

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**BACTERIAS ASOCIADAS A SISTEMAS
HIDROTERMALES SOMEROS MARINOS EN
BAJA CALIFORNIA SUR CON CAPACIDAD PARA
PRODUCIR COMPUESTOS INHIBIDORES
DE BIOPELÍCULAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

KARLA MARÍA GUTIÉRREZ ALMADA

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"BACTERIAS ASOCIADAS A SISTEMAS HIDROTÉRMICOS SOMEROS MARINOS EN BAJA CALIFORNIA SUR CON CAPACIDAD PARA PRODUCIR COMPUESTOS INHIBIDORES DE BIOPELÍCULAS"

Presentada por el alumno:

GUTIÉRREZ ALMADA KARLA MARÍA
Apellido paterno materno nombre(s)
Con registro:

B	1	6	0	7	9	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
Directores de Tesis

DRA. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ
Directora de Tesis

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2a. Directora de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 20 del mes de Junio del año 2018

El (la) que suscribe Lic. Biól. KARLA MARÍA GUTIÉRREZ ALMADA Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B160799 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. RUTH NOEMÍ AGUILA RAMÍREZ Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"BACTERIAS ASOCIADAS A SISTEMAS HIDROTERMALES SOMEROS MARINOS EN

BAJA CALIFORNIA SUR CON CAPACIDAD PARA PRODUCIR COMPUESTOS INHIBIDORES DE BIOPELÍCULAS"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo

sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: karla.gtz.al@gmail.com - noemiag72@gmail.com - бага.gonzal@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

LIC. BIÓL. KARLA MARÍA GUTIÉRREZ ALMADA

Nombre y firma del alumno



En algún lugar, algo increíble
espera ser descubierto.

Carl Sagan



AGRADECIMIENTOS

Agradezco y dedico este trabajo al hombre de mi vida, a mi filósofo y maestro predilecto, héroe, consejero, compañero de viajes, mejor amigo y padre. Sigues viviendo en un 50 por ciento de mí.

A mi mamá, por ser la que me enseña a ser fuerte en momentos de tensión, a sonreír en la adversidad y a nunca dejarme vencer por nada ni por nadie. Te agradezco el apoyo que tú más que nadie has sabido brindarme. Eres la mejor y agradezco infinitamente tenerte a mi lado.

A mi hermano José Jaime, por esas frases precisas en momentos de frustración y sobre todo por hacerme ver las cosas desde otra perspectiva, ayudándome a mejorar continuamente.

Al IPN, por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional en una gran casa de estudios como lo fue CICIMAR y por mostrarme lo que significa el orgullo politécnico, que siempre llevaré en mi mente y corazón. Gracias por apoyar el proyecto: Diversidad de actinobacterias de fondos marinos de Baja California Sur (SIP-2017 0472), para la realización de éste y otros trabajos en el laboratorio. También por apoyarnos con becas BEIFI, incentivando a jóvenes investigadores.

A CONACYT por el apoyo económico hacia mí y a todos los estudiantes de posgrado, para el desarrollo de nuevos proyectos de investigación científica. Gracias por el financiamiento del proyecto: Desarrollo de una plataforma tecnológica de recubrimientos antivegetativos de bajo impacto ambiental (CDTI-CONACYT 210637).

Al Dr. José de La Cruz Agüero, por presentarme el CICIMAR-IPN y el Lab. de Microbiol. y Biol. Molecular. También le agradezco que a pesar de que trabajo con “seres inferiores”, siempre me recibe con los brazos abiertos y una gran sonrisa en la Colección Ictiológica. Gracias por demostrar que contamos con profesores investigadores trabajadores y preocupados por las nuevas generaciones en México.

Agradezco especialmente a mi directora de tesis: Dra. Ruth Noemí Aguila Ramírez, por aceptarme como estudiante, por siempre apoyarme y guiarme durante toda mi maestría. Por enseñarme con el ejemplo lo que es ser una gran directora,

comprometida con sus estudiantes, responsable y trabajadora. Sin usted, nada de esto hubiera sido posible.

A mi codirectora Bárbara González Acosta, por enseñarme de la mejor manera un poco de todo el conocimiento que posee. Gracias por ser una excelente docente en el aula y gran investigadora en el laboratorio. Sobre todo por ayudarme a mejorar en mi camino al estudio de la microbiología.

Al Dr. José Manuel Borges Souza le agradezco por comentarnos sobre la existencia de estos ambientes hidrotermales, así como también por su tiempo y gran disposición para ayudarnos a tomar las muestras que fueron pieza clave en este trabajo.

A mi comité tutorial: Dra. Claudia J. Hernández Guerrero, Dr. Sergio F. Martínez Díaz y Dr. César S. Cardona Félix, gracias por los comentarios que mejoraron este trabajo.

Al Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por sus palabras de aliento, apoyo y su eterna sonrisa que llena de luz todo CICIMAR.

A la Dra. Graciela Castro Escarpulli (ENCB-IPN) por facilitarnos la cepa biosensora y las cepas patógenas con las que se elaboraron los ensayos. Y a la Dra. Rocío Guadalupe Cervantes Gámez (UDG) por siempre estar dispuesta a resolver mis dudas con respecto a los análisis de secuenciación masiva, siempre de la mejor forma y con una sonrisa.

A Valeria Villegas porque entre risas siempre hiciste más amena mi estadía en el laboratorio. Gracias por escucharme, aconsejarme y ser mi compañera en esta travesía. Angélica Álvarez, viejita, gracias por darme tu cariño, apoyo, consejos y horas interminables de risas. Sin ti esta maestría no hubiera sido lo mismo. Gracias Enriette Ledesma por ser mi amiga incondicional y mi compañera de viajes; te agradezco el cariño y apoyo, sobre todo por las risas de cada día, ¿voy bien Camilo?

A todos y cada uno de los profesores investigadores que me enseñaron en sus materias un poco de todo su conocimiento. Y a los que integraron el Lab. de Microbiol. y Biol. Molecular durante mis estudios, gracias por ayudarme en menor o gran medida a lograr mis objetivos durante mi maestría en este centro de investigación.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	i
Lista de tablas	ii
GLOSARIO.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Diversidad bacteriana en sistemas hidrotermales someros.....	3
2.2 Estudios microbiológicos de sistemas hidrotermales someros de Baja California Sur, México.....	5
2.3 Bacterias asociadas a sistemas hidrotermales y su relación con procesos de quorum sensing y formación de biopelículas.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	8
4. OBJETIVOS.....	10
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivos específicos.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1 Área de estudio	11
5.1.1 Bahía Concepción, Baja California Sur.....	11
5.1.1.1 Área marina: Mapachitos, Bahía Concepción.....	11
5.1.1.2 Área de manglar: Santispac, Bahía Concepción.....	11
5.1.2 Área de línea de costa: El Sargento.....	11
5.2 Recolecta de muestras	13
5.3 Secuenciación masiva de ácidos nucleicos.....	14
5.4 Aislamiento y caracterización bacteriana.....	14
5.5 Evaluación de la presencia de actividad inhibidora de quorum sensing.	15
5.6 Extracción de compuestos de cultivos bacterianos.....	15

5.7 Ensayos de inhibición de biopelículas bacterianas.....	16
5.8 Identificación molecular de bacterias activas	16
5.8.1 Extracción de ADN con el método Fenol-Cloroformo.....	17
5.8.2 Extracción de ADN - PCR de colonia.....	17
5.8.3 Extracción de ADN con la Matriz InstaGene - Bio-Rad.....	18
5.8.4 Amplificación por PCR y secuenciación.....	18
6. RESULTADOS.....	20
6.1 Caracterización de los sitios de muestreo.....	20
6.2 Caracterización de comunidades bacterianas con secuenciación masiva.....	20
6.2.1 Curvas de rarefacción.....	20
6.2.2 Diversidad alfa bacteriana.....	21
6.2.3 Riqueza bacteriana.....	23
6.2.4 Asignación taxonómica de los microbiomas.....	24
6.2.5 Composición taxonómica a nivel de filo.....	26
6.3 Bacterias marinas aisladas de los distintos sistemas hidrotermales someros.....	39
6.3 Bacterias marinas con actividad degradadora de moléculas señalizadoras del tipo AHL.....	40
6.4 Actividad inhibitoria de biopelículas de los extractos crudos.....	42
7. DISCUSIÓN.....	48
7.1 Caracterización de los sitios de muestreo.....	48
7.2 Caracterización de comunidades bacterianas con secuenciación masiva	50
7.3 Bacterias identificadas por secuenciación masiva con potencial para inhibir biopelículas.....	60
7.4 Bacterias marinas aisladas de los distintos sistemas hidrotermales someros.....	61

7.5 Bacterias marinas con actividad degradadora de moléculas señalizadoras del tipo AHL y actividad inhibitoria de biopelículas de los extractos crudos.....	63
8. CONCLUSIONES.....	68
9. RECOMENDACIONES.....	70
10. BIBLIOGRAFÍA.....	71
11. ANEXOS.....	82
11.1 Anexo 1. Composición taxonómica a nivel de filo de bacterias presentes en las muestras de los distintos sitios de muestreo.....	82
11.1 Anexo 2. Morfologías coloniales de las distintas cepas aisladas de los sitios de muestreo.....	85

Lista de Figuras

Figura 1. Mapas de Bahía Concepción (A) y de los dos sitios de recolecta dentro de la bahía: Mapachitos (B) y manglar Santispac (C). Modificados de Leal-Acosta & Prol-Ledesma (2016).....	13
Figura 2. Localización del área de muestreo El Sargento, B.C.S Modificados de Leal-Acosta & Prol-Ledesma (2016) y de Mendoza-Cruz, <i>et al.</i> (2013).....	14
Figura 3. Curvas de rarefacción obtenidas de la secuenciación masiva de las muestras de sedimento	21
Figura 4. Análisis de diversidad alfa con el índice Shannon-Weaver de las muestras de sedimento de los distintos sitios de muestreo en las dos temporadas. A) Muestras de Mapachitos. B) Muestras de manglar Santispac. C) Muestras de El Sargento. S (Temporada seca), LL (Temporada lluviosa), Ctrl (Control de la respectiva temporada de la muestra).....	22
Figura 5. Análisis de riqueza mediante el índice Chao1 de las muestras de sedimento de los distintos sitios de muestreo en las dos temporadas. A) Muestras de Mapachitos. B) Muestras de manglar Santispac. C) Muestras de El Sargento. S (Temporada seca), LL (Temporada lluviosa), Ctrl (Control de la respectiva temporada de la muestra).....	24
Figura 6. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) Mapachitos, temporada seca y B) su control.....	28
Figura 7. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) Mapachitos, temporada lluviosa y B) su control.....	30
Figura 8. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) manglar Santispac, temporada seca y B) su control.....	32
Figura 9. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) manglar Santispac, temporada lluviosa y B) su control.....	34
Figura 10. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) El Sargento, temporada seca y B) su control.....	36
Figura 11. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras A) El Sargento, temporada lluviosa y B) su control.....	38
Figura 12. Ejemplo de pruebas de difusión en pozo para demostrar la actividad degradadora de moléculas C6HSL por parte de algunas cepas. Control positivo (C+): Medio LB; Control negativo (C-): Medio LB y moléculas señalizadoras.....	40
Figura 13. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de <i>V. parahaemolyticus</i>	43
Figura 14. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de <i>A. caviae</i> Sch3.....	44
Figura 15. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	44
Figura 16. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de la <i>Virgibacillus</i> sp. C29.....	45
Figura 17. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de la <i>Vibrio alginolyticus</i> C96.....	45

Lista de Tablas

Tabla I. Número de OTUs identificadas a nivel taxonómico.....	25
Tabla II. Especies identificadas con secuenciación masiva en las distintas muestras.....	26
Tabla III. Número de cepas aisladas de los distintos sitios de muestro.....	39
Tabla IV. Cepas degradadoras de moléculas señalizadoras y características principales.....	41

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Biomolécula orgánica bicatenaria conformada por cadenas de desoxirribonucleótidos (azúcar desoxirribosa, base nitrogenada: adenina, citosina, guanina o timina y un grupo fosfato); conteniendo la información genética de la mayoría de los seres vivos.

Ácido ribonucleico (ARN): Biomolécula orgánica comúnmente monocatenaria conformada por ribonucleótidos (azúcar ribosa, base nitrogenada: adenina, citosina, guanina o uracilo, y un grupo fosfato), algunos implicados en la síntesis de proteínas, en regular la expresión genética o actuando como biocatalizadores.

Biofouling: Proceso natural de adhesión y sucesión ecológica tanto de micro y macroorganismos en superficies sumergidas.

Biopelícula: Estructura colectiva de microorganismos adheridos a superficies vivas o inertes, conformada principalmente por agua, exopolisacáridos secretados por bacterias y en menor proporción: proteínas, ácidos nucleicos y productos derivados de la lisis celular.

Cepa bacteriana: Variante genética o subtipo de un microorganismo, derivada de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada.

Genoma: Material genético de un ser vivo.

Inhibición de quorum sensing (IQS): También conocido como quorum quenching. Inactivación de los sistemas de comunicación bacteriana.

Mesófilo: Organismo cuya temperatura de crecimiento oscila entre los 15 y 35°C.

Metagenómica: Conjunto de métodos y técnicas utilizadas para el estudio de comunidades a través del análisis de su material genético sin el cultivo de organismos individuales. La metagenómica es análoga a la genómica con la diferencia de que no se ocupa de un único genoma, de un clon u organismo cultivado o caracterizado en el laboratorio, sino con toda la comunidad microbiana presente en una muestra ambiental, evaluando de esta forma el genoma de toda la comunidad.

N-acil homoserina lactona (AHL): Molécula señalizadora o autoinductor involucrada en el proceso de quorum sensing o autoinducción de algunas bacterias, expresada genéticamente por bacterias a altas densidades celulares. Compuesta por una cadena acil-grasa ligada a una homoserina lactonizada a través de una unión amida.

Oligonucleótido: También conocido como cebador o primer, es una secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, conformado por cincuenta pares de bases o menos; sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Procarionte: Organismo unicelular del reino Monera o Archaea, siendo su principal característica el carecer de núcleo, puesto que su material genético se encuentra en el citoplasma, en una región denominada nucleoide.

Sistema hidrotermal: Conjunto de procesos que redistribuyen la energía y la masa en respuesta a los fluidos de agua circulantes. Estos sustratos están activos hoy en las cortezas oceánicas y continentales.

Somero: Poco profundo o que está muy cerca de la superficie.

Termófilo: Organismo cuyas temperaturas óptimas de crecimiento oscilan entre los 45 y los 70°C.

Termotolerante: Organismo que tiene la habilidad de crecer entre los 45 y los 70°C.

Unidad Taxonómica Operacional (OTU): Unidades de diversidad microbiana. Son grupos de organismos agrupados por similitud de secuencia de ADN de un gen marcador taxonómico específico.

Ventila hidrotermal: Grieta o fisura en la corteza terrestre de la cual fluye agua geotermal.

RESUMEN

Los sistemas hidrotermales someros son ambientes extremos debido a que los sedimentos y fluidos emitidos de las ventilas, presentan condiciones físico-químicas inusuales a otras áreas marinas, lo que promueve una biodiversidad única que desde hace algunos años ha sido de gran interés para la biotecnología. En este trabajo se realizó un estudio bioprospectivo, con la finalidad de caracterizar comunidades bacterianas asociadas a ventilas hidrotermales someras, capaces de producir compuestos inhibidores de biopelículas. Para esta caracterización, se analizó la diversidad y riqueza bacteriana de sedimentos en tres sistemas hidrotermales someros de B.C.S., con técnicas de secuenciación masiva y se evaluó la potencial producción de compuestos con actividad inhibitoria de biopelículas de la fracción cultivable. En estos sitios predominaron los microorganismos quimiosintéticos, observando que la diversidad alfa y riqueza fueron menores en comparación con sitios mesófilos control, cercanos a los sistemas hidrotermales. Con la fracción bacteriana cultivable (161 cepas) se realizaron ensayos de degradación de autoinductores AHL (C6HSL) implicados en el proceso de quorum sensing. Se utilizó el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 y 23 cepas mostraron actividad, de las cuales se obtuvieron extractos orgánicos con acetato de etilo. Se probó el potencial de los extractos para inhibir la formación de biopelículas frente a dos cepas patógenas de humano (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Aeromonas caviae* ScH3), de una patógena de camarón (*Vibrio parahaemolyticus* M8), así como de dos cepas marinas identificadas como productoras de biopelículas en superficies sumergidas (*Virgibacillus* sp. C29 y *Vibrio alginolyticus* C96). Los resultados mostraron que algunas cepas termotolerantes, en su mayoría *Bacillus* producen compuestos que inhiben biopelículas bacterianas (*B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, *B. firmus*, *B. oceanisedimentis*, *B. aerius* y *B. sonorensis*). Así como también otras bacterias como *Vibrio alginolyticus* y *Brevibacillus thermoruber* mostraron actividad. Por lo tanto, se concluye que estos sitios presentan una alta diversidad de microorganismos quimiosintéticos y que son una fuente accesible de microorganismos cultivables con compuestos que presentan potencial biotecnológico para inhibir biopelículas.

ABSTRACT

Shallow hydrothermal systems are extreme environments because the sediments and fluids emitted from the vents present unusual physical-chemical conditions compared to other marine areas, which promotes a unique biodiversity that has been of great interest for biotechnology. In this work a bioprospective study was carried out, characterizing bacterial communities associated to shallow hydrothermal vents, capable of producing biofilms inhibiting compounds. For this characterization, the diversity and bacterial richness of sediments were analyzed in three shallow hydrothermal systems of B.C.S., with massive sequencing techniques; and of the culturable bacterial fraction, its potential production of compounds with inhibitory activity of biofilms was evaluated. In these sites chemosynthetic microorganisms predominated, it was observed that alpha diversity and richness were lower compared to mesophilic sites, close to hydrothermal systems. With the culturable bacterial fraction (161 strains), degradation tests of AHL autoinducers (C6HSL) involved in the quorum sensing process were carried out. The biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 was used and 23 strains showed activity, from which organic extracts were obtained with ethyl acetate; their potential to inhibit biofilm formation was tested against two human pathogenic strains (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Aeromonas caviae* Sch3), a shrimp pathogen (*Vibrio parahaemolyticus* M8), as well as from two marine strains identified as producing biofilms on submerged surfaces (*Virgibacillus* sp. C29 and *Vibrio alginolyticus* C96). The results showed that some thermotolerant strains, mostly *Bacillus*, produce compounds that inhibit bacterial biofilms (*B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, *B. firmus*, *B. oceanizedimemis*, *B. aerius* and *B. sonorensis*). As well as other bacteria such as *Vibrio alginolyticus* and *Brevibacillus thermoruber* showed activity. We concluded that these sites have a high diversity of chemosynthetic microorganisms and that they are also an accessible source of culturable microorganisms with compounds that have biotechnological potential to inhibit biofilms.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas hidrotermales marinos se consideran ambientes extremos debido a que los fluidos emitidos de las ventilas o fisuras en el sedimento marino, presentan condiciones físico-químicas inusuales a otras áreas marinas, tales como: temperaturas elevadas, concentraciones altas de dióxido de carbono, ácido sulfhídrico, hidrocarburos y metales pesados; entre otras características que los hacen sistemas únicos (Lentini *et al.*, 2014). Tarasov y colaboradores (2005) clasificaron estos ambientes de acuerdo a su profundidad en someros (menores de 200 m) y profundos (mayores de 200 m).

Desde el descubrimiento de las ventilas hidrotermales profundas en 1977, el estudio de la actividad hidrotermal submarina se ha orientado a la investigación de éstas, debido a que algunos autores aseguran que las condiciones extremas que poseen, asemejan la atmósfera terrestre primitiva, concluyendo en hipótesis sobre el origen y evolución de la vida (Van Dover, 2000). Contrariamente, los sistemas hidrotermales someros han sido estudiados con menor frecuencia, pese a que presentan facilidad en la obtención de muestras (Canet *et al.*, 2005).

En estos ambientes, los organismos procariontes ejercen un papel crucial, sin embargo, el estudio de su diversidad e importancia ecológica es limitado (Giovannelli *et al.*, 2013). El estudio de los microorganismos que habitan estos sistemas ha tomado un particular interés, pudiendo atribuirse a su capacidad no sólo de sobrevivir, sino crecer activamente y multiplicarse a altas temperaturas y condiciones químicas distintas a otros medios (Sonnleitner, 2005).

Microorganismos extremófilos aislados de sistemas hidrotermales, se han estudiado con un enfoque ecológico para dilucidar la función que ejercen en el medio (Van Dover, 2000), encontrando bacterias que tienen capacidad de colonizar diversos sustratos y transformar compuestos químicos derivados de la actividad hidrotermal a través de reacciones redox (Fisher *et al.*, 2007; Jogersen & Boetius, 2007) y la fijación de C vía quimiosintética. Estas comunidades microbianas poseen metabolismos diversos y algunas son capaces de oxidar H_2 , H_2S , S, CH_4 , F_2+ y NH_4 , utilizando distintos aceptores de electrones (O_2 , NO_3 , SO_4) (Fishert *et al.*, 2007). Esto promueve la

formación de sistemas hidrotermales con una biodiversidad propia de estos ambientes que desde hace algunos años han sido de gran interés para estudios con potencial biotecnológico, ya que algunas bacterias aisladas de estos ambientes son productoras de enzimas de importancia biotecnológica como las polimerasas (Innis *et al.*, 1988), proteasas (Cowan *et al.*, 1985), amilasas (Ogasahara, 1970), alcohol deshidrogenasas (Lamed & Zeikus, 1981) o aquellas productoras de autoinductores involucrados en la formación de exopolímeros, etc. Estos compuestos expresados genéticamente para la formación de biopelículas, les permiten sobrevivir en las condiciones adversas del medio, como consecuencia de la comunicación bacteriana a altas densidades celulares (quorum sensing) (Nichols *et al.*, 2009). A su vez, también se ha demostrado la presencia de bacterias termófilas productoras de enzimas N-acilhomoserina lactonasas (Seo *et al.*, 2011; Morohoshi *et al.*, 2015) y compuestos que degradan los autoinductores de otras bacterias, inhibiendo dicha comunicación y la formación de sus biopelículas, los cuales son interesantes por sus múltiples aplicaciones en el área de la biomedicina y biotecnología (Kokare *et al.*, 2009).

