugger & C. Kerfeld, (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 1053-1058.
- Shimada, A., S. Kanai & T. Maruyama, (1995) Partial sequence of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the phylogeny of *Prochloron* and *Prochlorococcus* (Prochlorales). *J. Mol. Evol.* **40**: 671-677.
- Shoshan, V. & B.R. Selman, (1980) The relationship between light-induced adenine nucleotide exchange and ATPase activity in chloroplast thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **255**: 384-389.
- Sieburth, J., (1976) Bacterial substrates and productivity in marine ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **7**: 259-285.

- Silva, J., M. Gorenstein, G. Zhong, J. Vissers & S. Geromanos, (2006) Absolute quantification of preteins by LCMS. *Mol. Cell. Proteomics* **5.1**: 144-155.
- Smeekens, S. & F. Rook, (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* **115**: 7-13.
- Sohm, J.A., E.A. Webb & D.G. Capone, (2011) Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 499-508.
- Stanier, R. & G. Cohen-Bazire, (1977) Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 225-274.
- Stein, R., (1990) Organic carbon content/sedimentation rate relationship and its paleoenvironmental significance for marine sediments. *Geo-Mar Lett* **75**: 125-138.
- Steuer, R., H. Knoop & R. Machné, (2012) Modelling cyanobacteria: from metabolism to integrative models of phototrophic growth. *J. Exp. Bot.* **63**: 2259-2274.
- Stocker, R., (2012) Marine microbes see a sea of gradients. *Science* **338**: 628-633.
- Strahler, A., (1992) *Geología Física*. Ediciones Omega, SA, Barcelona.
- Strom, S.L., R. Benner, S. Ziegler & M.J. Dagg, (1997) Planktonic grazers are a potentially important source of marine dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1364-1374.
- Suttle, C., (2005) Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356-361.
- Suttle, C., J.A. Fuhrman & D.G. Capone, (1990) Rapid ammonium cycling and concentration-dependent partitioning of ammonium and phosphate: Implications for carbon transfer in planktonic communities. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 424-433.
- Tanigawa, R., M. Shirokane, S. Maeda Si, T. Omata, K. Tanaka & H. Takahashi, (2002) Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4251-4255.
- Thompson, A., R. Foster, A. Krupke, B. Carter, N. Musat, D. Vaultot, M. Kuypers & J.P. Zehr, (2012) Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* **337**: 1546-1550.
- Ting, C., C. Hsieh, S. Sundararaman, C. Mannella & M. Marko, (2007) Cryo-electron tomography reveals the comparative three-dimensional architecture of *Prochlorococcus*, a globally important marine cyanobacterium. *J. Bacteriol.* **189**: 4485-4493.
- Tolonen, A., G.B. Liszt & W. Hess, (2006) Genetic Manipulation of *Prochlorococcus* Strain MIT9313: Green Fluorescent Protein Expression from an RSF1010 Plasmid and Tn5 Transposition. *Appl. Environ. Microbiol.*: 7607-7613.
- Tortell, P.D., M.T. Maldonado & N.M. Price, (1996) The role of heterotrophic bacteria in iron-limited ocean ecosystems. *Nature* **383**: 330-332.
- Trebst, A., (1980) Inhibitors in the electron flow. *Methods Enzymol.* **69**: 675-715.

- Tripp, H., S. Bench, K. Turk, R. Foster, B. Desany, F. Niazi, J. Affourtit & J. Zehr, (2010) Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature*: 1-5.
- Turk, V., A.S. Rehnstam, E. Lundberg & A. Hagstrom, (1992) Release of bacterial DNA by marine nanoflagellates, an intermediate step in phosphorus regeneration. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3744-3750.
- Van Den Broeck, N., T. Moutin, M. Rodier & A. Le Bouteiller, (2004) Seasonal variations of phosphate availability in the SW Pacific Ocean near New Caledonia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **268**: 1-12.
- Varman, A., Y. Xiao, H. Pakrasi & Y. Tang, (2013) Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 for isobutanol production. *Appl. Environ. Microbiol* **79**: 908-914.
- Vaulot, D., D. Marie, R. Olson & S. Chisholm, (1995) Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific ocean. *Science* **268**: 1480-1482.
- Vazquez-Bermudez, M.F., A. Herrero & E. Flores, (2002) 2-oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* **512**: 71-74.
- Venter, C.e.a., (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science* **304**: 58-60.
- Vila-Costa, M., R. Simo, H. Harada, J. Gasol, D. Slezak & R. Kiene, (2006) Dimethylsulfoniopropionate uptake by marine phytoplankton. *Science* **314**: 652-654.
- Wakeham, S. & C. Lee, (1993) Organic geochemistry of particulate matter in the ocean: the role of particles in oceanic sedimentary cycles. *Organic Geochemistry* **14**: 83-96.
- Welsh, E.A., M. Lliberton, J. Stocker, T. Loh, T. Elvitigala, C. Wang, A. Wollam, R.S. Fulton, S.W. Clifton & O. authors, (2008) The genome of *Cyanothece* 51142 a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15094-15099.
- West, N., P. Lebaron, P. Strutton & M. Suzuki, (2010) A novel clade of *Prochlorococcus* found in high nutrient low chlorophyll waters in the South and Equatorial Pacific Ocean. *ISME Journal*: 1-12.
- West, N. & D. Scanlan, (1999) Niche partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the Eastern North Atlantic ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2585-2591.
- West, N., W. Schonhuber, N. Fuller, R. Amann, R. Rippka, A. Post & D. Scanlan, (2001a) Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology (Read.)* **147**: 1731-1744.