Identificar a los organismos que habitan estos sistemas hidrotermales, permitirá un acercamiento a la caracterización de las comunidades bacterianas de ambientes extremos para conocer el potencial de estos sistemas como fuente de compuestos innovadores (Wiegel, 1998). Ya que en particular, los microorganismos que viven en hábitats marinos extremos, presentan una gran diversidad metabólica que les permite sintetizar biomoléculas que presentan potencial biotecnológico, debido a las propiedades físicas y estructurales que presentan (Nicolaus *et al.*, 2010).

Por lo que este trabajo pretende realizar un estudio bioprospectivo con la finalidad de caracterizar comunidades bacterianas asociadas a ventilas hidrotermales someras, describiendo la función que ejercen en esos ambientes extremos de acuerdo a su metabolismo basado en literatura, esperando que debido a los factores bióticos y abióticos de estos sitios, las bacterias marinas presentes produzcan compuestos con potencial uso para inhibir biopelículas.

2. ANTECEDENTES

En México los estudios sobre sistemas hidrotermales someros son escasos y principalmente se han explorado desde el punto de vista geológico y geoquímico, sobre todo de los gases y fluidos emitidos por las ventilas (Villanueva-Estrada *et al.*, 2005; Forrest *et al.*, 2005). Con respecto a estudios microbiológicos y del potencial biotecnológico de estos ambientes en el país, son aún más escasos y sólo algunos analizan comunidades bacterianas.

En el caso del estado de Baja California Sur, existen investigaciones microbiológicas de las fracciones cultivables, aisladas de sistemas hidrotermales con distintos objetivos (García-Maldonado, 2009; Gallut-Rubio, 2016), sin embargo, sólo se ha realizado un reporte bacteriano de comunidades asociadas a estos sistemas (Dávila-Ramos *et al.*, 2015) y el potencial antimicrobiano e inmunoestimulante de bacterias aisladas de sistemas hidrotermales (Rodríguez-Valdez, 2017).

2.1 Composición bacteriana en sistemas hidrotermales someros.

Con respecto al estudio de la diversidad, riqueza y composición taxonómica bacteriana en sistemas hidrotermales someros, Sievert y colaboradores (2000), investigaron la abundancia relativa de bacterias y arqueas a lo largo de un gradiente térmico en ventilas someras submarinas cerca de la isla de Milos, Grecia. La mayor concentración de ARNr procarionte se encontró en la superficie del sedimento y ésta disminuyó significativamente con la profundidad. Las bacterias constituyeron al menos el 78% de la comunidad, sin embargo, a lo largo del gradiente de temperatura más elevada, la proporción de ARNr de arqueas aumentó, pero continuó como minoría con respecto a la abundancia de bacterias. Sugiriendo que las arqueas probablemente están restringidas a un nicho estrecho, mientras que las bacterias dominan en un ambiente de temperaturas altas, en donde una vez se creyó que era exclusivo del reino Archea.

Por otra parte, Hirayama y colaboradores (2007) caracterizaron comunidades microbianas cultivables y no cultivables, asociadas con un sistema hidrotermal somero frente a la isla Taketomi, Japón. En su estudio demostraron que los microorganismos

cultivados directamente del fluido hidrotermal y de tapetes microbianos fueron en su mayoría autótrofos oxidantes del azufre, siguiendo en abundancia los oxidantes del metano. En general sus resultados mostraron que en un sistema hidrotermal poco profundo o somero, donde la luz solar es abundante, habitan comunidades microbianas únicas que se sustentan en la producción primaria quimiosintética más que por la producción fotosintética.

Con respecto a la actividad primaria en los sistemas hidrotermales, Maugeri y colaboradores (2009), estudiaron poblaciones de bacterias y arqueas en la isla de Panarea, Italia; detectando bacterias oxidantes del azufre tanto en métodos dependientes de cultivo como en otros no dependientes de cultivo. Demostrando que la producción primaria en el sitio, está conformada por fotótrofos y quimiolitótrofos.

En 2013 Tang y colaboradores realizaron estudios de metagenómica y sus datos mostraron que las bacterias dominantes en la superficie del agua marina fueron Epsilon y Gammaproteobacterias. Entre la superficie del mar y la ventila hidrotermal se registraron bacterias fijadoras de carbón y sulfurosas. Y directamente en la ventila se encontraron organismos quimioautótrofos. En general, sus análisis comparativos de metagenomas, mostraron que en los microorganismos que habitan las ventilas hidrotermales someras, es posible encontrar algunos genes similares presentes en sistemas hidrotermales profundos.

Antranikian y colaboradores (2017), publicaron los resultados de sus estudios sobre la diversidad de bacterias y arqueas de dos sistemas hidrotermales someros en Isla Vulcano, Italia, esto con un enfoque donde combinaron métodos de electroforesis desnaturalizante en gel de gradiente (DGGE) y estudios de metagenómica. Demostraron una gran diversidad de arqueas hipertermófilas y en especial, una gran abundancia de géneros como *Staphylothermus*, *Thermococcus* y *Aeropyrum*. En cuanto a la comunidad bacteriana se observó una gran abundancia de bacterias pertenecientes al filo Epsilonproteobacteria, especialmente los géneros *Sulfurimonas* y *Sulfurovum*.

2.2 Estudios microbiológicos de sistemas hidrotermales someros de Baja California Sur, México.

En Baja California Sur, México, existen zonas de sistemas hidrotermales someros, y de ellos hasta el momento, se conoce poco sobre diversidad microbiana o la búsqueda de sustancias con potencial biotecnológico. Dávila-Ramos y colaboradores (2015), realizaron un primer reporte describiendo algunas comunidades bacterianas en Mapachitos, Bahía Concepción, con estudios de metagenómica. Encontrando bacterias termófilas del tipo Gamma, Delta, y Epsilonproteobacteria, así como también Bacteroidetes en las condiciones oxidantes de la bahía. Identificaron bacterias que se han observado en ambientes oxidantes extremos, señalando que las características físicas y químicas de las manifestaciones geotérmicas, tienen un importante impacto en la biodiversidad de las bacterias en las ventilas hidrotermales someras.

El manglar Santispac, ubicado en Bahía Concepción ha sido estudiado con distintos fines. Ejemplo de ello es el trabajo de García Maldonado (2009) quien describe comunidades de cianobacterias asociadas a macroestructuras microbianas en el manglar. Detectando distintos géneros de cianobacterias que por primera vez se reportan para manantiales hidrotermales someros, tales como *Cyanobacterium*, *Gloeotheca* y *Lyngbya*. En 2016, Gallut Rubio aisló 22 cepas de bacterias en oncoides de manantiales hidrotermales del mismo manglar, identificando especies a partir de secuencias del 16S ARNr como *Nitratireductor*, *Ornithinibacillus*, *Bacillus*, *B. licheniformis* y *Synechococcus elongatus*.

Rodríguez Valdez (2017) aisló bacterias de ambientes extremos en B.C.S. de una ventila hidrotermal somera del manglar Santispac, Bahía Concepción y de la Salina en Laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro. Investigó la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a las cepas patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*. También evaluó la actividad inmunoestimulante de sus cepas mediante la producción de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, actividad fagocítica y antioxidante, así como la viabilidad en leucocitos de bazo de ratón. En general, demostró que bacterias aisladas de estos

ambientes extremos tienen potencial antimicrobiano y presentan actividad inmunoestimulante.

2.3 Bacterias asociadas a sistemas hidrotermales y su relación con procesos de quorum sensing y formación de biopelículas.

El proceso de quorum sensing (QS) permite coordinar comportamientos microbianos en comunidades de bacterias mesófilas. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la posibilidad de que tal fenómeno ocurra en ambientes extremos. Inicialmente el proceso de QS se pensaba poco probable en ambientes termófilos y moderadamente termófilos, debido a que moléculas señalizadoras del tipo AHL son termolábiles (Nichols *et al.*, 2009). A pesar de esto, algunos estudios muestran que microorganismos termófilos e hipertermófilos se comunican con distintos fines y algunos de ellos se han identificado como productores de exopolisacáridos, así como también formadores de biopelículas.

Por ejemplo, Johnson y colaboradores (2005) estudiaron a la especie hipertermófila *Thermotoga maritima* y además de identificar una vía para la formación de polisacáridos (utilizados en la formación de biopelículas), sugirieron que las moléculas involucradas en el proceso de QS en bacterias hipertermófilas pueden ser péptidos. Indicando que esta comunicación también debe considerarse como un componente de la actividad microbiana dentro de los hábitats hidrotermales.

Nichols y colaboradores (2009) exponen que la temperatura puede mediar la expresión de autoinductores 2 (AI-2), los cuales son moléculas de furanosil borato diéster. Estos autoinductores han sido propuestos como señales universales, debido a su participación en la comunicación entre distintas especies bacterianas gram negativas y positivas. En este trabajo se enfatiza la importancia de los factores ambientales; por ejemplo las altas temperaturas, como agente abiótico causante de fenómenos bioquímicos y microbiológicos en estos ambientes. Esto fue descubierto con ensayos *in vitro* cuando *Pyrococcus furiosus* se cultivó con *T. maritima* y se descubrió que los dos juntos producen una señal de tipo AI-2, careciendo de un homólogo que codifique el gen LuxS en sus genomas. Este gen es el encargado de codificar una enzima

esencial para la síntesis de autoinductores. Por lo tanto, en este trabajo se observa que en ambientes hidrotermales no sólo el gen LuxS puede mediar la producción del AI2, sino también la temperatura.

En 2011 Seo y colaboradores aislaron y caracterizaron una enzima N-acilhomoserina lactonasa de *Geobacillus caldxylosilyticus*; una bacteria termófila, la cual tiene actividad degradadora de moléculas N-acil homoserina lactonas (AHLs) de diferentes longitudes de cadena de acilo, por lo tanto podría degradar moléculas de distintas especies bacterianas. En el mismo año Ng y colaboradores aislaron una enzima lactonasa similar a una fosfotransferasa, a partir de la arquea termófila *Sulfolobus solfataricus* y demostraron que tenía actividad inhibitoria de QS contra *Pseudomonas areuginosa* PAO1, aportando la primera demostración de que estas enzimas pueden usarse para atenuar la producción de factores de virulencia controlados por señales de QS. Por otra parte, Morohoshi y colaboradores (2015), caracterizaron una enzima termoestable también N-acilhomoserina lactonasa de la bacteria termófila *Thermaerobacter marianensis*, aislada de la Fosa de las Marianas, esta enzima funciona como una lactonasa de AHL catalizando la apertura del anillo AHL hidrolizando lactonas, mostrando una mayor termoestabilidad que otras lactonasas AHL.

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los sistemas hidrotermales someros en el estado de B.C.S. son desconocidos en aspectos ecológicos. En este sentido, el conocimiento del metagenoma de un ambiente en particular, nos permite conocer diversos aspectos de la vida microbiana que se está generando.

Estudiar la fracción cultivable y no cultivable nos permite tener una aproximación del componente bacteriano asociado a estos ambientes. Debido a las características fisicoquímicas inusuales de estos sistemas, en donde se han desarrollado estas bacterias y presentan distintas interacciones entre ellas, se espera que produzcan compuestos que potencialmente puedan ser explotados con fines biotecnológicos, distintos a los estudiados en otros medios marinos. Entre estos compuestos se encuentran aquellos que inhiben la comunicación bacteriana.

La comunicación entre bacterias a través del QS desencadena la expresión sincronizada de genes en la población, regulando funciones biológicas importantes como la movilidad, bioluminiscencia, virulencia o la formación de biopelículas. Estas últimas son producidas para protegerse de la desecación, teniendo agua y nutrientes disponibles. También es conocido que las bacterias inmersas en sus biopelículas son más virulentas y presentan mayor resistencia a los antibióticos actuales. La ecología microbiana tiene un gran interés en estudiar el proceso de QS para entender, detectar e inhibir esta comunicación bacteriana, buscando a la par distintos compuestos que eviten dicho lenguaje químico.

Se ha sugerido que en ambientes hidrotermales el QS en bacterias juega un papel vital, ya que se han identificado bacterias extremófilas que han desarrollado mecanismos de comunicación bacteriana, distintos a microorganismos mesófilos. Esta comunicación les ha permitido la producción de exopolímeros para la formación de biopelículas, permitiéndoles sobrevivir en las condiciones adversas del medio.

Las biopelículas son parte fundamental del biofouling, proceso de sucesión ecológica de micro a macroorganismos en una superficie biótica o abiótica. Después de la formación de la biopelícula, los autoinductores bacterianos liberados al medio son

detectados por larvas de eucariotas, provocando la adhesión de macroorganismos marinos a la superficie. Este proceso tiene consecuencias económicas graves para los propietarios de embarcaciones o muelles ya que provoca corrosión, reduciendo la durabilidad y aumentando los costos por mantenimiento. Algo a considerar en el caso de los buques que presentan su superficie invadida de organismos, es que al navegar existe mayor peso y resistencia en el agua, por ende hay un exceso en el consumo de combustible. Otro efecto negativo es que muchas de las especies adheridas a estas superficies son invasoras y la embarcación actúa como vector, trasladando dichas especies de un sitio a otro, desencadenando consecuencias ecológicas negativas.

Otro efecto negativo es que bacterias patógenas formadoras de biopelículas son consideradas un problema grave en el área médica, ya que éstas se desarrollan sobre catéteres, implantes y equipo médico en general, provocando enfermedades nosocomiales. El investigador Vipin en 2015, expuso que “las biopelículas bacterianas causan alrededor del 80% de las enfermedades infecciosas y son mil veces más resistentes a los antibióticos que cuando están en su forma libre”.

Existen numerosas investigaciones con el fin de impedir que las bacterias se comuniquen y poder inhibir o retrasar el proceso de la formación de biopelículas, sin embargo, hasta la fecha se desconocen todas aquellas “moléculas mensajeras” implicadas en este proceso. Por lo que primero deben sentarse las bases de cuáles son aquellas bacterias que tienen el potencial de inhibir dicha comunicación para futuras aplicaciones biotecnológicas, en este caso bacterias marinas asociadas a sistemas hidrotermales someros con potencial producción de compuestos efectivos.

Es por ello que este trabajo pretende responder ¿cómo es la diversidad bacteriana en estos ambientes extremos que presentan condiciones fisicoquímicas inusuales en comparación con otros ambientes marinos, y si estas condiciones que influyen en su metabolismo, les dan la capacidad de producir compuestos bioactivos de interés biotecnológico? Lo que lleva al planteamiento de la siguiente hipótesis: Se encontrará una comunidad de bacterias extremófilas adaptadas a sobrevivir en sistemas hidrotermales someros, de las cuales, el componente cultivable tendrá la capacidad de producir compuestos que inhiben la formación de biopelículas bacterianas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar bacterias de sistemas hidrotermales someros marinos en Baja California Sur y su potencial producción de compuestos inhibidores de biopelículas.

4.2 Objetivos específicos

- 4.1.1** Estimar la diversidad bacteriana de tres sistemas hidrotermales someros marinos en B.C.S.
- 4.2.2** Aislar bacterias marinas heterótrofas asociadas a los distintos sistemas hidrotermales.
- 4.2.3** Analizar el potencial de las sustancias producidas por las bacterias aisladas como inhibidoras de QS.
- 4.2.4** Identificar molecularmente las cepas productoras de sustancias con actividad inhibitoria de QS.
- 4.2.5** Evaluar el efecto de extractos orgánicos de las bacterias marinas activas, en la inhibición de la formación de biopelículas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio y recolecta de muestras

Los tres sistemas hidrotermales someros de donde se recolectaron las muestras para la realización de este trabajo se encuentran en el estado de Baja California Sur, México. Ubicado al sur de la península de Baja California, en la región noroeste del país, limitando al norte con Baja California, al este con el Golfo de California y al sur y oeste con el océano Pacífico.

5.1.1 Bahía Concepción, Baja California Sur

Dos de los sitios de muestreo se encuentran en Bahía Concepción (Fig. 1-A). Ubicada al sureste del municipio de Mulegé y en la parte centro-oriental de la península de Baja California. A una latitud $26^{\circ} 33'$ y $26^{\circ} 53'$ N y entre los $111^{\circ} 42'$ y $111^{\circ} 56'$ de longitud oeste.

5.1.1.1 Área marina: Mapachitos, Bahía Concepción

Dentro de la Bahía se encuentra este sitio de muestreo, a una latitud: $26^{\circ} 40' 27.58''$ N y longitud: $111^{\circ} 50' 37.13''$ O, aproximadamente en la mitad de la bahía (Fig 1-B).

5.1.1.2 Área de manglar: Santispac, Bahía Concepción

Este lugar de muestreo se encuentra en Playa Santispac, dentro de Bahía Concepción, con una latitud: $26^{\circ} 45' 46.21''$ N y longitud: $111^{\circ} 53' 36.91''$ O (Fig. 1-C).

5.1.2 Área de línea de costa: El Sargento

La localidad El Sargento se encuentra al sur de la ciudad de La Paz, B.C.S., frente a Isla Cerralvo (Fig. 2) y la estación de donde se tomaron las muestras presenta una latitud aproximada: $24^{\circ} 6' 51.01''$ N y una longitud de $109^{\circ} 59' 54.80''$ O.

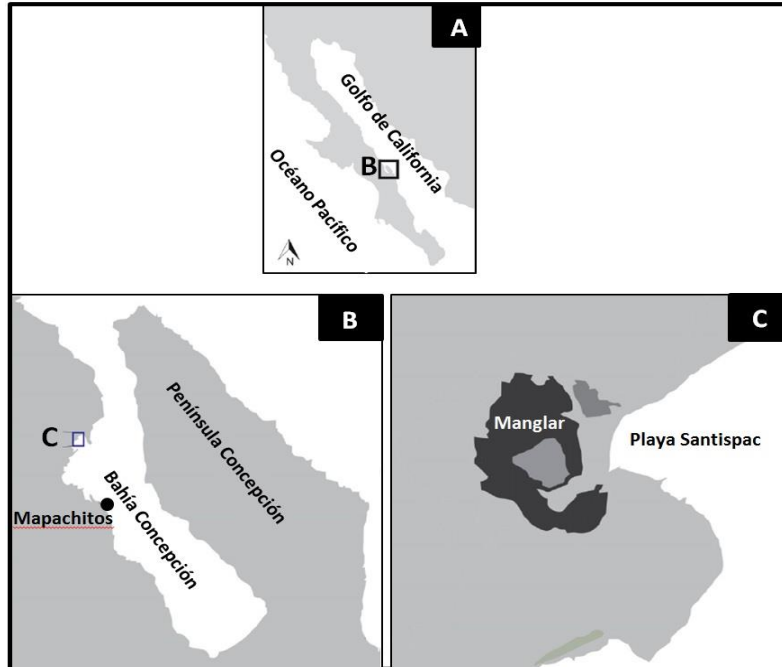


Figura 1. Mapas de Bahía Concepción (A) y de los dos sitios de recolecta dentro de la bahía: Mapachitos (B) y manglar Santispac (C). Modificados de Leal-Acosta & Prol-Ledesma (2016).

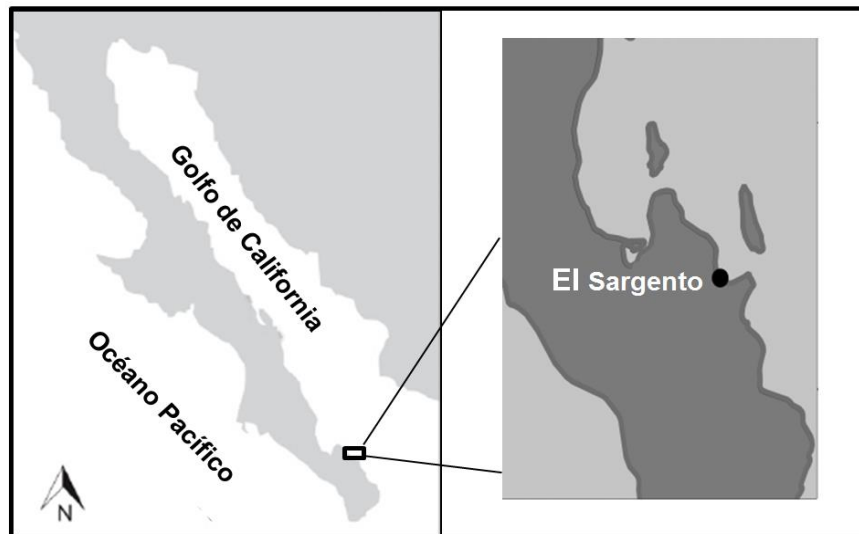


Figura 2. Localización del área de muestreo número tres, El Sargento, B.C.S Modificados de Leal-Acosta & Prol-Ledesma (2016) y de Mendoza-Cruz, *et al.* (2013).

5.1.3 Recolecta de muestras

Se llevaron a cabo muestreos en dos épocas del año para cada estación, temporada lluviosa-verano: septiembre 2016 y seca-invierno: febrero 2017. Las muestras de agua sólo se recolectaron de los dos sitios en Bahía Concepción, puesto que en la línea de costa de El Sargento no se observó ninguna grieta o ventila de donde emanara el fluido hidrotermal. La recolecta de agua se realizó con bolsas de polietileno estériles, directamente del fluido hidrotermal. El sedimento se recolectó de los tres sitios utilizando nucleadores de plástico de 15 cm de altura, previamente lavados con cloro y esterilizados con luz UV. Estas muestras se tomaron de las grietas observadas en el sedimento o de donde se registraban las mayores temperaturas (en caso de no observar grietas en el sedimento). En el caso de la estación marina Mapachitos, las muestras se tomaron mediante buceo SCUBA. El muestreo en El Sargento se realizó en la marea más baja, aproximadamente a dos metros de la línea de costa, cavando un metro y medio de profundidad.

De cada localidad se tomaron muestras en sitios control, seleccionados en áreas cercanas a las ventilas pero que no estuvieran influenciadas por los fluidos hidrotermales.

Las muestras obtenidas se dividieron con el fin del posterior análisis de la fracción bacteriana marina no cultivable y cultivable. Las que pertenecían a la primera fracción se preservaron en congelación. Con respecto a la cultivable, el sedimento se colocó en tubos de plástico de 50 mL con solución salina y posteriormente se inocularon en tubos del mismo tipo y volumen con Caldo Marino (CM: peptona de carne 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, 5 mg/L de sulfato ferroso (FeSO_4) y agua marina filtrada). Las muestras de agua se vertieron en tubos de plástico de 50 mL con CM. El tratamiento mencionado para la fracción cultivable se realizó en campo, en condiciones de esterilidad, utilizando mecheros Fisher. Los tubos resultantes se mantuvieron dentro de una hielera con sacos térmicos a 60°C. Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular (IPN-CICIMAR), donde se llevaron a cabo los análisis posteriores.

5.2 Secuenciación masiva de ácidos nucleicos

La fracción no cultivable preservada en congelación incluyó sólo las muestras de sedimento de los sitios muestreados, tanto de los sitios hidrotermales como de sitios control. Se colocó 1 gramo de sedimento en tubos de recolecta para preservar la muestra (DNA/RNA Shield-Fecal Collection Tube de Zymo Research) y posteriormente fueron enviados para el análisis de metagenómica por parte de la empresa Zymo Research, en Irvine, California, E.U.A. El servicio solicitado a la empresa incluyó la extracción y purificación de ADN de las muestras de sedimento (Mini Kit ZymoBIOMICS™ DNA), la preparación de la biblioteca resultante y el control de calidad posterior a la biblioteca. La secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S ARNr bacteriano la realizaron con Illumina y utilizaron la plataforma MiSeq.

Con los resultados de la secuenciación masiva se graficaron curvas de rarefacción para analizar el número de datos de la secuenciación. Se analizó la diversidad alfa bacteriana con el índice de Shannon-Weaver y la riqueza bacteriana con el índice de Chao1 de los datos de la empresa Zymo Research. Finalmente se graficó la composición taxonómica de las muestras a nivel de filo.

5.3 Aislamiento y caracterización bacteriana

Para analizar la fracción bacteriana cultivable se realizaron diluciones decimales en solución salina, en condiciones de esterilidad. Posteriormente se sembraron las diluciones en cajas Petri de plástico con Agar Marino (AM: agar bacteriológico 17 g/L, peptona de carne 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, 5 mg/L de FeSO₄ y agua marina filtrada). Las placas resultantes se incubaron a 35 y 60°C de 24 a 96 horas.

Al observarse crecimiento bacteriano en las placas incubadas, se purificaron las distintas colonias mediante la técnica de estría cruzada, confirmando su pureza con microscopio estereoscópico y por tinción de Gram. Las distintas cepas se criopreservaron en ultracongelación, para formar parte del cepario del laboratorio hasta su posterior uso. Con el fin de conocer si las cepas eran termotolerantes o termófilas, éstas se sembraron por duplicado en AM, colocándolas a temperatura de incubación de 35 y 60°C.

5.4 Evaluación de la presencia de actividad inhibidora de quorum sensing

En este ensayo se utilizó la cepa biosensora mutante *Chromobacterium violaceum* (CV026), la cual detecta de forma sencilla un amplio rango de moléculas señalizadoras AHLs. Para detectar la presencia de actividad IQS de las cepas aisladas se utilizó el método de McClean y colaboradores (1997). Las cepas se inocularon en microtubos de 1.5 mL con CM en sus condiciones de incubación respectivas (35 o 60°C). Después de 24 horas, a esos tubos se les añadieron 40 µL de moléculas señalizadoras C6HSL (N-hexanoyl-L-Homoserina lactona) previamente diluidas en DMSO. Los tubos permanecieron a temperatura ambiente por 24 horas y se centrifugaron. A la par, se inoculó la cepa *C. violaceum* CV026 hasta obtener una densidad óptica de 1 en medio líquido LB-Kan (Medio Luria Berthani: NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, kanamicina 25 µg/mL y agua destilada), dicha densidad fue leída con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm. Posteriormente se sembró la cepa CV026 de forma masiva en placas con LB. Estas placas fueron perforadas con sacabocados estériles. En los pozos se añadieron 40 µL del sobrenadante de los tubos con las cepas y las moléculas señalizadoras. Como control positivo se utilizó sólo el medio LB y como control negativo medio LB con la misma cantidad de moléculas señalizadoras. Este ensayo se realizó por triplicado. Finalmente, las placas con los pocillos se incubaron a 30°C por 24 horas y se analizaron los resultados.

5.6 Extracción de compuestos de cultivos bacterianos

A partir de cultivos bacterianos de 96 horas en 250 mL en CM de las cepas activas, se realizaron extracciones líquido-líquido. Primero el cultivo fue centrifugado, se recolectó el sobrenadante en un embudo de separación, se le se añadió la proporción 1:1 de acetato de etilo (1 L acetato de etilo: 100 mL ácido acético glacial) y fue agitado vigorosamente. Los extractos se evaporaron hasta sequedad a 45°C a presión reducida. Este procedimiento se realizó 3 veces (Lule, 2007; Nithyanand & Pandian, 2009). El extracto se preservó en congelación hasta su uso en ensayos posteriores.

5.7 Ensayos de inhibición de biopelículas bacterianas

Para probar la actividad de los extractos crudos orgánicos como inhibidores de la formación de biopelículas, se escogieron las siguientes bacterias formadoras de biopelículas: 2 de ellas estudiadas en el laboratorio por estar involucradas en el proceso de *biofouling* de superficies marinas sumergidas: *Virgibacillus* sp. C29 y *Vibrio alginolyticus* C96; 2 patógenas de humano terrestres: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Aeromonas caviae* Sch3; y una bacteria marina asociada a infecciones tanto humanas como de camarón en granjas de cultivo: *Vibrio parahaemolyticus* M8. Las cepas se inocularon por 24 horas a en sus medios nutritivos y temperaturas respectivas (Las dos cepas de *biofouling* y *V. parahaemolyticus* M8 en CM a 35°C, *P. aeruginosa* PAO1 en LB a 37°C y *A. caviae* en medio soya tripticaseína (TSB: peptona de caseína 17 g/L, peptona de soya 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2.5 g/L, dextrosa 2.5 g/L y agua destilada) a 30°C. Se realizaron tres diluciones de los extractos obtenidos con agua libre de nucleasas a concentraciones de 1,000, 100 y 10 mg/mL.

Después de que las cepas formadoras de biopelículas alcanzaron la densidad óptica de 1, leída con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm, se procedió a colocar 100 µL del cultivo en microplacas de 96 pocillos y posteriormente se añadió la misma cantidad de las diferentes diluciones de los extractos. El ensayo se realizó por triplicado. Como control negativo se contó con la cepa inoculada en el medio sin extracto y como blanco el medio de cultivo. Después de una incubación por 48 horas, se procedió a retirar el caldo con bacterias de las placas, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar. Posteriormente se les añadió cristal violeta 1% (p/v) y después de 45 min se removió. Se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y finalmente se agregaron 200 µL de alcohol etílico 96°. Finalmente se leyeron los resultados en un lector de microplacas a 570 nm (Álvarez *et al.*, 2006).

5.8 Identificación molecular de bacterias activas

Con el fin de identificar molecularmente las cepas que presentaron actividad inhibitoria de la formación de biopelículas, se realizaron distintos métodos de extracción de ADN,

posteriormente la amplificación de los genes 16S y rpoB por PCR y finalmente la secuenciación.

5.8.1 Extracción de ADN con el método Fenol-Cloroformo

Uno de los métodos más comunes que se utilizó es el de fenol-cloroformo de Sambrook & Russell (2001). Para ello, se centrifugaron cultivos bacterianos de 24 horas en microtubos con agua libre de nucleasas a 14000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El botón obtenido se resuspendió en 575 μ L de TE pH 8.0 (0.1 M Tris pH 7.6, 0.001 M EDTA pH 7.5), 30 μ L de SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio), 3 μ L de proteinasa K (10 mg/mL), se mezcló delicadamente y los tubos se incubaron dos horas a 37°C. Después se les añadió 100 μ L de NaCl 5M (Cloruro de sodio), se mezclaron y se incubaron 10 min a 65°C. Consecutivamente se agregó de 0.7 a 0.8 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (Fenol:CHCl₃: ISOOH Alcohol isoamílico) y se homogenizó, después se centrifugó 10 min a 14000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo. Fue añadido un volumen de Cloroformo-Alcohol Isoamílico al microtubo, se mezcló y fue centrifugado 10 min a 14000 rpm, se recuperó el sobrenadante. Se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol. Los microtubos fueron preservados a -20°C por 24 h. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C por 20 min, se decantó y se agregaron 500 μ L de etanol frío al 70%, se centrifugó nuevamente, se decantó el sobrenadante, estos últimos pasos se repitieron una vez más. Se dejó secar el botón de ADN y se resuspendió en 100 μ L de TE. Finalmente se agregaron 3 μ L de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 60°C por 10 min. El ADN se almacenó a -20°C hasta su próximo uso. La concentración de ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro UV-VIS de barrido de microgota.

5.8.2 Extracción de ADN - PCR de colonia

El método de PCR de colonia inició con la resuspensión de una o algunas colonias puras en microtubos de plástico con 15 μ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente los tubos se colocaron en un termociclador por 5 min a una temperatura de 95°C. El ADN se almacenó a -20°C.

5.8.3 Extracción de ADN con la Matriz InstaGene - Bio-Rad

Este método de extracción es con una matriz elaborada por Bio-Rad, y su protocolo consiste en resuspender colonias puras en 1 mL de agua libre de nucleasas, después se centrifugaron los tubos durante 10 min a 12,000 rpm a 4°C y se removió el sobrenadante. Se añadieron 200 µL de la matriz previamente agitada y las muestras se incubaron por 30 min a 56°C, después se homogenizó con vortex durante 10 seg e incubaron las muestras por 8 min a 100°C, se homogenizó por 10 seg y se centrifugó por 3 min a 12,000 rpm. Finalmente, el ADN se preservó a -20°C.

5.8.4 Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante PCR, para lo cual se realizó una mezcla de PCR con los siguientes componentes para una reacción de 50 µL: oligonucleótidos específicos para bacterias: 27F/1385R (GAGTTTGATCCTGGCTA/CGGTGTGTTCAAGGCC) o los oligos específicos para el género *Bacillus*: rpoB 1206F/rpoB 3202R (ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT/ACACCCTTGTTACCGTGACGACC), en concentración de 1 µL cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de DNTPs, 5 µL de regulador de PCR 10X, 2.5 µL de MgCl₂, 0.2 µL de Taq DNA polimerasa y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50 µL por reacción. Finalmente se añadió la mezcla a cada tubo y se agregó el ADN (50 ng/µL).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa para los oligonucleótidos 27F/1385R : Desnaturalización inicial: 95°C por 2 min, 29 ciclos de: Desnaturalización: 95°C por 1 min; Alineamiento de oligos: 58°C por 1 min; y Extensión, síntesis: 72°C por 1:30 min, finalmente una última extensión: 72°C por 10 min. Mientras que para los cebadores específicos para el género *Bacillus*, se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización inicial: 95°C por 3 min, 35 ciclos de: Desnaturalización: 95°C por 20 seg; Alineamiento de oligos: 55.9°C por 30 seg; y Extensión, síntesis: 72°C por 1:30 min, finalmente una última extensión: 72°C por 5 min.

La calidad del producto de PCR resultante se evaluó en un gel de agarosa al 1% con regulador de carga TBE 1X. Primero se tiñó cada muestra de 2 μ L de producto de PCR, añadiéndole 2 μ L de una mezcla de LB y Red Gel en una proporción 1:8, respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1,000 pares de bases. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con una fuente de poder a un voltaje de 75V. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a las oficinas centrales de la empresa MacroGene en Seúl, Corea del Sur. Al tener las secuencias, éstas se editaron con el programa FinchTV, posteriormente se ensamblaron con el programa Codon Code Aligner y se compararon con otras secuencias genéticas en la base de datos del GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de los sitios de muestreo

En la estación Mapachitos, Bahía Concepción se observó un burbujeo en la superficie del mar, ésto por el fluido hidrotermal que emana desde las grietas en el sedimento, a una profundidad de 10 a 15 metros. La temperatura registrada en el sitio osciló entre los 75 a 85°C.

El estero Santispac presenta una extensión aproximada de cuatro hectáreas con vegetación de manglar con 60% de cobertura, tiene un aporte de aguas subterráneas comunicándose con la bahía a través de un canal de aproximadamente 4 m de ancho y baja profundidad (Magallanes, 1992). En esta área fue posible observar un par de pozas que son parte del sistema hidrotermal con temperaturas registradas desde los 45 a 60°C; sin embargo, el burbujeo por parte del fluido hidrotermal sólo se observó dentro del manglar, en donde la temperatura registrada fue entre los 50 a 75°C.

La localidad El Sargento cuenta con una gran extensión de playas arenosas del Golfo de California y se encontraron manifestaciones termales en varias extensiones de su línea de costa sin poder observar una ventila o fluido hidrotermal. La temperatura registrada en este sitio se registró entre los 45 a 70 °C.

6.2 Caracterización de las comunidades bacterianas con secuenciación masiva

Con las muestras recolectadas de sedimento que se enviaron a la empresa ZymoResearch para la secuenciación masiva de ácidos nucleicos, se generaron datos de más de 100-200 mil lecturas de secuencias de 250 pb para cada muestra y el análisis composicional desde filo hasta especie para algunos casos.

6.2.1 Curvas de rarefacción

Para demostrar que los datos de la secuenciación masiva de las muestras de sedimento recolectadas son suficientes para analizar la diversidad, se realizaron las curvas de rarefacción (Fig. 3). Las cuales alcanzaron la típica fase de meseta o

plateau, indicando que efectivamente se obtuvieron datos de secuenciación suficientes para analizar diversidad en estas muestras.

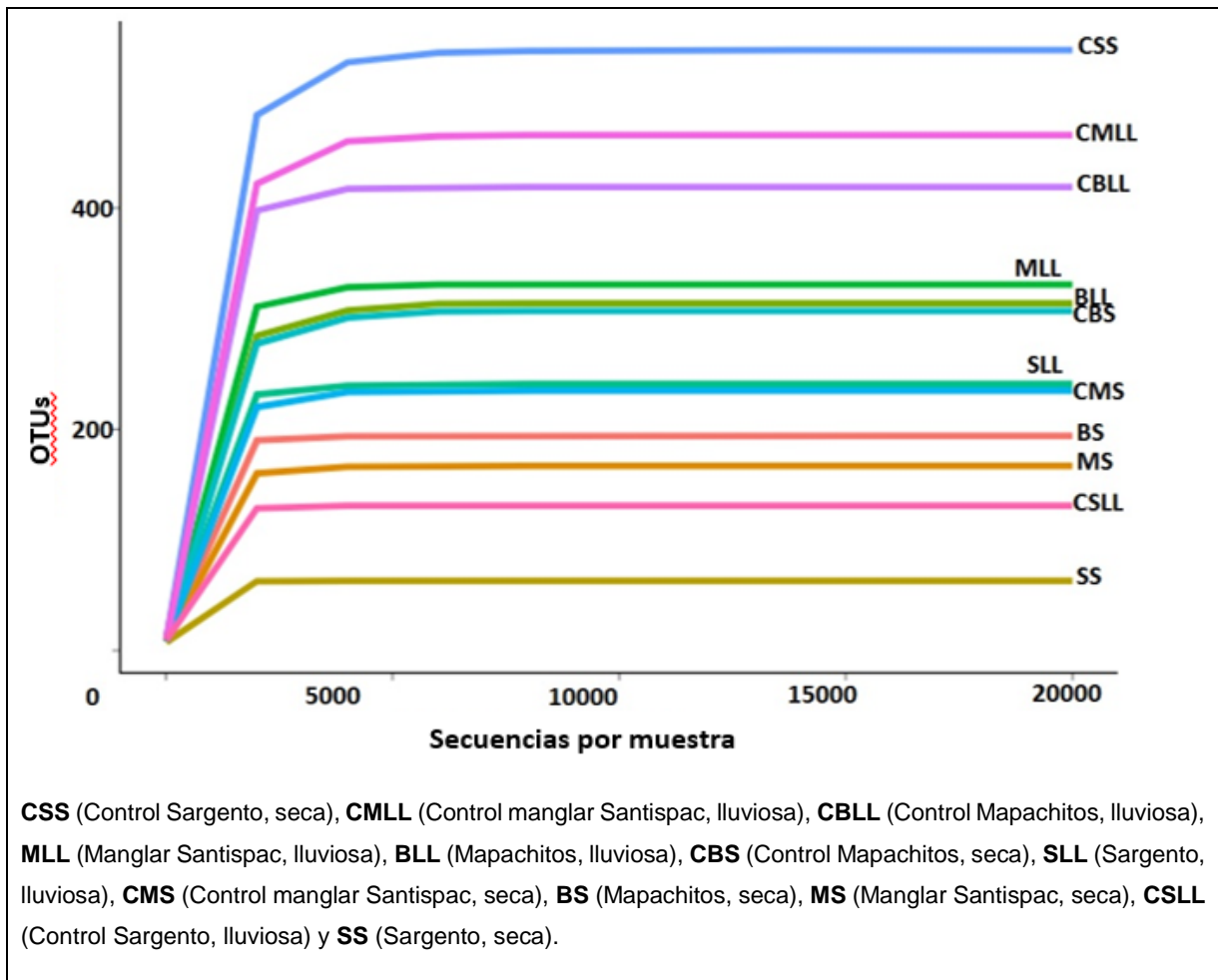


Figura 3. Curvas de rarefacción obtenidas de la secuenciación masiva de las muestras de sedimento.

6.2.2 Diversidad alfa bacteriana

Utilizando los datos de la profundidad de secuenciación de 10,005 lecturas por muestra para normalizar, se obtuvieron los valores de diversidad con el índice de Shannon–Weaver. La diversidad se encuentra entre 4.6 (El Sargento, temporada seca) y 8.6 (Control de El Sargento, temporada seca) (Fig. 4).

En general los valores de diversidad más altos, contemplando sólo las muestras de ventilas, fueron los obtenidos de los sedimentos del sitio manglar Santispac en

temporada lluviosa (MLL); mientras que las muestras que presentaron menor diversidad en general fueron de El Sargento en temporada seca (SS).

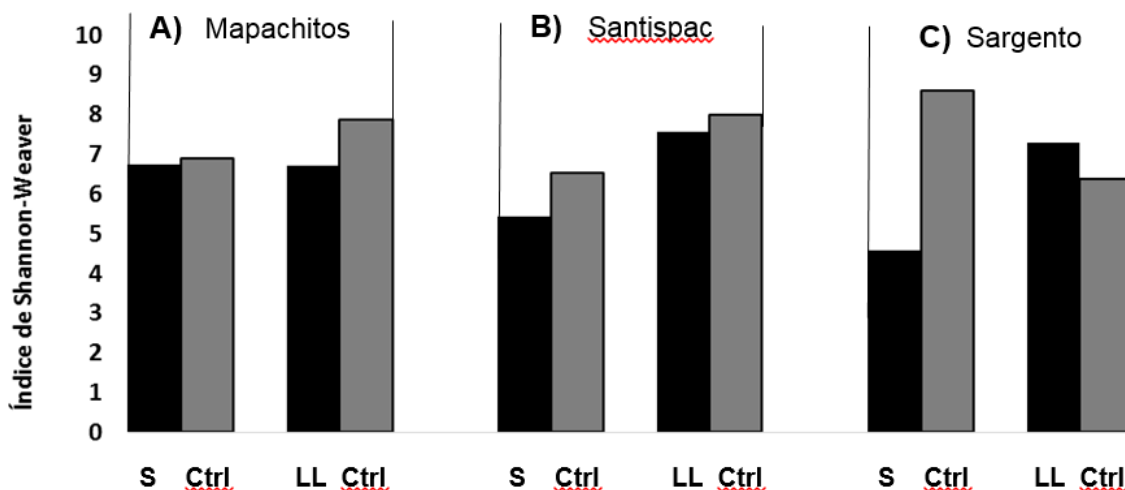


Figura 4. Análisis de diversidad alfa con el índice Shannon-Weaver de las muestras de sedimento de los distintos sitios de muestreo en las dos temporadas. **A)** Muestras de Mapachitos. **B)** Muestras de manglar Santispac. **C)** Muestras de El Sargento. **S** (Temporada seca), **LL** (Temporada lluviosa), **Ctrl** (Control de la muestra).

En la Fig. 4 se puede observar que la diversidad en las ventilas de Mapachitos fueron similares en las dos temporadas (6.8 secas y 6.7 lluviosas), compartiendo valores similares con la zona control de la temporada seca (6.9), mientras que en la temporada de lluvias de la zona control sí se observó un aumento en el índice de diversidad (7.9). En las dos temporadas se aprecia una mayor diversidad en los sitios control que en los de ventilas.

Con respecto al sitio del manglar Santispac, se observa que la diversidad sí varió en las dos épocas, tanto en los sitios de ventilas como en los controles (Temporada seca: 5.4 y temporada lluviosa: 7.6; control secas: 6.5 y control lluviosas: 8). Se observa mayor diversidad en la temporada lluviosa tanto para el sitio de ventila como de control. Las muestras de los sitios control presentaron mayor diversidad que las de ventilas independientemente de la temporada de recolecta.

El Sargento fue el sitio con mayores diferencias en valores de diversidad entre los sitios de ventilas por épocas y con sus respectivos controles, puesto que en cuanto a los sitios de ventilas, el de temporada seca presentó menor diversidad (4.6), mientras que se observó mayor para el de lluviosa (7.3). Con respecto a los controles, el de temporada seca presentó mayor diversidad (8.6) que el de temporada lluviosa (6.4) y esta última muestra fue el único control con menor diversidad que su sitio de ventila, ya que en todos los sitios y temporadas, los controles presentaron mayor diversidad que los de ventila.

6.2.3 Riqueza bacteriana

Del análisis de la estimación de riqueza de especies bacterianas, mediante el índice Chao1, a una profundidad de secuenciación de 10,005 lecturas por muestra, se obtuvo que el menor número de OTUs estimados de la biblioteca fue de 63 (Sargento, temporada seca), mientras que el valor mayor fue de 543 (Control Sargento, temporada seca) (Fig. 5).

Además se observó que la riqueza de especies; al igual que la diversidad, fue mayor en sitios control. Exceptuando la muestra de El Sargento en temporada lluviosa con su control.