- West, N.J., S. W.A, N. Fuller, R. Amann, R. Rippka, A.F. Post & D.J. Scanlan, (2001b) Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **147**: 1731-1744.
- Wheeler, P.A. & D.L. Kirchman, (1986) Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 998-1009.
- Whitton, B. & M. Potts, (2000) *The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Whitton, B.A., (1992) *Diversity, ecology, and taxonomy of teh cyanobacteria*. New York.
- Williams, P. & P. del Giorgio, (2005) *Respiration in aquatic ecosystem: history and background*. Oxford University, New York.
- Williams, P., P.D. Quay, T.K. Westberry & M.J. Behrenfeld, (2013) The oligotrophic ocean is autotrophic. *Annu.Rev.Mar.Sci* **5**: 535-549.
- Williamson, S., D. Rusch & e. al, (2008) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples. *PLoS. ONE* **3**: e1456.
- Wright, R.T. & J.E. Hobbie, (1966) Use of glucose and acetate by bacteria in aquatic ecosystems. *Ecology* **47**: 447-464.
- Wu, J.F., W.C. Sunda, E. Boyle & D.M. Karl, (2000) Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* **289**: 759-762.
- Yang, C., Q. Hua & K. Shimizu, (2002) Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 813-822.
- Yoo, S., M. Spalding & J. Jane, (2002) Characterization of cyanobacterial glycogen isolated from the wild type and from a mutant lacking of branching enzyme. *Carbohydr. Res.* **337**: 2195-2203.
- Yooseph, S., G. Sutton, D. Rusch, A. Halpern, S. Williamson, K. Remington, J. Eisen, K. Heidelberg, G. Manning, W. Li, L. Jaroszewski, P. Cieplak, C. Miller, H. Li, S. Mashiyama, M. Joachimiak, C. van Belle, J. Chandonia, D. Soergel, Y. Zhai, K. Natarajan, S. Lee, B. Raphael, V. Bafna, R. Friedman, S. Brenner, A. Godzik, D. Eisenberg, J. Dixon, S. Taylor, R. Strausberg, M. Frazier & J. Venter, (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol.* **5**: e16.
- Yoshida, M., J. Poser, W. Allison & F. Esch, (1981) Identification of an essential glutamic acid residue in the b subunit of the adenosine triphosphatase from the thermophilic bacterium *PS3*. *J. Biol. Chem.* **256**: 148-153.

- Zehr, J., S. Bench, B. Carter, I. Hewson, F. Niazi, T. Shi, H. Tripp & J. Affourtit, (2008) Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science* **322**: 1110-1112.
- Zhang, S. & D.A. Bryant, (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* **334**: 1551-1553.
- Zhu, H., X. Ren, j. wANG, Z.P. Song, M. Shi, J. Qiao, X. Tian, J. Liu, L. Chen & W. Zhang, (2013) Integrated OMICS guided engineering of biofuel butanol-tolerance in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology for Biofuels* **6**: 1-14.
- Zinser, E., A. Coe, Z. Johnson, A. Martiny, N. Fuller, D. Scanlan & S. Chisholm, (2006) *Prochlorococcus* ecotype abundances in the north atlantic ocean as revealed by an improved quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 723-732.
- Zinser, E., Z. Johnson, A. Coe, E. Karaca, D. Veneziano & S. Chisholm, (2007) Influence of light and temperature on *Prochlorococcus* ecotype distributions in the Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 2205-2220.
- Zubkov, M., B. Fuchs, G. Tarran, P. Burkill & R. Amann, (2003) High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1299-1304.
- Zubkov, M. & G. Tarran, (2005) Amino acid uptake of *Prochlorococcus* spp. in surface waters across the South Atlantic Subtropical Front. *Aquat. Microb. Ecol.* **40**: 241-249.
- Zubkov, M. & G. Tarran, (2008) High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature* **455**: 224 - 227.
- Zubkov, M., G. Tarran & B. Fuchs, (2004) Depth related amino acid uptake by *Prochlorococcus* cyanobacteria in the Southern Atlantic tropica gyre. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**: 153-161.
- Zubkov, M., G. Tarran, I. Mary & B. Fuchs, (2008) Differential microbial uptake of dissolved amino acids and amino sugars in surface waters of the Atlantic Ocean. *J. Plankton Res.* **30**: 211-220.
- Zubkov, M.V., I. Mary, E. Woodward, P.E. Warwick, B.M. Fuchs, D.J. Scanlan & P.H. Burkill, (2007) Microbial control of phosphate in the nutrient-depleted North Atlantic subtropical gyre. *Environ. Microbiol.* **9**: 2079-2089.
- Zwirgmaier, K., J. Heywood, K. Chamberlain, E. Woodward, M. Zubkov & D. Scanlan, (2007) Basin-scale distribution patterns of picocyanobacterial lineages in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* **9**: 1278-1290.

Notes