En general todas las muestras de sedimento de los diferentes sistemas hidrotermales mostraron una variación temporal en la riqueza estimada por el índice Chao 1. Las muestras de las ventilas de Mapachitos presentaron una diferencia en las OTUs durante las dos temporadas analizadas (194 en secas y 314 en lluvias), lo mismo se puede observar para el manglar de Santispac con una estimación de riqueza mayor durante la temporada de lluvias (167 y 331 OTUs respectivamente). Mientras que en El Sargento la menor riqueza se encontró también durante la época seca (63 OTUs), siendo muy notoria la diferencia con respecto al número de OTUs obtenidos en la época de lluvias (241).

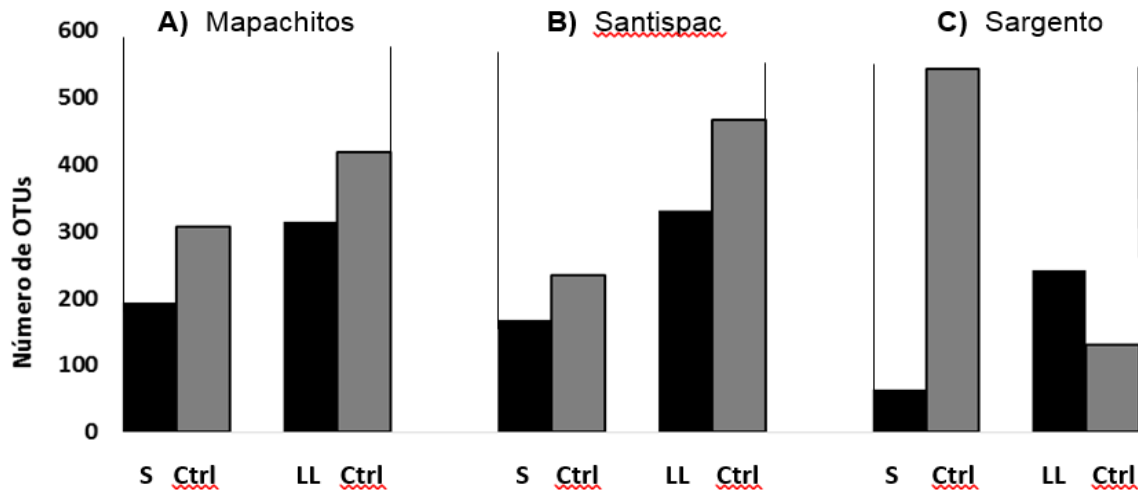


Figura 5. Análisis de riqueza bacteriana mediante el índice Chao1, de las muestras de sedimento de los distintos sitios de muestreo en las dos temporadas. **A)** Muestras de Mapachitos. **B)** Muestras de manglar Santispac. **C)** Muestras de El Sargento. **S** (Temporada seca), **LL** (Temporada lluviosa), **Ctrl** (Control de la muestra).

Con respecto a los sitios control, se observa el mismo comportamiento que al analizar la diversidad alfa, puesto que las muestras de esos sitios presentaron mayor diversidad que los sitios de ventilas, independientemente de la temporada, exceptuando las muestras del El Sargento temporada lluviosa, ya que su control presentó menor riqueza que el sitio de ventila.

6.2.4 Asignación taxonómica de los microbiomas

Los resultados obtenidos de la secuenciación masiva de ácidos nucleicos de la fracción bacteriana se observan en la Tabla I, dentro de ella se encuentra el número de OTUs perteneciente a cada nivel taxonómico de las muestras analizadas. En dicha tabla se encuentran subrayados los valores mayores y menores de cada nivel taxonómico.

Tabla I. Número de OTUs identificadas a nivel taxonómico.

Sitios de muestreo, temporada	Dominios	Filos	Clases	Órdenes	Familias	Géneros	Especies
Mapachitos, seca	1	20	37	68	85	20	1
Control Mapachitos, seca	2	26	54	84	98	11	1
Mapachitos, lluviosa	2	29	57	100	130	33	2
Control Mapachitos, lluviosa	2	23	48	78	106	24	2
Santispac, seca	2	21	39	68	84	9	1
Control Santispac, seca	2	24	46	72	83	9	1
Santispac, lluviosa	2	31	61	100	124	32	5
Control Santispac, lluviosa	2	18	46	75	111	20	1
Sargento, seca	2	13	23	33	39	7	4
Control Sargento, seca	2	24	56	91	129	32	2
Sargento, lluviosa	2	21	49	77	100	28	3
Control sargento, lluviosa	2	16	37	58	73	17	1

En la tabla I se puede observar que sólo en el sitio de Mapachitos en temporada seca, se identificó un dominio (Eubacteria), mientras que en los demás se registraron dos (Arqueaea y Eubacteria).

De igual manera que en la diversidad alfa y riqueza bacteriana, se observa que los sitios de ventila con mayor número de grupos taxonómicos fueron los de temporadas lluviosas, siendo aún mayores que sus respectivos controles.

En general los sitios con menor y mayor número de OTUs coincidiendo en los niveles tanto de Filos como de Clases son: Sargento, temporada seca (menor número de OTUs) y manglar Santispac, temporada lluviosa (mayor número de OTUs). A nivel de órdenes, las muestras con mayor número de OTUs son: Mapachitos, temporada lluviosa y manglar Santispac, temporada lluviosa; mientras que la muestra con menor número es la muestra de El Sargento, temporada seca. En el nivel de familias, la muestra de Mapachitos en temporada lluviosa presentó un mayor número de OTUs; mientras que la muestra de El Sargento, temporada seca, presentó menor número. Con respecto al nivel de géneros, se identificaron en mayor número en el sitio de Mapachitos, temporada lluviosa; mientras que el menor número de géneros se

identificó en el sitio de El Sargento, temporada seca. Se identificaron hasta nivel de especie un total de 13 microorganismos (Tabla II).

Tabla II. Especies identificadas con secuenciación masiva en las distintas muestras.

Especie/Sitio	Map S	Ctrl Map S	Map LL	Ctrl Map LL	Sant S	Ctrl Sant S	Sant LL	Ctrl Sant LL	Sarg S	Ctrl Sarg S	Sarg LL	Ctrl Sarg LL
<i>Propionibacterium acnes</i>		X		X			X		X		X	X
<i>Halosimplex carlsbadense</i>							X					
<i>Archaeoglobus veneficus</i>			X				X					
<i>Collinsella aerofaciens</i>								X				
<i>Ardenscatena maritimus</i>			X						X		X	
<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>										X		
<i>Staphylococcus aureus</i>						X	X					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>										X		
<i>Clostridium perfringens</i>					X							
<i>Paracoccus aminovorans</i>									X			
<i>Acinetobacter johnsonii</i>											X	
<i>Spirochaeta thermophila</i>	X						X					
<i>Anaerospira hongkongensis</i>				X					X			

6.2.5 Composición taxonómica a nivel de filo

Debido a que este nivel taxonómico se identificó en todas las muestras, se realizaron gráficos correspondientes al porcentaje de secuencias analizadas a nivel de filos de

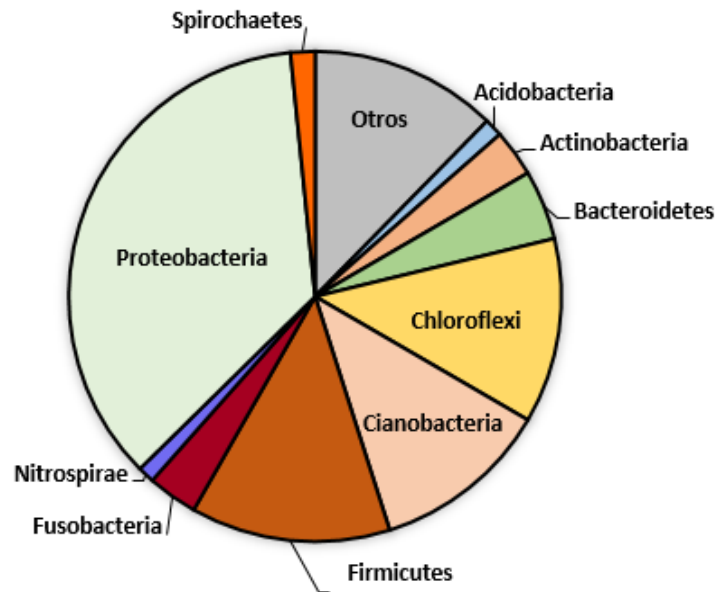
cada muestra. Los datos crudos se encuentran en la tabla del anexo 2. En los gráficos se contemplaron sólo los filos con mayor porcentaje de abundancia.

Los filos taxonómicos que compartieron todas las muestras son: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes y Proteobacteria. El filo con mayor proporción en general fue el Proteobacteria.

Los filos taxonómicos que sólo se encontraron en un sitio son: AncK6, GAL15 (Sargento, temporada lluviosa); BHI80-139 y NC10 (Control Mapachitos, temporada lluviosa); WS6, Poribacteria, OP11 y Deferribacteres (manglar Santispac, temporada lluviosa); WPS-2 (Control Mapachitos, temporada seca); Aquificae, EM3, Thermotogae, OP9, SR1 y LCP-89 (Mapachitos, temporada lluviosa).

Con respecto a los gráficos siguientes (Fig. 6) y a la tabla del anexo 2, al comparar el sitio Mapachitos de temporada seca con su control, se observa que los filos que comparten ambas muestras son: Acidobacteria (Ventila: 1.2% y Control: 3.7%), Actinobacteria (Ventila: 3.1% y Control: 29.7%), Bacteroidetes (Ventila: 4.6% y Control: 1.7%), Caldithrix (Ventila: 5.9% y Control: 0.9%), Chloroflexi (Ventila: 12.2% y Control: 11.2%), Cianobacteria (Ventila: 11.7% y Control: 1%), Firmicutes (Ventila: 13.1% y Control: 0.6%), Nitrospira (Ventila: 1.1% y Control: 2.1%), Proteobacteria (Ventila: 35.8% y Control: 21.7%), Caldithrix (Ventila: 0.1% y Control: 1.1%), WS3 (Ventila: 0.7% y Control: 0.1%), Verrucomicrobia (Ventila: 0.8% y Control: 0.4%), Spirochaetes (Ventila: 1.6% y Control: 0.1%), Planctomycetes (Ventila: 0.6% y Control: 0.7%), OP8 (Control: 0.2% y Ventila: 0.2%), GN04 (Ventila: 0.4% y Control: 0.2%) y GN02 (Ventila: 0.1% y Control: 0.2%). Los filos que sólo se encontraron en la muestra de ventila son: Fusobacteria (3.3%), KSB3 (0.3%) y Chlorobi (0.5%). Los filos que sólo se encontraron en la muestra control son: Crenarchaeota (0.2%), Euryarchaeota (0.2%), BRC1 (0.7%), Gemmatimonadetes (8.3%), NC10 (0.1%), OD1 (0.1%) y TM7 (0.2%). Un total de 20 filos fueron identificados en la muestra de Mapachitos, temporada seca y 24 filos fueron identificados su control.

A) Mapachitos, temporada seca



B) Control mapachitos, temporada seca

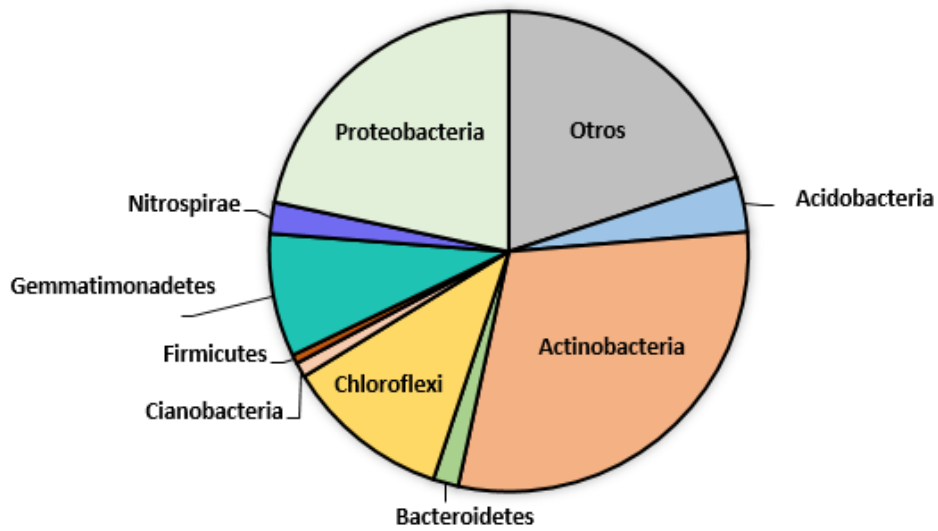


Figura 6. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras **A)** Mapachitos, temporada seca y **B)** su control.

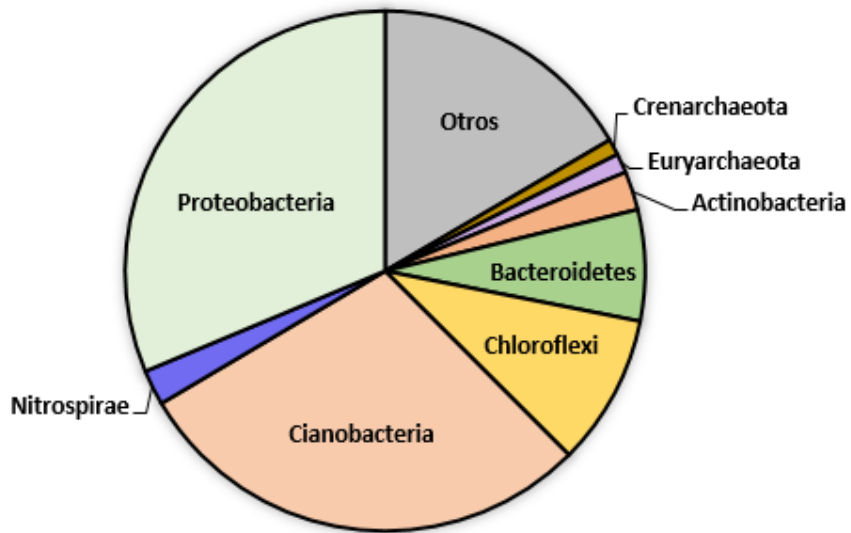
Con respecto a los gráficos siguientes (Fig. 7) y a la tabla del anexo 2, al comparar el sitio Mapachitos de temporada lluviosa con su control, se observa que los filos que comparten ambas muestras son: Crenarchaeota (Ventila: 1% y Control: 0.1%), Euryarchaeota (Ventila: 1.2% y Control: 0.1%), Acidobacteria (Ventila: 0.5% y Control: 6.1%), Actinobacteria (Ventila: 2.4% y Control: 9.6%), Bacteroidetes (Ventila: 6.9% y Control: 5.1%), Caldithrix (Ventila: 2.7% y Control: 0.3%), Chloroflexi (Ventila: 9.4% y Control: 2.2%), Cyanobacteria (Ventila: 29% y Control: 31%), Firmicutes (Ventila: 0.4% y Control: 1.4%), Nitrospira (Ventila: 2.2% y Control: 0.6%), OP1 (Control: 2% y Ventila: 0.1%), Planctomycetes (Ventila: 0.2% y Control: 0.5%), Proteobacteria (Ventila: 31.3% y Control: 38.7%), Spirochaetes (Ventila: 0.1% y Control: 0.5%) Verrucomicrobia (Ventila: 0.4% y Control: 1.3%), WS3 (Ventila: 0.5% y Control: 0.1%), Caldithrix (Ventila: 0.5% y Control: 0.2%).

Los filos que sólo se encontraron en la muestra de ventila son: Parvarchaeota (0.1%), Aquificae (0.2%), Chlorobi (0.2%), EM3 (0.4%), Fibrobacteres (0.1%), Fusobacteria (0.1%), OP8 (0.4%), OP9 (0.1%), SC4 (0.1%), Thermotogae (0.2%).

Los filos que sólo se encontraron en la muestra control son: BHI80-139 (0.1%), BRC1 (0.1%), Gemmatimonadetes (0.1%), NKB19 (0.1%), OD1 (0.1%), TM7 (0.2%).

Un total de 29 filos fueron identificados en la muestra de Mapachitos, temporada lluviosa y 23 filos fueron identificados en su control.

A) Mapachitos, temporada lluviosa



B) Control Mapachitos, temporada lluviosa

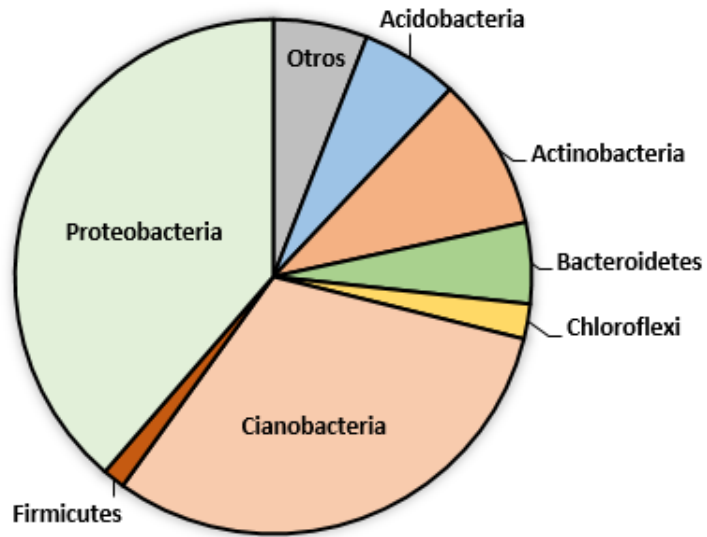


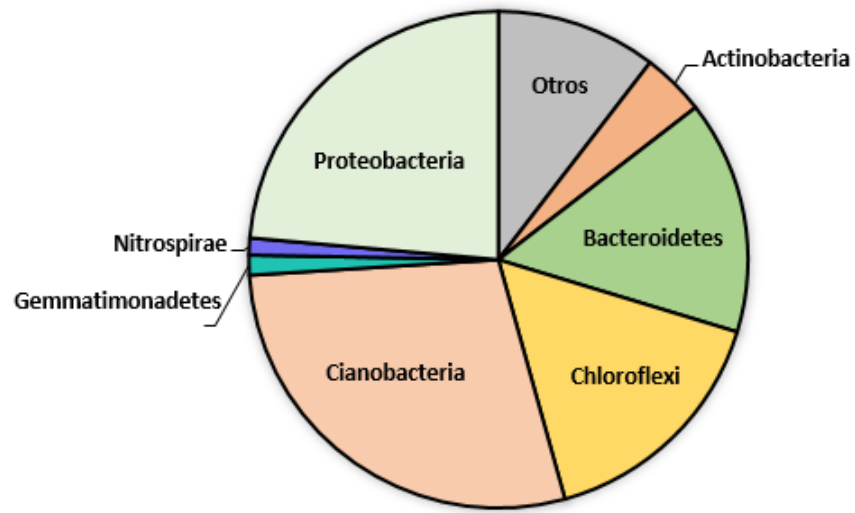
Figura 7. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras **A)** Mapachitos, temporada lluviosa y **B)** su control.

Con respecto a los resultados generales de las cuatro muestras del sitio Mapachitos, Bahía Concepción, se puede observar en las figuras 6 y 7 que en la temporada seca la muestra de ventila con su control tuvo muchas diferencias en cuanto a composición taxonómica, sobre todo en que el filo más dominante en el sitio de ventila fue Proteobacteria (35.8%), mientras que en su control fue Actinobacteria (29.7%). Sin embargo, en los gráficos del mismo sitio pero temporada lluviosa, no se aprecia tanta diferencia, puesto que el filo más dominante en ambas muestras fue Proteobacteria (Ventila: 31.3% y Control: 38.7%), seguido del filo Cyanobacteria (Ventila: 29% y Control: 31%). De acuerdo a las muestras de ventila en sus dos temporadas, no se observa gran diferencia en el filo dominante, siendo Proteobacteria (Seca: 35.8% y Lluviosa: 31.3%), sin embargo, se observa una notoria diferencia entre épocas ya que el filo Cyanobacteria fue más dominante en época lluviosa (29%) que en temporada seca (11.7%). Así como también en el filo Firmicutes, del cual en temporada seca se observó un 13.1% de abundancia, mientras que en temporada lluviosa sólo el 0.4%.

Los gráficos de la Figura 8 exponen los porcentajes de abundancia de los filios con mayor abundancia del sitio manglar Santispac de temporada seca con su control. Se observa que los filios que comparten ambas muestras son: Acidobacteria (Ventila: 0.6% y Control: 3.2%), Actinobacteria (Ventila: 4.1% y Control 31.8%), BRC1 (Ventila: 0.6% y Control: 1%), Bacteroidetes (Ventila: 15.2% y Control: 1.1%), Caldithrix (Ventila: 1.3% y Control: 1%), Chloroflexi (Ventila: 16% y Control: 9.3%), Cyanobacteria (Ventila: 28.3% y Control: 0.7%), GN04 (Ventila: 0.2% y Control: 0.2%), Gemmatimonadetes (Ventila: 1.3% y Control: 10.1%), Nitrospira (Ventila: 1.1% y Control: 2.3%), OP1 (Ventila: 0.1% y Control: 0.1%), OP8 (Ventila: 1.8% y Control: 0.1%), Planctomycetes (Ventila: 0.5% y Control: 0.5%), Proteobacteria (Ventila: 23.6% y Control: 24.8%), Verrucomicrobia (Ventila: 0.2% y Control: 0.2%), WS3 (Ventila: 0.1% y Control: 0.2%) y Caldithrix (Ventila: 0.4% y Control: 0.9%).

Los filios que sólo se encontraron en la muestra de ventila son: Crenarchaeota (0.6%), Firmicutes (0.3%) y OP11 (0.3%).

A) Manglar Santispac, temporada seca



B) Control manglar Santispac, temporada seca

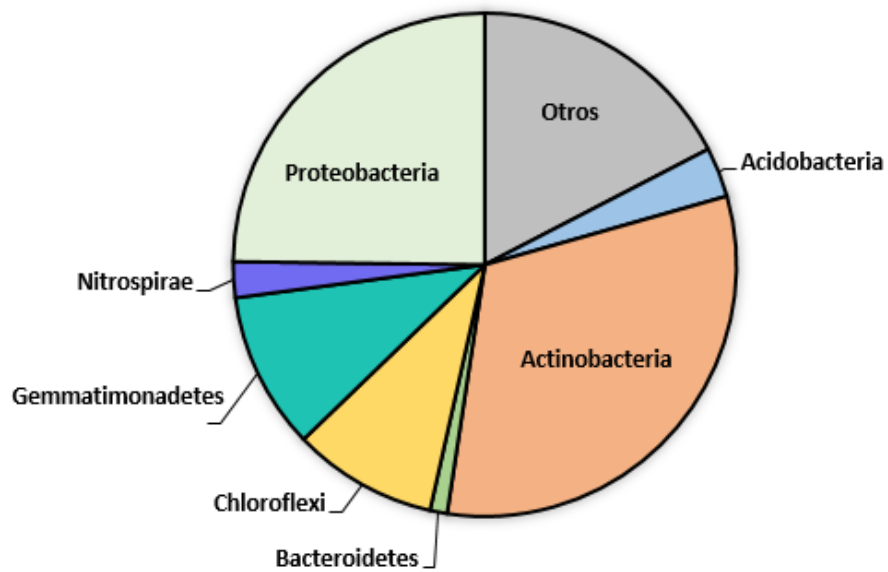


Figura 8. Composición bacteriana a nivel de las muestras **A)** manglar Santispac, temporada seca y **B)** su control.

Los filios que sólo se encontraron en la muestra control de manglar Santispac, temporada seca son: Euryarchaeota (0.7%), Fibrobacteres (0.1%), GN02 (0.1%), OD1 (0.1%), SBR1093 (0.1%), Spirochaetes (0.1%), TM7 (0.1%) y Thermi (0.2%).

Un total de 21 filios fueron identificados en la muestra de manglar Santispac, temporada seca y 24 filios fueron identificados en su control.

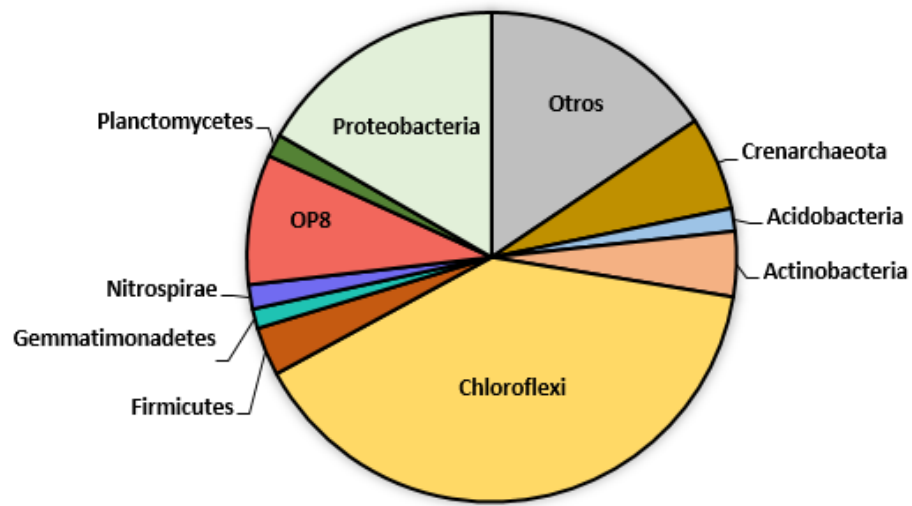
Los gráficos de la figura siguiente (Fig. 9) exponen los porcentajes de abundancia de filios del sitio manglar Santispac de temporada lluviosa con su control. Se observa que los filios que comparten ambas muestras son: Crenarchaeota (Ventila: 6.2% y Control: 1.2%) Acidobacteria (Ventila: 1.5% y Control: 2.6%), Actinobacteria (Ventila: 4.3% y Control: 10.7%), Bacteroidetes (Ventila: 0.8% y Control: 4.9%), Caldithrix (Ventila: 1% y Control: 0.1%), Chloroflexi (Ventila: 39.5% y Control: 1.8%), Cianobacteria (Ventila: 0.9% y Control: 37.8%), Firmicutes (Ventila: 3.2% y Control: 0.4%), Gemmatimonadetes (Ventila: 1.3% y Control: 0.2%), Nitrospira (Ventila: 1.6% y Control: 0.2%), Planctomycetes (Ventila: 1.5% y Control: 0.6%), Proteobacteria (Ventila: 16.7% y Control: 36.4%), Spirochaetes (Ventila: 0.4% y Control: 0.1%) y TM7 (Ventila: 0.1% y Control: 0.1%), Verrucomicrobia (Ventila: 0.5% y Control: 1.8%).

Los filios que sólo se encontraron en la muestra de ventila son: Euryarchaeota (0.8%), Parvarchaeota (0.1%), OP8 (0.2%), Chlorobi (0.2%), Deferribacteres (0.2%), Fibrobacteres (0.1%), KSB3 (0.1%), OD1 (0.2%), OP1 (1.2%), OP11 (0.6%), OP8 (8.6%), Poribacteria (0.1%), SC4 (0.2%), WS6 (0.1%) y Caldithrix (0.8%).

Los filios que sólo se encontraron en la muestra control son: NKB19 (0.1%), SBR1093 (0.4%) y WS3 (0.1%).

Un total de 31 filios fueron identificados en la muestra de manglar Santispac, temporada lluviosa y 18 filios fueron identificados en su control.

A) Manglar Santispac, temporada lluviosa



B) Control manglar Santispac, temporada lluviosa

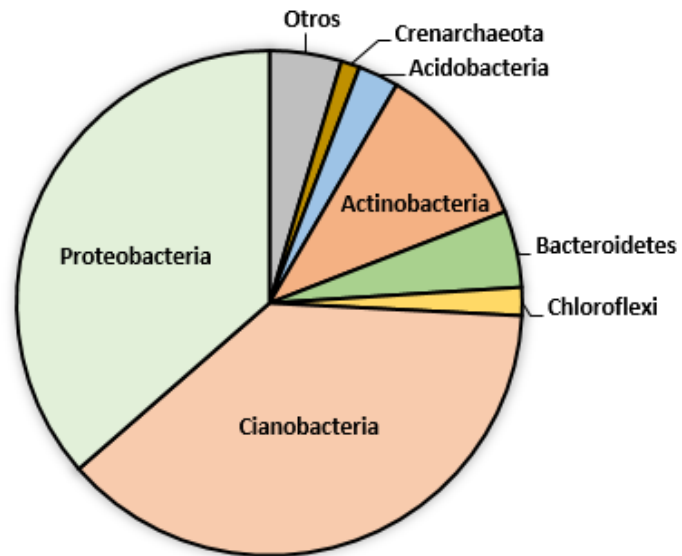
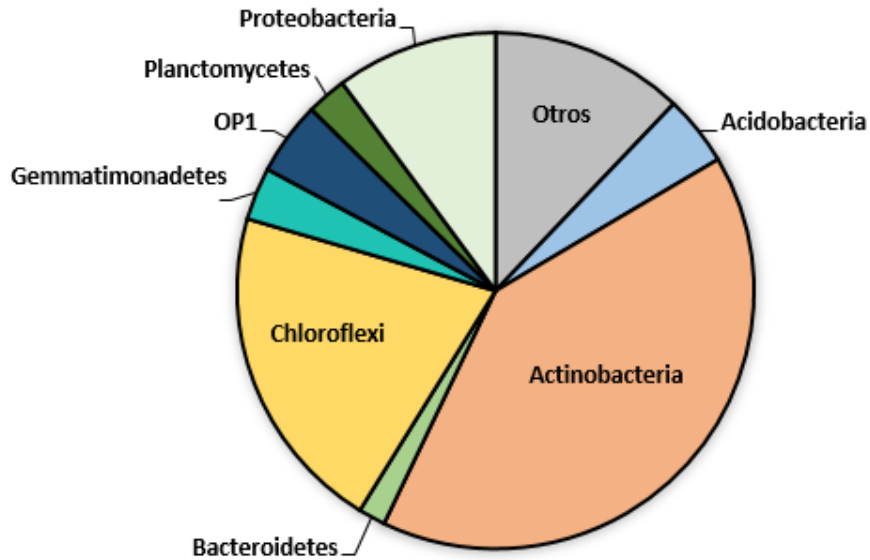


Figura 9. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras **A)** manglar Santispac, temporada lluviosa y **B)** su control.

De acuerdo a los datos de las cuatro gráficas del sitio manglar Santispac (Fig. 8 y 9), es posible observar que los grupos dominantes del sitio de ventila temporada seca y su control son diferentes puesto que en el primero, el filo Cianobacteria es el más dominante (28.3%), mientras que en su control fue el filo Actinobacteria (31.8%); del mismo modo, la muestra de ventila en temporada lluviosa difiere con su control en sus filos dominantes, puesto que en la muestra de ventila su filo dominante fue Chloroflexi (39.5%), mientras que el de su control fue Cianobacteria (37.8%), este último más cercano al sitio de ventila de temporada seca que el de su respectiva temporada. Se pueden observar diferencias en la composición taxonómica de microorganismos entre temporadas, sin embargo, algunos filos se mantuvieron con similar porcentaje, tales como el Actinobacteria (lluviosa: 4.1% y seca: 4.3%), Nitrospirae (lluviosa: 1.1% y seca: 1.6%), Gemmatimonadetes (1.3% en ambas temporadas). Se puede observar también que el filo Cianobacteria en temporada seca (28.3%) fue mucho mayor que en temporada lluviosa (0.9%). En cuanto a los controles es posible observar que entre uno y otro difieren tanto en grupos, dominancia y en porcentaje de abundancia y no se encuentran similitudes.

La siguiente gráfica (Fig. 10) expone los dos gráficos con los porcentajes de abundancia de filos del sitio El Sargento, temporada seca con su control. Se observa que los filos que comparten ambas muestras son: Crenarchaeota (Ventila: 0.3% y Control: 1.5%), Acidobacteria (Ventila: 4.4% y Control: 9.3%), Actinobacteria (Ventila: 40.8% y Control: 15.6%), Bacteroidetes (Ventila: 1.7% y Control: 6.2%), Chloroflexi (Ventila: 20.7% y Control: 5%), Firmicutes (Ventila: 0.4% y Control: 8.2%), Gemmatimonadetes (Ventila: 3.3% y Control: 1%), Nitrospira (Ventila: 0.8% y Control: 2.2%), Planctomycetes (Ventila: 2.5% y Control: 1.2%), Proteobacteria (Ventila: 10.1% y Control: 34.1%), SBR1093 (Ventila: 1.7% y Control: 0.2%), Verrucomicrobia (Ventila: 3.2% y Control: 2%). El filo que sólo se encontró en la muestra de ventila es OP1 (4.6%). Los filos que sólo se encontraron en la muestra control son: Euryarchaeota (0.7%), BRC1 (0.1%), Caldithrix (0.1%), Chlorobi (10%), Cianobacteria (8.2%), GN02 (0.2%), NKB19 (0.1%), TM6 (0.7%), TM7 (1.2%), WS3 (0.3%) y Caldithrix (0.2%). Un total de 13 filos fueron identificados en la muestra de El Sargento, temporada seca y 24 filos fueron identificados en su control.

A) Sargento, temporada seca



B) Control Sargento, temporada seca

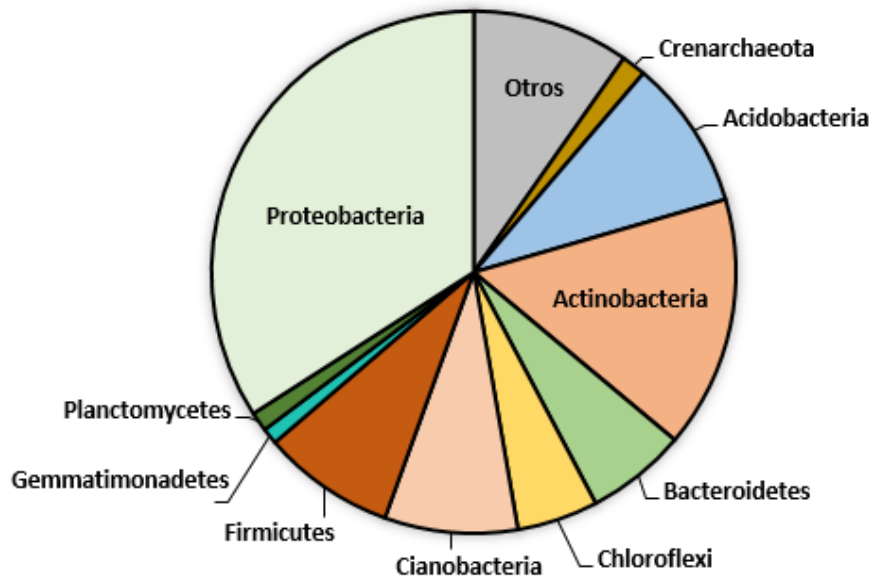


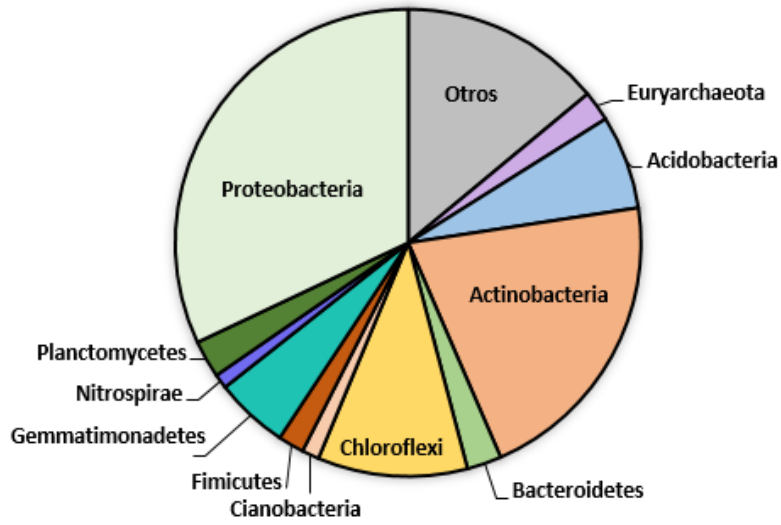
Figura 10. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras **A)** El Sargento, temporada seca y **B)** su control.

Los gráficos siguientes (Fig. 11), expone los dos gráficos con los porcentajes de abundancia de filos del sitio El Sargento, temporada lluviosa con su control.

Se observa que los filos que comparten ambas muestras son: Crenarchaeota (Ventila: 0.7% y Control: 0.3%), Euryarchaeota (Ventila: 2.1% y Control: 2.3%), Acidobacteria (Ventila: 6.5% y Control: 9.2%), Actinobacteria (Ventila: 20.9% y Control: 23.3%), Bacteroidetes (Ventila: 2.4% y Control: 3%), Chloroflexi (Ventila: 10.4% y Control: 6.7%), Cyanobacteria (Ventila: 1.2% y Control: 1%), Firmicutes (Ventila: 1.8% y Control: 2.1%), Gemmatimonadetes (Ventila: 5.1% y Control: 4.9%), Planctomycetes (Ventila: 2.6% y Control: 2.6%), Proteobacteria (Ventila: 32% y Control: 36.6%), Caldithrix (Ventila: 0.5% y Control: 1.7%) y Thermi (Ventila: 0.2% y Control: 0.6%). Los filos que sólo se encontraron en la muestra de ventila son: Parvarchaeota (0.3%), OP8 (0.3%), AncK6 (0.1%), GAL15 (0.1%), Nitrospira (1%), OP1 (0.8%), SBR1093 (0.1%) y TM7 (0.2%). Un total de 21 filos fueron identificados en la muestra de El Sargento, temporada lluviosa y 16 filos fueron identificados en su control.

Tal como se observa en los gráficos del sitio El Sargento (Fig. 10 y 11), la composición taxonómica a nivel de filos entre el sitio de ventilas de El Sargento en temporada seca y su control, difieren en todo, desde el filo dominante que para el sitio de ventila es Actinobacteria (40.6%) y para su control es Proteobacteria (34.1%), hasta los porcentajes de presencia de todos los filos que se identificaron en ambas muestras. Sin embargo, en la temporada lluviosa la muestra de ventila y su control presentan altas similitudes en sus composiciones taxonómicas a nivel de filos; el filo dominante de ambos es Proteobacteria (ventila: 32% y control: 36.6%), el siguiente filo que sigue en dominancia para ambas muestras es Actinobacteria (ventila: 20.9% y control: 23.3%). Se puede observar que existen valores iguales o parecidos en los porcentajes de abundancia para distintos filos, por ejemplo, Planctomycetes (2.6% en ambas muestras), Gemmatimonadetes (ventila: 5.1% y control: 4.9%), Cyanobacteria (ventila: 1.2% y control: 1%), Euryarchaeota (ventila: 2.1% y control: 2.3%), Bacteroidetes (ventila: 2.4% y control: 3%) y Firmicutes (ventila: 1.8% y control: 2.1%).

A) Sargento, temporada lluviosa



B) Control Sargento, temporada lluviosa

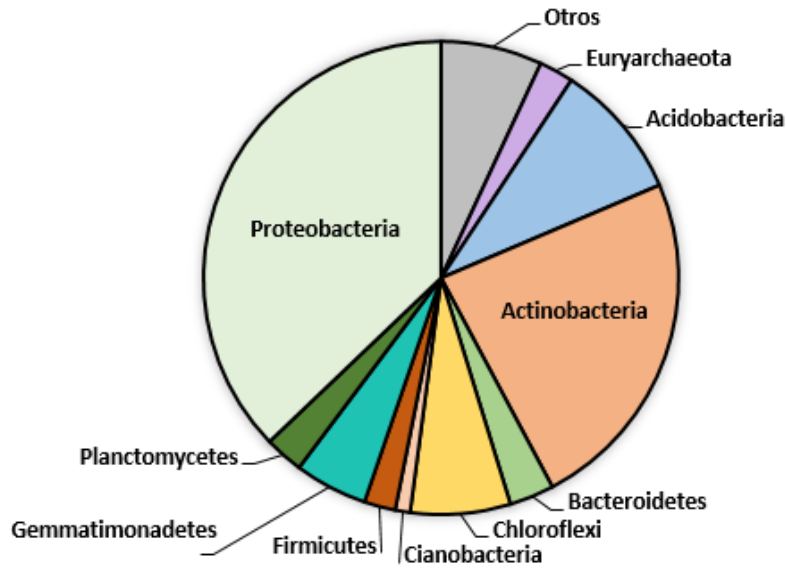


Figura 11. Composición bacteriana a nivel de filos de las muestras **A)** El Sargento, temporada lluviosa y **B)** su control.

Es posible afirmar que estas últimas dos muestras de El Sargento en temporada seca, son aquellas que más coinciden en composición taxonómica entre una muestra de ventila y su control de todas las muestras estudiadas, puesto que sus composiciones taxonómicas son muy parecidas entre sí.

6.3 Bacterias marinas aisladas de los distintos sistemas hidrotermales someros

Se aislaron 214 cepas de bacterias en agar marino de los distintos sitios de muestreo y sus controles.

En la tabla III se muestra la cantidad de cepas aisladas de cada sitio, el tipo de muestra del que se obtuvieron y la temperatura de incubación a la que crecieron.

Tabla III. Número de cepas aisladas de los distintos sitios de muestreo.

Santispac	Control Santispac	Mapachitos	Control Mapachitos	Sargento	Control Sargento
Agua: 24	Agua: 11	Agua: 26	Agua: 9		
Sedimento: 48	Sedimento: 14	Sedimento: 32	Sedimento: 12	Sedimento: 31	Sedimento: 7
35°C: 53	35°C: 25	35°C: 36	35°C: 21	35°C: 17	35°C: 7
60°C: 19	60°C: 0	60°C: 22	60°C: 0	60°C: 14	60°C: 0

Se aislaron un menor número de cepas de los sitios control que de las localidades en los sistemas hidrotermales. De éstas, la mayor cantidad de cepas fueron aisladas de las muestras de sedimento, en comparación con las de agua de mar. El manglar Santispac fue el sitio con mayor cantidad de cepas aisladas en comparación con el resto de los sistemas hidrotermales. En las muestras de esta localidad el mayor número de cepas fueron mesófilas, mientras que el mayor número de cepas termotolerantes que crecieron a temperaturas de 60°C, se aislaron del área marina Mapachitos.

De la línea de costa en El Sargento se aisló un número similar de cepas que en los sedimentos de Mapachitos, siendo inferior sólo por una cepa (Tabla III).

La caracterización morfológica colonial de las distintas cepas contemplando características como: color, forma, borde y superficie, así como su Gram es posible observarla en la tabla del Anexo 2. Tal y como se observa en ese anexo, la mayoría de las cepas aisladas fueron Gram positivas con un porcentaje de: 71% del total.

6.4 Bacterias marinas con actividad degradadora de moléculas señalizadoras del tipo AHL

Se probaron sólo las 161 cepas aisladas de sistemas hidrotermales someros y de éstas, 23 presentaron actividad degradadora de moléculas señalizadoras C₆HSL (Fig. 13), por lo tanto el 14% de las cepas aisladas de sistemas hidrotermales mostraron actividad. En dicha imagen pueden observarse halos de color púrpura para las cepas que no presentaron actividad, contrario a las cepas que presentaron actividad degradadora en menor o mayor medida.

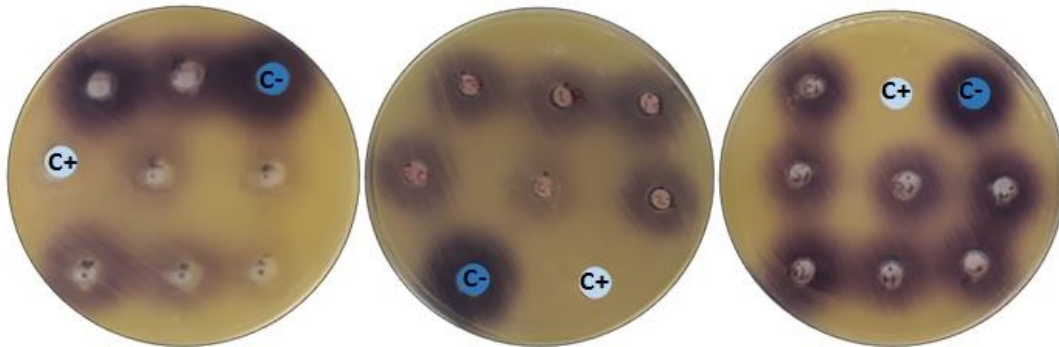


Figura 12. Ejemplo de los resultados de pruebas de difusión en pozo con placas Petri (medio LB) para demostrar la actividad degradadora de moléculas C₆HSL por parte de algunas cepas. Control positivo (C+): Medio LB; Control negativo (C-): Medio LB y moléculas señalizadoras.

En la tabla IV se enlistan las cepas activas y sus características: número de cepa activa, número de extracto crudo, especie, el porcentaje de identidad referente a la identificación molecular, Gram, el sitio de recolecta, el tipo de muestra, la temporada del muestreo y la temperatura de incubación a la que crecieron de manera óptima.

Tabla IV. Cepas degradadoras de moléculas señalizadoras y características principales.

No. Extra cto	ID Cepa	Especie	% Id	Gram	Sitio de recolecta	Muestra	Temporada	T°
1	4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	-	Mapachitos	Agua	Lluviosa	35°C
2	7	<i>V. alginolyticus</i>	100	-	Santispac	Sedimento	Seca	35°C
3	8	<i>V. alginolyticus</i>	99	-	Mapachitos	Agua	Seca	35°C
4	9	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	+	Santispac	Sedimento	Lluviosa	35°C
5	11	<i>Bacillus firmus</i>	100	+	Mapachitos	Sedimento	Seca	35°C
6	12S	<i>Virgibacillus salarius</i>		+	El Sargento	Sedimento	Lluviosa	35°C
7	22	<i>B. licheniformis</i>	99	+	Mapachitos	Sedimento	Lluviosa	35°C
8	22r	<i>V. alginolyticus</i>	99	-	Santispac	Agua	Seca	35°C
9	26	<i>B. licheniformis</i>	100	+	Mapachitos	Agua	Lluviosa	35°C
10	29	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	100	+	Mapachitos	Sedimento	Seca	35°C
11	A	No Identificada		-	Mapachitos	Agua	Lluviosa	60°C
12	Ar	<i>Bacillus aerius</i>	99	+	Santispac	Sedimento	Seca	60°C
13	CS	<i>B. licheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Lluviosa	60°C
14	C	<i>B. licheniformis</i>	100	+	Mapachitos	Agua	Seca	60°C
15	DS	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Lluviosa	60°C
16	ES	<i>B. licheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Lluviosa	60°C
17	F	<i>Bacillus sonorensis</i>	99	+	Mapachitos	Sedimento	Lluviosa	60°C
18	FS	<i>B. licheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Lluviosa	60°C
19	FSr	<i>B. licheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Seca	60°C
20	I	<i>B. licheniformis</i>	100	+	Mapachitos	Agua	Lluviosa	60°C
21	ISr	<i>B. licheniformis</i>	100	+	El Sargento	Sedimento	Seca	60°C
22	Kr	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99	+	Santispac	Sedimento	Seca	60°C
23	KSr	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	98	+	El Sargento	Sedimento	Seca	60°C

La mayor cantidad de cepas que degradaron moléculas C6HSL son bacterias Gram positivas y del género *Bacillus*, la mayoría de este género que tuvo actividad se identificaron como *Bacillus licheniformis*.

Las cepas activas que crecieron a 60°C se incubaron también a 35°C para observar si eran termófilas o termotolerantes, demostraron ser termotolerantes, puesto que todas ellas crecieron también a 35°C.

Las cepas termotolerantes tuvieron un 23% de actividad degradadora de moléculas C6HSL, puesto que de 55 cepas termotolerantes aisladas, 13 resultaron activas. Las cepas mesófilas tuvieron un 9.43% de actividad, ya que de las 106 cepas mesófilas aisladas sólo 10 de ellas presentaron actividad.

6.5 Actividad inhibitoria de biopelículas de los extractos crudos

Los siguientes cinco gráficos (Fig. 13 – 17) muestran los resultados del ensayo en microplaca de 96 pocillos de la actividad inhibitoria de biopelículas de los 23 extractos crudos obtenidos con acetato de etilo, a partir de los cultivos de bacterias marinas degradadoras de autoinductores C6HSL. La línea horizontal dentro de los gráficos representa la inhibición de la cepa en un 50% de acuerdo al control de cada cepa.

La Figura 13 expone el gráfico con los resultados de la actividad de los 23 extractos inhibiendo la biopelícula de la cepa *V. parahaemolyticus* M8, que es de origen marino.

Todos los extractos mostraron actividad ya que en cierta medida inhibieron la formación de biopelícula de *V. parahaemolyticus*. La mayoría de ellos inhibiendo el 50% o más, tal y como se puede observar en la Figura 13, en donde el control presentó un valor de absorbancia de 0.013, siendo en todos los casos mayor que los valores obtenidos con los extractos. Los que mostraron mejor actividad inhibitoria fueron el 19-*B. licheniformis* (86.4%) y 23-*Brevibacillus thermoruber* (81%), a su mayor concentración, destacando el extracto de la cepa 22-*B. paralicheniformis* que mostró la mejor actividad a la mayor concentración probada (1,000 µg/mL) con un porcentaje de inhibición de 88.7%.

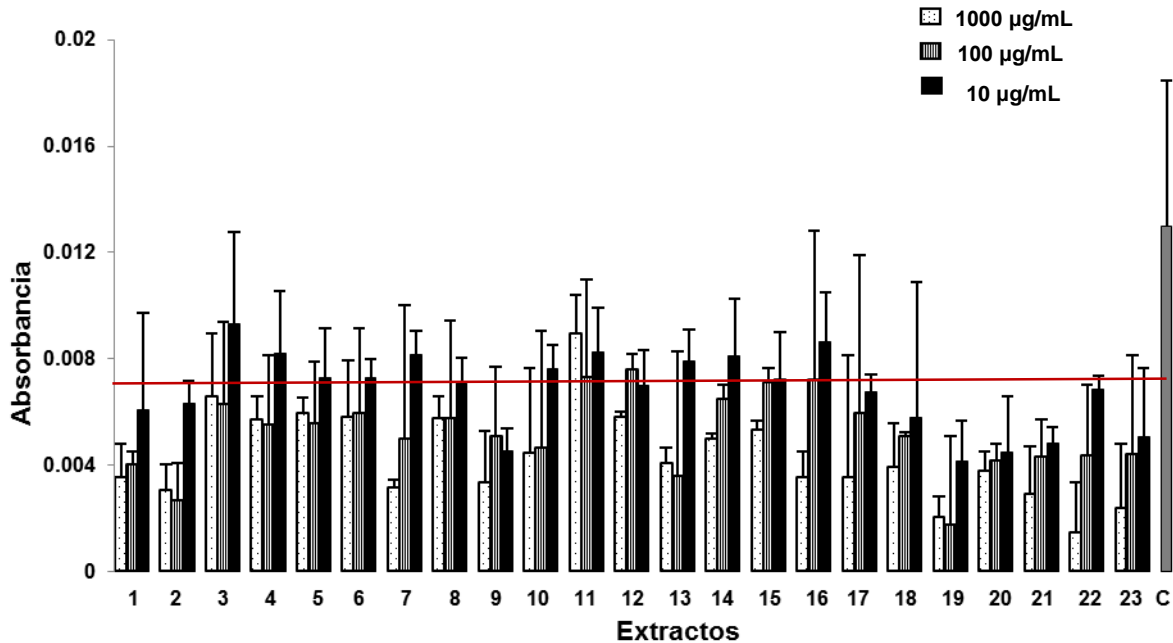


Figura 13. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de *V. parahaemolyticus* M8.

Las dos siguientes gráficas (Fig. 14 y 15) muestran la actividad de los 23 extractos inhibiendo las biopelículas de dos cepas patógenas clínicas, de origen terrestre.

En la siguiente gráfica (Fig. 14) se observa la actividad de los extractos inhibiendo la formación de biopelículas de *A. caviae* Sch3.

Los 23 extractos presentaron actividad inhibitoria de la biopelícula de *A. caviae* Sch3, inhibiendo más del 50% la formación de la biopelícula a excepción del extracto 12- *B. aerius* con una inhibición del 32 al 45%. Los extractos con mayor actividad resultaron ser los que se encontraban a una concentración mayor (1,000 µg/mL), siendo los más activos el 3- *V. alginolyticus* (82%), 7- *B. licheniformis* (92%), 9- *B. licheniformis* (91%) y 10- *B. oceanisediminis* (97%) por inhibir la formación de la biopelícula de la cepa patógena con más efectividad.

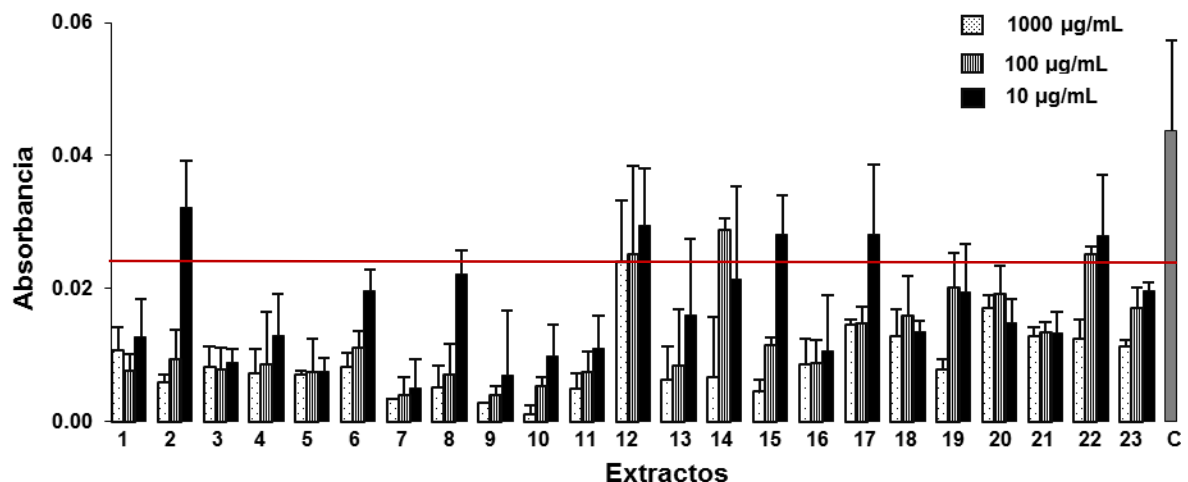


Figura 14. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de *A. caviae* Sch3.

La Figura 15 muestra el gráfico con los resultados de la actividad inhibitoria de la formación de biopelículas de los extractos frente a la cepa *P. aeruginosa* PAO1.

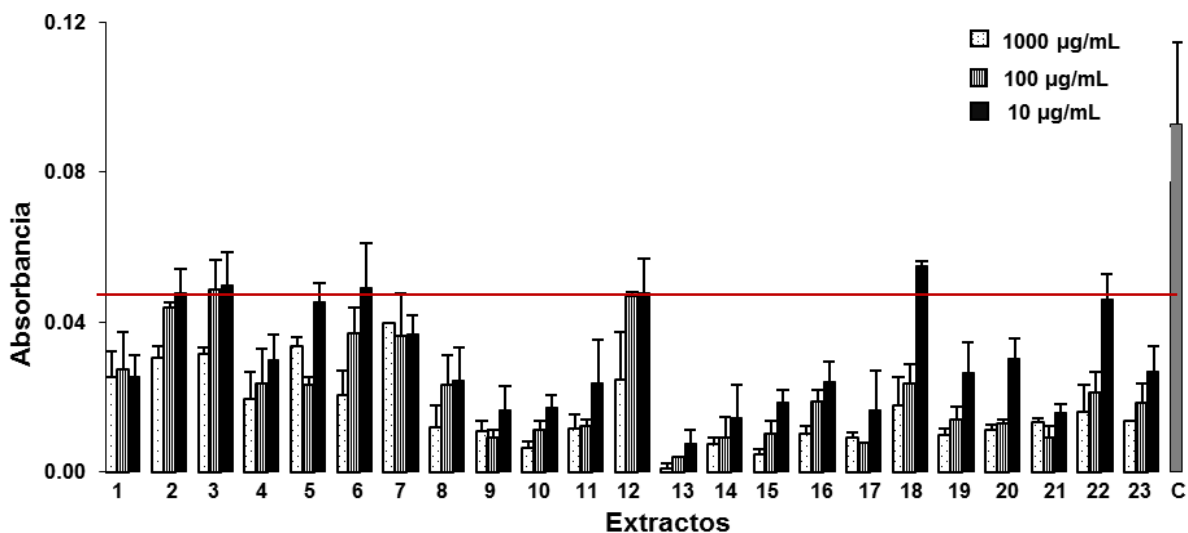


Figura 15. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1.

Todos los extractos probados inhibieron más del 50% la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* en la concentración mayor (1,000 µg/mL). Los extractos con mayor actividad son: 9-*B. licheniformis* (90%), 10- *B. oceanisediminis* (92%), 13- *B. licheniformis* (98%), 14- *B. licheniformis* (91%), 15- *B. paralicheniformis* (94%), 17- *B.*

sonorensis (91%) y 21- *B. licheniformis* (90%), inhibiendo casi al 100% la formación de la biopelícula.

A continuación se muestran los gráficos con los resultados de la actividad inhibitoria de biopelículas de los extractos, frente a cepas marinas identificadas como formadoras de biopelículas relacionadas en procesos de biofouling con estudios previos. El gráfico de la figura 16, muestra la actividad que tuvieron los extractos frente a la cepa marina *Virgibacillus* sp. C29 y la figura 17 muestra la actividad de los extractos, inhibiendo la biopelícula de *Vibrio alginolyticus* C96.

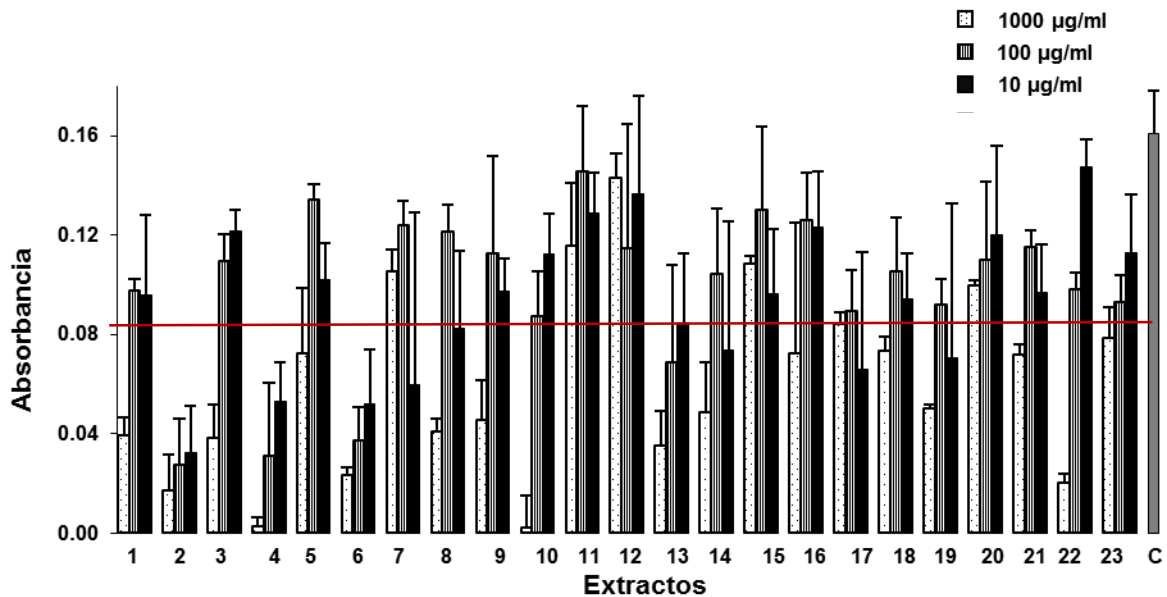


Figura 16. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de la cepa 29.

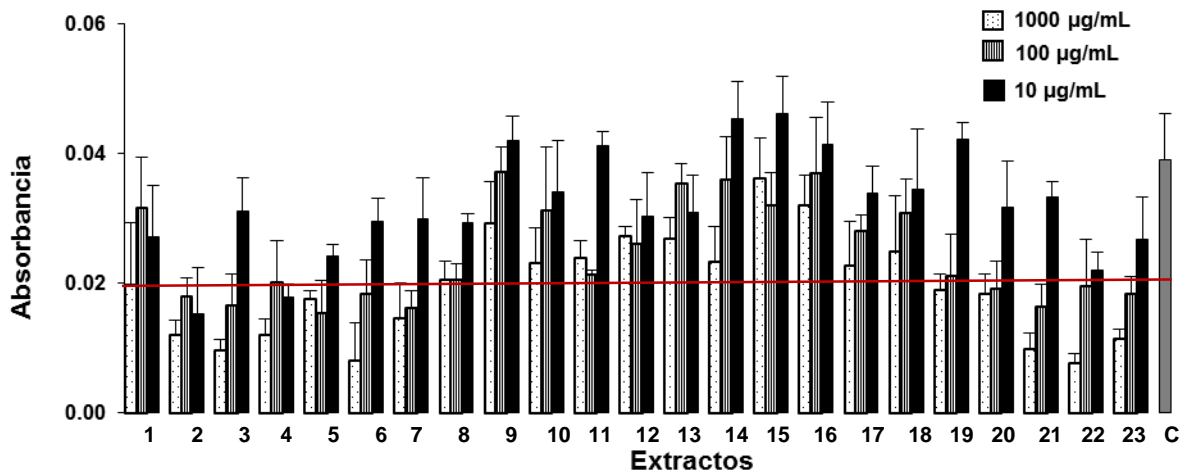


Figura 17. Actividad de los extractos bacterianos inhibiendo la biopelícula de la cepa 96.

En el caso de la figura 16, se puede observar que la actividad de los extractos fue mucho menor que con las pruebas de las cepas anteriores.

De igual manera que con las otras cepas, la concentración en la que se observó mayor actividad inhibitoria fue la mayor.

El extracto con mayor actividad fue el número 10- *Bacillus oceanisediminis* (98.8%) y el 4- *B. licheniformis* (98%) a una concentración de 100 µg/mL ambos, inhibiendo en gran medida la formación de biopelícula de *Virgibacillus* sp. C29. Extractos que también tuvieron buena actividad inhibitoria fueron el 2- *V. alginolyticus* (89%), 6- *Virgibacillus salarius* (85%) y 22- *B. paralicheniformis* (87%).

La figura 17 muestra un comportamiento similar a la figura anterior, puesto que la actividad inhibitoria de los extractos fue menor contra estas cepas que con las cepas patógenas.

En este ensayo se observó que algunos extractos en sus menores concentraciones no tuvieron actividad inhibitoria de biopelícula frente a *V. alginolyticus* C96, puesto que la absorbancia fue mayor que la del control.

Los extractos con mayor actividad inhibitoria en su mayor concentración fueron el 3-*V. alginolyticus* (75%), 6- *Virgibacillus salarius* (79%), 21-*B. licheniformis* (74%) y 22-*B. paralicheniformis* (80%).

Los extractos que inhibieron en menor media la formación de biopelícula de *V. alginolyticus* C96, fueron: 9-*B. licheniformis* (25%), 15-*B. paralicheniformis* (18%) y 16-*B. licheniformis* (18%).

Es posible notar que el extracto número 22 (*Bacillus paralicheniformis*) es el que inhibió con gran eficiencia la formación de biopelículas de todas las cepas con las que se realizaron los ensayos.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se propuso como hipótesis que se encontraría una comunidad de bacterias extremófilas adaptadas a sobrevivir en sistemas hidrotermales someros de las cuales, el componente cultivable tendría la capacidad de producir compuestos que inhibieran la formación de biopelículas bacterianas. Sin embargo, esta hipótesis se rechazó debido a los resultados obtenidos en este trabajo. Se demostró que la mayor proporción de bacterias identificadas en estos sitios, por medio de secuenciación masiva, no son clasificadas como extremófilas. La mayor diversidad en las muestras analizadas, estuvo representada por bacterias quimiosintéticas, identificando algunos grupos como Rhodospirillales, Chromatiales, Nitrospirales y los filos Chloroflexi y Planctomycetes, que engloban a grandes cantidades de microorganismos quimiosintéticos asociados a hábitats extremos. Con respecto a la actividad inhibitoria de biopelículas de la fracción cultivable, las cepas que mostraron un porcentaje mayor de actividad no son termófilas sino termotolerantes, por lo tanto bacterias extremófilas no presentaron actividad inhibitoria de biopelículas.

7.1 Caracterización de los sitios de muestreo

Actualmente los sistemas hidrotermales someros son reconocidos porque son una fuente con gran potencial para el estudio de comunidades bacterianas así como de nuevos compuestos bioactivos. En ellos se pueden desarrollar proyectos más viables económicamente que en los sistemas hidrotermales profundos donde son necesarios equipos especializados para la toma de muestras a profundidades mayores de 200 m, así como materiales y equipos específicos para el cultivo e incubación de las cepas aisladas de estos ambientes, entre otros costos adicionales en comparación con los someros (Soto y Estradas, 2013). Es por ello que en este trabajo se decidió trabajar en sistemas hidrotermales someros, ya que son ambientes extremos de fácil acceso, presentando condiciones fisicoquímicas inusuales, pero que son fuentes potenciales de compuestos activos bacterianos, distintos a los de ambientes marinos mesófilos.

En particular, la actividad hidrotermal en Baja California es explicada por el régimen tectónico extensivo que dio origen a la separación de la península del resto del país,

provocado por un conjunto de fallas en toda la extensión del Golfo de California y parte de la península. Por ejemplo, la actividad hidrotermal en las costas de Bahía Concepción se ha asociado al régimen tectónico extensivo que generó la formación del Golfo de California, comprendiendo fenómenos de extensión cortical y vulcanismo (Leal-Acosta y Prol-Ledesma, 2016), los cuales formaron un sistema de fallas en la costa este de la Península de Baja California. Principalmente la Falla “El Requesón”, puesto que origina las ventilas hidrotermales someras y los manantiales geotermales, encontrándose en dirección NO-SE, dentro de la Península Concepción y pasando por las costas de Mapachitos dentro de la Bahía (McFall, 1968). En la estación del área marina Mapachitos, se registraron las temperaturas más altas de los tres sitios de muestreo oscilando entre los 75 a 85°C, asemejándose a los resultados de la medición de Dávila-Ramos y colaboradores (2015) del mismo sitio.

El estero Santispac presenta una extensión aproximada de cuatro hectáreas con vegetación de manglar con 60% de cobertura y tiene un aporte de aguas subterráneas comunicándose con la bahía a través de un canal de aproximadamente 4 m de ancho y baja profundidad (Magallanes, 1992). Dentro de este estero se encuentran manantiales geotermales intermareales localizados dentro de la zona de manglar y se expone que los fluidos hidrotermales emitidos son aguas meteóricas infiltradas y calentadas, que posteriormente se mezclaron con el agua del mar antes de su descarga (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). En esta área se observó un par de pozas que son parte del sistema hidrotermal con temperaturas registradas desde los 45 a 60°C; sin embargo, el burbujeo por parte del fluido hidrotermal sólo se observó dentro del manglar, en donde la temperatura osciló entre los 50 y 70°C. La temperatura registrada coincidió con la reportada por Rodríguez-Valdez (2017), quien reporta una temperatura de 55°C en el mismo sitio.

En contraparte, la localidad El Sargento cuenta con una gran extensión de playas arenosas del Golfo de California. En este sitio se han encontrado manifestaciones hidrotermales en varias extensiones de su línea de costa, y éstas han sido reportadas por personas que visitan el área, así como por hoteles cercanos a la zona. Sin embargo, de este sitio aún no se han encontrado estudios que incluyan a estos

sistemas hidrotermales, por lo tanto la temperatura registrada entre los 45 a 80°C, no es posible comprarla con algún otro trabajo.

7.2 Caracterización de comunidades bacterianas con secuenciación masiva

Los estudios de ecología microbiana en donde se evalúa la diversidad de comunidades bacterianas y la estructura de las mismas, requieren de utilizar plataformas de secuenciación como de las que se disponen actualmente, ya que producen cientos de miles de secuencias de distintas muestras a partir del gen 16S del ARNr (Suárez-Moya, 2017). Éste es considerado un marcador universal en la ecología microbiana ya que está presente en todas las bacterias conocidas. Debido a la relativa facilidad al secuenciarlo, existen diversas bases de datos que se encuentran en continuo crecimiento. Presenta tanta especificidad en algunas regiones variables de bacterias por lo que hace posible que la identificación de éstas a un nivel taxonómico, sea suficientemente informativo. Sin embargo, este marcador molecular presenta distintas limitantes ya que es tan conservado que no permite distinguir con precisión entre algunas especies bacterianas. También es conocido que este gen puede estar presente en más de una copia, por lo que dificulta la cuantificación de las especies en comunidades complejas (Case *et al.*, 2007).

La plataforma con la que se trabajó (Illumina) para generar enormes conjuntos de datos, indudablemente proporciona una ventaja. Actualmente los secuenciadores de Illumina pueden conseguir lecturas de 2 x 300 pb hasta 15 Gb y 25 millones de lecturas con el modelo MiSeq (López, 2016).

El número de secuencias generadas a través de la plataforma de secuenciación, influye directamente en la diversidad de especies estimada, cuando existe un número menor de secuencias, existe una menor capacidad de detección. Por ello, se realizó una gráfica que expone las curvas de rarefacción (Fig. 3), con el fin de demostrar que la secuenciación de las muestras, fue lo suficientemente profunda para detectar el mayor número de especies de las muestras analizadas. Alcanzar la fase *plateau* de la gráfica (línea horizontal), nos indica que la profundidad de secuenciación es bastante

aceptable por lo que se obtuvieron datos de secuenciación suficientes para analizar diversidad en nuestras muestras.

Para realizar estudios de ecología es imprescindible contemplar conceptos como diversidad alfa y riqueza. El primer concepto comprende dos componentes: la riqueza, la cual es considerada una de las formas más sencilla de describir la biodiversidad de un sitio, ya que está basada en el número de especies u OTU's de la muestra. Para estimar el total de especies o número de datos de abundancia o incidencia, se utilizan una variedad de estimadores no paramétricos (Chao, 2005). Dos estimadores de riqueza no paramétricos ampliamente utilizados son Chao1 y Chao2, los cuales estiman la abundancia y datos de incidencia, respectivamente (Chao, 2009). El segundo componente de la diversidad alfa es la representatividad de la comunidad (Magurran, 1988). Para ello se requiere el uso de índices de diversidad, en el caso de este trabajo se utilizó el índice de Shannon-Weaver, en el cual se asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies se presentan en la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (Peet, 1974).

La diversidad alfa y riqueza bacteriana (Fig. 4 y 5), en general fueron mayores en los sitios control (exceptuando el sitio de El Sargento, temporada lluviosa y su control). Las muestras de esos sitios se consideraron controles porque se encuentran cerca a los sistemas hidrotermales pero no están influenciados por los fluidos hidrotermales ni por las condiciones fisicoquímicas de esos sitios extremos. Estos resultados de diversidad y riqueza es posible explicarlos porque los sitios extremos presentan características específicas, actuando como barrera para una gran fracción bacteriana que no está adaptada a dichas condiciones fisicoquímicas. Tal y como lo exponen Mohammad y colaboradores (2017): en estos ambientes los organismos tienen que hacer frente a la temperatura extrema y baja disponibilidad de nutrientes, en conjunto, estos factores reducen la biodiversidad, pero algunas bacterias sí desarrollaron estrategias de supervivencia para adaptarse a dicho estrés. Estudios previos sobre fuentes termales han demostrado que la diversidad bacteriana es mayor cuando la temperatura decrece (Sompong *et al.*, 2005). Wang y colaboradores (2015) observaron

en sus resultados que la diversidad de las bacterias y los eucariotas pequeños aumentó mientras mayor era la distancia del sitio a la ventila hidrotermal, mientras que la diversidad de arqueas en su estudio mostró una tendencia opuesta. Sin embargo, en nuestros resultados la diversidad de arqueas sólo fue mayor en las muestras de los sitios de ventila en la temporada lluviosa, mientras que en temporada seca los sitios control presentaron mayor abundancia de arqueas, exceptuando el control de Santispac de esa temporada que no presentó a ese grupo taxonómico.

Los valores de diversidad alfa con el índice de Shannon-Weaver, considerando todos los sitios, tienen valores entre 4.6 y 8.6. Infiriendo que son valores altos de diversidad, tal y como lo exponen Verma y colaboradores (2016), quienes indicaron una alta diversidad en sus muestras estudiadas, con valores de 6.3 a 9. Así como también Mamaeva y colaboradores (2016) quienes reportaron en su trabajo el valor de 4.6 como una diversidad alta. En cuanto a los valores de estimación de riqueza con el índice Chao1, nuestros datos se encontraron entre 63 y 543, infiriendo que la riqueza bacteriana es baja al comprar dichos valores con los otros trabajos de secuenciación masiva de ácidos nucleicos en sedimentos. Tales como los de Covarrubias-Rodríguez (2016) en un rango de 506 y 894, o como en el estudio de Wang y colaboradores (2015) presentando valores de riqueza con índice Chao1 entre 278 y 548. Cabe destacar que este último estudio se realizó en ventilas hidrotermales someras de la isla Kueishan en Taiwan, con una latitud muy parecida a la de Bahía Concepción, y se puede observar que los datos de riqueza en su estudio y en el nuestro coincidieron sólo en el máximo valor, diferenciándose por 5 OTUs.

En la temporada lluviosa, todas las muestras presentaron mayor diversidad y riqueza, esto puede deberse al incremento en la intensidad de vientos en esta estación, el oleaje es mayor favoreciendo el movimiento en el sedimento provocando mayor oxigenación y mayor flujo de materia orgánica. Además, la descarga de los arroyos en el mar agregan un mayor componente terrígeno al océano del que se agrega sólo con el viento; siendo posible que por todos estos procesos un gran número de bacterias terrestres lleguen a distintos sitios y cambien la riqueza del sitio muestreado, además de la fracción de bacterias marinas que pueden colonizar dichos sitios normalmente.

Debido a todos estos procesos es posible explicar también la presencia de algunas bacterias terrestres consideradas como patógenas o que han sido aisladas de humanos identificadas en algunos sitios de muestreo, entre ellas se encuentran: *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, *Collinsella aerofaciens*, *Acinetobacter johnsonii*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*.

De los tres sitios muestreados el único que cuenta con información referente a estudios de la fracción bacteriana no cultivable y composición taxonómica a nivel de filos es el de Mapachitos, Bahía Concepción. Dávila-Ramos y colaboradores (2014) estudiaron la composición taxonómica bacteriana a nivel de filos y cabe destacar que en nuestro trabajo se encontraron resultados similares a los reportados por este autor para la temporada seca. En el estudio de esos autores, sí incluyeron los distintos tipos de proteobacterias (Gamma, Alpha, Delta y Epsilon), mientras que en el nuestro no, sin embargo sumando los porcentajes de esos grupos, representan el 42% del total y nuestro resultado para Proteobacteria fue de 35.8%. En los demás filos también hubo similitudes, encontrándose los filos: Firmicutes, Chloroflexi, Spirochaetes y Actinobacteria. El único filo que se presentó en un porcentaje menor en comparación a los datos de ellos, fue Bacteroidetes. La recolecta de las muestras realizada por estos autores, se realizó en tres periodos (octubre 2006, febrero 2008 y enero 2009), en su metodología no especifican de que periodo son los resultados o si dichas muestras se mezclaron, sin embargo los resultados obtenidos para Mapachitos en temporada seca, son similares en la composición bacteriana en cuanto a los filos principales, por lo que puede considerarse que en este sitio se mantiene una estructura de la comunidad en el tiempo. Los autores mencionan que en un periodo de 10 años (2004-2014), se han tomado muestras del sistema hidrotermal de Bahía Concepción y no se han observado cambios estacionales en varios parámetros, la temperatura ha permanecido constante y el pH y el potencial redox no tienen variaciones significativas. También se hace mención que las condiciones redox son responsables de la presencia o ausencia de especies de bacterias pertenecientes a los tipos gamma, delta y epsilon Proteobacteria, así como de Bacteroidetes, bajo las condiciones oxidantes de la Bahía, de hecho el filo Bacteroidetes se encontró en todas las muestras analizadas desde concentraciones de 0.8 a 15.20%, y es conocido por estar ampliamente distribuido en

ambientes marinos y terrestres, así como también en algunos animales. (Dávila-Ramos *et al.*, 2014). Lo anterior podría explicar el hecho de que la composición taxonómica a nivel de filos en este estudio, sea muy similar a la reportada en el trabajo antes mencionado.

El filo Cianobacteria, estuvo presente en casi todas las muestras, exceptuando únicamente la de El Sargento, en temporada lluviosa, esto es debido a la presencia de luz solar y al carbono orgánico. Dávila-Ramos y colaboradores (2014) mencionan que las comunidades de ventilas hidrotermales someras están caracterizadas por presentar a este filo. Por otro lado, no es de esperarse que las bacterias que se encuentran en sistemas hidrotermales someros, sean similares a los reportados para sistemas hidrotermales profundos ya que en estos últimos la temperatura, la presión y la falta de luz solar restringiría la presencia de filos tales como Chloroflexi; explican también que en el caso de las ventilas hidrotermales someras de Bahía Concepción, diferentes condiciones redox son responsables de la presencia o ausencia de especies de bacterias: gamma, delta y epsilonproteobacteria así como de Bacteroidetes bajo las condiciones oxidantes de la Bahía, de hecho el filo Bacteroidetes se encontró en todas las muestras analizadas desde concentraciones de 0.8 a 15.20%, y es conocido por estar ampliamente distribuido en ambientes marinos y terrestres, así como también en algunos animales.

Antranikian y colaboradores (2017) estudiaron la diversidad de bacterias y arqueas de dos sistemas hidrotermales someros en Isla Vulcano, Italia. Combinando métodos de electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) y estudios de metagenómica, sus resultados muestran una gran diversidad de arqueas hipertermófilas. En cuanto a la comunidad bacteriana se observó una gran abundancia de bacterias pertenecientes al filo Epsilonproteobacteria, especialmente los géneros *Sulfurimonas* y *Sulfurovum*. En nuestros resultados no se encontró gran diversidad de arqueas hipertermófilas, sin embargo, sí se observó gran abundancia del filo Proteobacteria. En el sitio de Mapachitos, se encontró el género *Sulfurimonas* en las dos temporadas, al igual que en su estudio, demostrando que ese género es representativo de ventilas hidrotermales someras submarinas.

El estudiar la diversidad de un sitio también permite conocer qué poblaciones bacterianas pudieran tener un rol ecológico en el sitio o el potencial biotecnológico conforme a la literatura existente. Por ejemplo, un filo que estuvo presente en todos los sitios de muestreo y que es conocido por sus múltiples contribuciones ecológicas y en aplicaciones médicas y biotecnológicas son las Actinobacterias, aisladas principalmente de sedimentos. Estas bacterias son reconocidas por producir distintos compuestos activos. Bull y Stach (2007), exponen que la búsqueda y descubrimiento de productos naturales en actinobacterias marinas muestra una promesa excepcional. De hecho se ha planteado la posibilidad de que estas bacterias, al igual que sus contrapartes terrestres en los suelos, tienen funciones importantes en la descomposición de materia orgánica recalcitrante en el fondo marino (Weyland, 1969). Sin embargo, también son reconocidas como una fuente de nuevos antibióticos y agentes contra el cáncer (Faulkner, 2002). Por lo que Jensen y colaboradores (2005) proponen que este filo debe ser metabólicamente activo en el medio marino y esta actividad debe conducir a la producción de compuestos que no son observados en cepas terrestres. En nuestros resultados se encontró el orden Acidimicrobiales, perteneciente al filo Actinobacteria, este orden por lo general es considerado como bacterias oxidantes de hierro y estuvieron presentes sólo en las zonas de Mapachitos y manglar Santispac en ambas temporadas, y en sus respectivos controles sólo se identificaron en temporada lluviosa; cabe destacar que se encontró en alta abundancia, desde el 1.20% al 9.8%. Con estos resultados se puede inferir que los sitios de Mapachitos y Santispac son ricos en hierro debido a que las ventilas hidrotermales también liberan grandes cantidades de hierro disuelto al medio como lo menciona Leal-Acosta y Prol-Ledesma (2016).

Otro filo que estuvo presente en todos los sitios y con gran abundancia es el Proteobacteria. Conocido como uno de los principales filos de bacterias, considerados los más abundantes en los océanos y otros ambientes acuáticos. Constituyen el 79% de la biomasa bacteriana del fondo marino y en la superficie del mar un 64% (Battistuzzi & Hedges, 2008); siendo conocidas también por incluir una gran variedad de patógenos. Dentro de este filo hay diversos órdenes que se encontraron en gran abundancia en nuestros resultados, tales como: Chromatiales (presente en todas las

muestras en porcentajes de abundancia del 1.40 al 8.60%). Este orden incluye a aquellas bacterias conocidas como púrpuras del azufre o bacterias rojas del azufre, aisladas generalmente en las zonas anóxicas e iluminadas de los lagos y de otros hábitats acuáticos en donde el sulfuro de hidrógeno se acumula, también en manantiales sulfurosos donde se produce el sulfuro de hidrógeno geoquímico o biológico. Las condiciones anóxicas son requeridas para la fotosíntesis ya que estas bacterias no pueden prosperar en ambientes oxigenados, por lo tanto el hecho de que estas bacterias se encuentren con tanta abundancia en estos ambientes indica que nuestros sitios de muestreo también presentan las condiciones de los sistemas hidrotermales someros referidas por autores previamente mencionados en cuanto a las concentraciones de ácido sulfhídrico presente en dichos sitios, puesto que estas bacterias realizan fotosíntesis pero no usan agua como agente reductor sino ácido sulfúrico, por lo tanto no producen oxígeno, ya que al usar ácido sulfhídrico como reductor, al oxidarse produce gránulos de azufre, y se puede volver a oxidar produciendo ácido sulfúrico (Proctor, 1997).

Otro orden del filo Proteobacteria encontrado en nuestras muestras es Desulfobacterales (presente en casi todos los sitios exceptuando el control de El Sargento de temporada lluviosa y la muestra de El Sargento temporada seca). Este orden se encontró en abundancias de 0.50% al 2.60% y con su presencia se puede inferir que en los sitios muestreados existen concentraciones altas de sulfatos, ya que las bacterias de este orden utilizan el sulfato como agente oxidante, reduciéndolo a sulfuro. El orden Rhodospirillales perteneciente al mismo filo, estuvo presente en todas las muestras en proporción de 0.4 hasta 5.8%. Estas bacterias en lugar de usar agua como donador de electrones, usan sulfuro o hidrógeno (Imhoff *et al.*, 2005).

El filo Acidobacteria estuvo presente en todas las muestras en concentraciones desde 0.5 hasta 9.2%, este filo es conocido por ser uno de los más abundantes en el planeta, sin embargo, el estudio y conocimiento del papel que desempeñan estos diversos organismos en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres sigue siendo escaso y esta falta de conocimiento se lo atribuyen en gran medida a las dificultades

asociadas con el cultivo de estas bacterias por medios convencionales (Kielak *et al.*, 2016).

En los resultados se observó que el filo Verrucomicrobia está presente en todas las muestras a excepción de El Sargento en temporada lluviosa. Se ha estimado que las bacterias de este filo comprenden hasta 10% de las bacterias totales en muestras de sedimentos. La evidencia disponible, indica que son un grupo de bacterias del suelo distribuidas globalmente y abundantes. Sin embargo, en ausencia de aislados cultivados del suelo, se sabe muy poco sobre la biología de los miembros de este filo (Sangwan *et al.*, 2005).

El orden Nitrospirales, perteneciente al filo Nitrospirae también se encontró en gran abundancia (desde 0.20 a 2.30%) y estuvo presente en todos los sitios exceptuando El Sargento en temporada seca y en el control de El Sargento, temporada lluviosa. El hecho de que este orden se encuentre en los sitios muestreados nos indica que están involucradas en el ciclo del nitrógeno de estos ambientes. Otro filo que se encontró en todas las muestras analizadas y que tiene relación con el ciclo del nitrógeno, fue Planctomycetes. Se estima que todas estas bacterias son aerobias facultativas, que derivan filogenéticamente de un grupo de quimioautótrofos. Bacterias pertenecientes a este filo, son quimioautótrofas, convirtiendo el nitrito y amonio en gas nitrógeno gaseoso, en ausencia de oxígeno; esta vía se conoce como “anammox” (Ahn, 2006).

El filo Chloroflexi se identificó en todas las muestras con abundancia desde 1.8 a 39.5%, son bacterias filamentosas y anteriormente fueron conocidas como bacterias verdes no del azufre, sin embargo, esto ya no resulta equivalente porque ni todas estas bacterias son verdes fotosintéticas, ni todas son no-azufre, pues algunas pueden utilizar compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones (Hanada, 2014). Este resultado evidencia que estos sistemas presentan altas concentraciones de azufre.

Se observó que algunas de las bacterias más abundantes en los sitios muestreados en nuestro estudio son quimiosintéticas, esto puede ser explicado perfectamente por las condiciones fisicoquímicas típicas de los sistemas hidrotermales como: altas

concentraciones de dióxido de carbono, ácido sulfhídrico, hidrocarburos, metales pesados, temperaturas elevadas, etc. (Lentini *et al.*, 2014). Sin embargo, en contraste con las ventilas hidrotermales profundas, en las someras no sólo se observan procesos quimiosintéticos, sino también es posible la producción primaria por fotosíntesis debido a la influencia de la luz, tal y como lo mencionan Tarasov y colaboradores (2005).

El filo Gemmatimonadetes solamente no se encontró en las muestras de Mapachitos de ventilas, en ambas temporadas, pero en todas las demás muestras sí. Este orden se detecta con frecuencia en las bibliotecas de genes del 16S ARNr de muestras ambientales y se han identificado como uno de los nueve filos principales encontrados en los suelos, que comprende aproximadamente el 2% (Janssen *et al.*, 2006) de las comunidades bacterianas del suelo. Sin embargo, sólo algunas especies han sido aisladas y caracterizadas.

El orden Bacillales del filo Firmicutes estuvo presente en todas las muestras analizadas (desde 0.10 hasta 7.8%), exceptuando el sitio de manglar, temporada seca y su control, ya que no se identificó dicho orden en la secuenciación masiva. Sin embargo, en la fracción cultivable sí se pudieron aislar algunos *Bacillus* de dichas muestras en agar marino. Zeikus (1979) menciona que todas las especies de *Bacillus*, ya sean mesófilas o no, contienen un cierto grado inherente de termoestabilidad, es por ello que muchas de las cepas identificadas de este género, se pueden encontrar en estos sistemas hidrotermales. Este orden incluye a muchas bacterias que tienen aplicaciones como probióticos para humano y otros animales, que influyen como promotores de crecimiento en animales de granja, efectos benéficos en infecciones intestinales, actividad antitumoral, actividad anticolesterolémica, entre otras (Fuller, 1989), es por ello la importancia de aislar a este orden y evaluar otros usos potenciales.

Los filos de arqueas se identificaron en la temporada lluviosa de las tres muestras de ventilas y se han reconocido como filos asociados a sistemas hidrotermales, tanto someros como profundos. Por ejemplo, el filo Euryarchaeota, en donde se incluyen a bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas, halobacterias, aerobias, hipertermófilas y termoacidófilas, en este filo se han aislado bacterias que tienen

aplicaciones biotecnológicas o potencial como los géneros: *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Methanopyrus*. Otro filo es Crenarchaeota, el cual comprende arqueas hipertermófilas de ambientes volcánicos terrestres y de ambientes volcánicos marinos, en este filo se encuentran distintos géneros (Howland, 2000). Y finalmente el filo candidato Parvarchaeota, que se compone de arqueas no cultivables, pequeñas, con la característica particular de respiración aeróbica, englobando a los géneros *Parvarchaeum* y *Micrarchaeum* (Baker *et al.*, 2010).

Se identificaron distintos filios candidatos, tales como: TM6, TM7, WPS-2, WS3, WS6, SR1, SC4, OD1, OP1, OP8, OP9, OP11, NKB19, NC10, LCP-89, KSB3, GN04, GN02, GAL15, EM3, BRC1, BHI80-139 y Anck6. Estos grupos han sido reconocidos como importantes linajes bacterianos en muestras de sedimento, identificados a través de estudios de secuenciación masiva de ácidos nucleicos. Sin embargo, muchos de ellos no han podido aislarse y con eso poder obtener una mayor comprensión de su función, algunos de ellos pertenecen a la llamada “materia oscura microbiana” que reúne bacterias no cultivables, detectadas solo a través de la secuenciación (Delafont *et al.*, 2015; Yeoh *et al.*, 2015).

Gracias al conocimiento de algunas poblaciones bacterianas identificadas en este trabajo, lo cual permite inferir el tipo de metabolismo y función de las mismas, y considerando alguna perspectiva biotecnológica, se podrían llevar a cabo muestreos y aislamiento de bacterias en medios selectivos para aislar el mayor número de bacterias de la fracción cultivable de la población que se pretenda estudiar de estos sitios y no medios generalistas como el agar marino utilizado en el presente trabajo.

Finalmente es posible asegurar que la metagenómica representa una aproximación relativamente nueva al estudio de las comunidades microbianas, definida como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos en una muestra ambiental, ya sea para propósitos de expresión o secuenciación (Handelsman *et al.*, 1998), caracterizando de mejor manera a las comunidades bacterianas de algún sitio, pero se debe ser consciente tal y como lo menciona Hobel y colaboradores (2005), los resultados obtenidos de los métodos que requieren la obtención de secuencias de

muestras ambientales, dependen en gran medida de la distribución espacial y la presencia temporal de ciertas poblaciones bacterianas, así como también la cantidad y calidad del ADN que se recupera de las muestras del medio natural en cuestión.

7.3 Bacterias identificadas por secuenciación masiva con potencial para inhibir biopelículas

De acuerdo a los resultados del estudio de metagenómica de las bacterias de sedimento, es posible distinguir ciertos filos que según la literatura tienen actividad inhibitoria de biopelículas. Ésto con el fin de demostrar que estos sitios son una fuente de bacterias productoras de compuestos de interés biotecnológico y en el caso de este trabajo, inhibidoras de biopelículas.

La mayoría de los trabajos que exponen a bacterias inhibidoras de quorum sensing y/o biopelículas, se centran en el filo Firmicutes. Sin embargo, se han realizado trabajos como el de Christiaen y colaboradores (2011), quienes aislaron bacterias e identificaron su potencial actividad degradadora de moléculas del tipo AHL, involucradas en procesos de QS frente al biosensor *Pseudomonas aeruginosa* QSI2. Las muestras se recolectaron de agua de estanque, de rizósfera de distintas familias de plantas en jardines botánicos y de acuarios. Mostrando que la mayoría de las bacterias aisladas con actividad QQ pertenecen a los filos Proteobacteria, seguido de Actinobacteria y finalmente Firmicutes. Resultados parecidos a los filos identificados por Naranjo-Gaybor (2017), quien probó la actividad QQ de cepas bacterianas marinas aisladas del Mar Caribe colombiano, frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Resultando 16 cepas activas: 8 Actinobacterias, 6 Firmicutes, 1 Proteobacteria y 1 no identificada.

Romero-Bernárdez (2010) estudió la actividad de cepas de bacterias marinas aisladas de sedimento de tanques de cultivo de peces, de biopelículas de tanques de reservas de agua de mar y del alga *Fucus vesiculosus*. Identificaron 15 cepas activas con actividad QQ, mostrando que la mayoría de ellas son del filo Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes.

Por lo tanto, es posible distinguir en los resultados de composición taxonómica a nivel de filo que los sitios muestreados presentan una gran abundancia de los grupos identificados como productores de compuestos inhibidores de quorum sensing y/o biopelículas, tanto grupos como Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes.

7.4 Bacterias marinas aisladas de los distintos sistemas hidrotermales someros

Se demuestra en este trabajo tal y como lo mencionan diversos autores, que la fracción bacteriana cultivable aislada fue mayor en muestras de sedimento que en las de agua (Tabla III). Pucci y colaboradores (2009, 2010) mencionan que aislaron un mayor número de bacterias de muestras de sedimentos que de las muestras de agua de mar, adjudicando este suceso al soporte que dan a los microorganismos los distintos tipos de partículas que forman los sedimentos (Süss *et al.*, 2004).

La mayor fracción cultivable se encontró en el sitio del manglar Santispac, mientras que la menor cantidad de colonias aisladas fue de las muestras de la línea de costa en El Sargento (Tabla III). Cabe destacar que estos resultados coincidieron con los estudios de secuenciación masiva de la temporada lluviosa, puesto que el sitio de manglar presentó mayor diversidad y riqueza que los otros sitios. Hobbie (1977) menciona que la ocurrencia y densidad poblacional de las bacterias marinas están afectadas por asociaciones con otros organismos, agregaciones y adherencias a partículas de sedimento, así como por la temperatura y salinidad del medio; pero particularmente por los sedimentos, se ha expuesto que en todos aquellos de grano fino, las bacterias se encuentran adsorbidas, mientras que en las arenas gruesas se encuentran en estado libre (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1987). Esto se observó claramente en la fracción cultivable, puesto que se aislaron menos bacterias de los sitios con grano grueso (Sargento y Mapachitos) que en las muestras de manglar que presentan sedimento fino.

De las cepas aisladas, la mayor proporción fueron mesófilas que termotolerantes. La diferencia principal que existe entre un organismo termófilo y uno termotolerante es que el primero requiere temperaturas entre 45 y 70°C para su óptimo crecimiento, sin

embargo, los termotolerantes son aquellos que pueden crecer tanto en condiciones mesófilas como termófilas.

Todas las cepas aisladas de los sitios control fueron mesófilas ya que ninguna logró crecer a 60°C. Estos resultados pueden deberse a que los sistemas hidrotermales presentan condiciones inusuales que se pueden considerar como una barrera fisicoquímica para organismos que no resisten esos ambientes, mientras que los que habitan en estos sitios tienen que hacer frente a la temperatura extrema y baja disponibilidad de nutrientes del medio. Sin embargo, algunas bacterias sí desarrollan estrategias de supervivencia para adaptarse a dicho estrés; de hecho estudios sobre fuentes termales han demostrado que mientras la temperatura disminuye, existe mayor diversidad (Sompong *et al.*, 2005).

La mayor proporción de bacterias aisladas de los sitios de muestreo fueron Gram positivas, esto puede estar relacionado con la posibilidad de que esas bacterias tienden a ser más fácilmente cultivables ya que poseen más resistencia a los cambios ambientales, quizás relacionado con la composición de sus paredes celulares. En particular por estructuras entrecruzadas del peptidoglicano confiriéndoles resistencia mecánica, fortaleza, moldeando su forma celular y brindándoles una barrera para mantener la presión osmótica interna (Morales *et al.*, 2010). Por otra parte, se debe tener en cuenta que dentro de las bacterias Gram positivas se encuentran en un elevado porcentaje el grupo de las formadoras de esporas, siendo estructuras de supervivencia en ambientes estresados (por ejemplo, el Género *Bacillus*). Mohammad y colaboradores (2017), aislaron bacterias de aguas termales en Jordania y la mayoría de las colonias que aislaron (exceptuando una), fueron Gram positivas formadoras de esporas, adjudicando dicho resultado a la capacidad del género *Bacillus* de resistir a las condiciones ambientales extremas y a su adaptación para entornos calientes.

Se observó un mayor número de morfologías coloniales distintas en las placas de las muestras que pertenecían a los sistemas hidrotermales, sin embargo, los resultados de secuenciación masiva demostraron lo contrario, que la mayor diversidad alfa se presenta en los sitios control. Esto puede deberse a que para este trabajo, en la fracción cultivable sólo se utilizó como medio de cultivo el agar marino y caldo marino,

por lo que sólo se aislaron algunas bacterias marinas heterótrofas, sin considerar en la fracción cultivable a todas las demás con otras fuentes de carbono y/o nitrógeno. Otra cuestión de gran importancia fue el tiempo de incubación de las placas, el cual fue máximo de 96 horas, por lo que una gran fracción de organismos de lento crecimiento no se observaron. Por ejemplo las que pertenecen al filo Actinobacteria, mientras que lo observado en la secuenciación masiva, es que ese filo estuvo presente en todos los sitios de muestreo, desde un porcentaje menor de 3.10% en Mapachitos, temporada seca, hasta un 40.8% en El Sargento, temporada seca. Es por eso que en muchos estudios de análisis filogenéticos comparativos basados en el gen 16S de comunidades microbianas de muestras ambientales, han indicado que la diversidad microbiana es mayor o diferente que lo evaluado por técnicas de cultivo estándar y de aislamiento (Takai *et al.*, 1999; Tringe *et al.*, 2005). Por lo tanto, no es posible caracterizar la comunidad bacteriana de un sitio sólo con esas técnicas de cultivo.

7.5 Bacterias marinas con actividad degradadora de moléculas señalizadoras del tipo AHL y actividad inhibitoria de biopelículas de los extractos crudos

La mayoría de las cepas que degradaron moléculas señalizadoras del tipo AHL (C6HSL) fueron termotolerantes (Tabla IV). De las cepas termotolerantes, el 23% tuvo actividad, puesto que resultaron 13 cepas activas de 55 aisladas a 60°C. Mientras que de las cepas mesófilas, sólo el 9.4% tuvieron actividad, ya que de 106 cepas mesófilas, sólo 10 de ellas presentaron actividad. Esto puede deberse a que las bacterias termófilas o termotolerantes producen enzimas y/o metabolitos secundarios para sobrevivir en ambientes extremos, algunos distintos a los que producen bacterias mesófilas que posiblemente al estar en contacto continuo y a la competencia con otras bacterias en el mismo medio y temperatura, crean resistencia a dichas moléculas, mientras que los metabolitos de cepas termotolerantes son novedosos para las cepas que se desarrollan a temperaturas distintas.

En muchos casos, los bioensayos que se han realizado para detectar actividad inhibitoria de la formación de biopelículas bacterianas, pueden mejorarse mediante técnicas químicas más rigurosas, incluida la extracción y concentración de compuestos

señal con disolventes orgánicos. Por ejemplo, la extracción líquido-líquido es el método comúnmente utilizado para la extracción de autoinductores HSL (Brelles-Marino & Eulogio, 2001), utilizando disolventes orgánicos como reactivos de extracción. Los disolventes orgánicos con baja polaridad como el diclorometano, el éter dietílico, el acetato de etilo, el hexano o el tolueno son los que se suelen utilizar como disolventes orgánicos de extracción de estas moléculas. En nuestro caso, se utilizó el acetato de etilo para extraer dichos compuestos ya que este se utiliza en distintas publicaciones como un método efectivo para extraer autoinductores o compuestos de bajo peso molecular con actividad inhibitoria de QS (Parsek *et al.*, 1999; Leadbetter & Greenberg, 2000; Schaefer *et al.*, 1996; Rothballer *et al.*, 2018; Dixit *et al.*, 2017).

A pesar de que en este estudio no se obtuvo la fracción enzimática que pudiera llegar a tener actividad inhibitoria de QS y por lo tanto, también la inhibición de la formación de biopelículas bacterianas, se han encontrado otras moléculas que pueden actuar como autoinductores. Tales como las dicetopiperazinas, ácido metil-dodecanoico, foranosil borato, ácido farnesoico, ácido palmítico y otras moléculas señaladoras HSL de distintos números de carbonos, entre otros (Rodelas *et al.*, 1999; Dong & Zhang, 2005; Brencic & Winans, 2005), por lo que algunas de ellas podrían encontrarse en los extractos que mostraron actividad.

Con respecto a las bacterias que presentaron actividad tanto degradadora de autoinductores como inhibición de la formación de biopelículas bacterianas, destaca el género *Bacillus*. Tanto cepas termotolerantes como mesófilas (*B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. oceanisedimentis*, *B. aerius*, *B. sonorensis* y *B. paralicheniformis*); las especies que pertenecen a este género están adaptadas a ambientes cálidos y en general tienen requerimientos simples de nutrientes, por lo tanto son capaces de colonizar nichos oligotróficos como marismas, aguas termales y suelos desérticos (Khiyami *et al.*, 2012). Zeikus (1979) menciona que todas las especies de *Bacillus*, ya sean mesófilas o no, contienen un cierto grado inherente de termoestabilidad, es por ello que muchas de las cepas identificadas de este género, que se pueden encontrar en estos sistemas hidrotermales, crecieron a 60°C. De este género bacteriano se han publicado múltiples investigaciones relacionadas a su proceso de inhibición de QS, así

como de la inhibición de biopelículas de otras bacterias, pudiendo explicarse claramente por la producción de exopolisacáridos (Sayem *et al.*, 2011), algunas enzimas como α -amilasa (Kalpana *et al.*, 2012), biosurfactantes (Rivardo *et al.*, 2009), entre otros compuestos que se investigan para posteriores aplicaciones biotecnológicas. En general muchas enzimas lactonasas de inhibición de QS ya se han reportado en especies del género *Bacillus*, sin embargo, en el estudio de Nithya y colaboradores (2010) demuestran por primera vez que una cepa de *B. pumilus* produce una enzima que no es lactonasa y que degrada moléculas AHL. También que la cepa inhibió significativamente proteasas LasA (76%), elastasas LasB (84%), caseinasas (70%), piocianinas (84%), pyoverdinas y formación de biopelículas (87%) de la misma especie que se probó en este trabajo, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Cabe destacar que con respecto a la fracción cultivable de los sitios de muestreo, sólo se han publicado estudios del sitio manglar Santispac. Por ejemplo, en 2016 Gallut Rubio aisló 22 cepas de bacterias en oncoides de los manantiales hidrotermales del mismo manglar, identificando especies a partir de secuencias del 16S ARNr y destacaron bacterias del género *Bacillus*, también identificando a nivel de especie a *B. licheniformis*, entre otras, coincidiendo con la identificación molecular que se realizó en nuestro trabajo.

De otra cepa que también mostró actividad, identificada como *Brevibacillus thermoruber*, existen estudios relacionados con la producción de sus exopolisacáridos, tales como los de Radchenkova y colaboradores (2011). De hecho esta especie se encuentra muy relacionada filogenéticamente con *Bacillus licheniformis*, como se puede observar en el árbol filogenético de Yohandini y colaboradores (2015). Otra cepa que también tuvo actividad y que se identificó como *Virgibacillus salarius*, también tiene relación filogenética con el género *Bacillus* (Hua *et al.*, 2008). Por lo que se puede inferir que estas cepas al igual que el género *Bacillus*, producen exopolisacáridos, enzimas que degradan moléculas señalizadoras y otros compuestos como los mencionados con anterioridad que se encuentran involucrados en la IQS.

Otra especie que tuvo actividad degradadora de moléculas señalizadoras C6HSL y que inhibió la formación de biopelículas de ciertas cepas, es la especie *Vibrio*

alginoliticus. Su actividad puede deberse principalmente a moléculas señalizadoras del tipo 4C-HSL como las que detectó Lule (2007) de una especie de *Vibrio*, quien también realizó extractos líquido-líquido con acetato de etilo como solvente, y utilizando un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas (GC/MS), detectó también ácidos palmítico y estéarico, así como también dicetopiperazinas. Todas estas conocidas como moléculas inhibidoras de la comunicación bacteriana. Por lo que es posible inferir que los extractos que se realizaron de ese género en este trabajo, también presentan dichos compuestos.

Leadbetter y Greenberg (2000) mencionan que muchos miembros de la clase Proteobacteria tienen sistemas de QS que se basan en señales de acil-homoserina lactona (acil-HSL), como en este caso *Vibrio alginolyticus* que pertenece a la clase Gammaproteobacteria. De hecho Jiang y colaboradores (2011) publicaron que exopolisacáridos de la cepa con la que trabajaron, *Vibrio* sp. QY101, inhibió con buenos resultados la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, exponiendo que tiene un gran potencial en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para infecciones bacterianas asociadas a las biopelículas y sobre todo a limitar la formación de biopelículas en dispositivos médicos permanentes que provocan enfermedades nosocomiales.

Los resultados de los 5 gráficos (Fig. 13 - 17) derivados de los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas, mostraron que los extractos crudos presentaron mayor actividad a concentraciones más altas y también mayor actividad frente a cepas patógenas. Esto posiblemente está explicado porque las otras bacterias (marinas) podrían generar resistencia a los compuestos producidos por otras bacterias en su mismo hábitat natural, mientras que las patógenas son terrestres, por lo que no están en contacto frecuente con compuestos marinos producidos por las bacterias que se aislaron en este trabajo.

Todos los extractos crudos que se probaron en los ensayos tuvieron actividad inhibitoria de biopelículas de diferentes cepas, ya sea en menor o mayor medida, sin embargo, se observó que el extracto crudo con mayor actividad frente a todas las cepas fue el número 22, realizado a partir de un cultivo de *Bacillus paralicheniformis*,

nuevamente confirmando que el género *Bacillus* tiene una actividad importante al inhibir la formación de biopelículas de otras cepas. Es importante exponer que los estudios sobre este género y que previamente se mencionaron, exponen que son enzimas las que le ofrecen la actividad de inhibir la formación de biopelículas, sin embargo, en este trabajo se comprueba que no son sólo enzimas las que tienen dichas actividades en este género ya que el método utilizado para realizar los extractos con acetato de etilo no extraen acilasas o lactonasas.

Para una posible aplicación, sería interesante experimentar con una mezcla de los extractos que tuvieron una buena actividad inhibiendo la formación de biopelículas de bacterias por separado, tales como los extractos: 3 (*Vibrio alginolyticus*), 6 (*Virgibacillus salarius*), 7 (*Vibrio alginolyticus*), 9 (*Bacillus licheniformis*), 10 (*Bacillus oceanisediminis*), 12 (*Bacillus aerius*), 16 (*Bacillus licheniformis*), 21 (*Bacillus licheniformis*) y 22 (*Bacillus paralicheniformis*).

Con estos ensayos también fue posible observar que tanto la actividad degradadora de autoinductores, como la inhibición de la formación de las biopelículas por parte de las cepas activas, no dependió de la temporada de recolecta, ya que en ambas temporadas las cepas aisladas mostraron actividad.

8. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada en este trabajo se rechazó, puesto que los grupos de bacterias representativos en los sitios de ventilas muestreados, no se identificaron como extremófilos, ya que la diversidad está compuesta principalmente por bacterias quimiosintéticas. Esto debido a las condiciones fisicoquímicas de dichos ambientes, como las altas concentraciones de dióxido de carbono, ácido sulfhídrico, hidrocarburos, metales pesados, etc., identificando algunos grupos como Rhodospirillales, Chromatiales, Nitrospirales y los filos Chloroflexi y Planctomycetes, que engloban a grandes cantidades de microorganismos quimiosintéticos asociados a estos ambientes. De la fracción cultivable, las cepas que mostraron un porcentaje mayor de actividad no son extremófilas o termófilas, sino termotolerantes, por lo tanto, bacterias extremófilas no se lograron aislar y son las bacterias termotolerantes y mesófilas las que presentaron actividad inhibitoria de biopelículas.

Con los resultados de la secuenciación masiva es posible inferir que estos ambientes son fuentes accesibles de bacterias potencialmente productoras de compuestos inhibidores de biopelículas, puesto que los filos más representativos, se encuentran relacionados con esa actividad en la literatura.

Con este proyecto de investigación se comprueba al igual que lo han referido otros investigadores, que los resultados derivados de métodos dependientes de cultivo que precisan aislamiento y purificación de cepas en medios enriquecidos y/o condiciones de incubación selectivas, no representan la diversidad bacteriana de un sitio de muestreo. Por ello es imprescindible realizar a la par, metodologías que involucren también la fracción no cultivable del área de estudio.

Los proyectos que incluyen estudios de metagenómica representan una aproximación mayor al conocimiento de las comunidades microbianas de un micro nicho.

La mayor diversidad alfa y riqueza bacteriana se encontró en los sitios control, debido a que las condiciones de los ambientes extremos son una barrera fisicoquímica para bacterias que no resisten esos nichos. Entre temporadas, la mayor diversidad y riqueza fue en temporada lluviosa posiblemente explicado por la entrada de componente

terrígeno derivado del arrastre de sedimento por lluvias en las zonas muestreadas, por el aumento de oleaje que provoca oxigenación y movimiento de materia orgánica en los sedimentos haciéndola más disponible.

En este estudio la proporción de bacterias marinas Gram positivas fue mayor, relacionado probablemente a que son microorganismos fáciles de cultivar ya que poseen más resistencia a los cambios ambientales por sus estructuras celulares. Dentro de este grupo se encuentran un elevado porcentaje de bacterias formadoras de esporas, las cuales son estructuras de supervivencia en ambientes estresados o extremos.

Las bacterias marinas aisladas de sistemas hidrotermales someros, tanto mesófilas como termotolerantes, producen compuestos que degradan moléculas señalizadoras del tipo AHL, en su mayoría especies del género *Bacillus*, inhibiendo en mayor porcentaje la formación de biopelículas de bacterias patógenas, contrario a las de bacterias marinas relacionadas a procesos de biofouling, posiblemente habituadas a los compuestos producidos por las bacterias marinas activas que se probaron.

Con la evidencia científica de este trabajo se refuerza la propuesta de que los sistemas hidrotermales someros son una fuente accesible de microorganismos termotolerantes y mesófilos con compuestos que presentan potencial biotecnológico para inhibir biopelículas bacterianas.

9. RECOMENDACIONES

Utilizar distintos medios de cultivo con fuentes de carbono y/o nitrógeno, diferentes al Agar Marino, para aislar una mayor cantidad de bacterias de los sitios de muestreo y en el caso de una búsqueda dirigida a grupos bacterianos específicos con potencial biotecnológico, utilizar medios selectivos y no generalistas para un aislamiento bacteriano eficiente.

Llevar a cabo el fraccionamiento de los extractos que degradaron moléculas del tipo AHL para identificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Evaluar la toxicidad de los extractos realizados para evitar efectos nocivos al medio ambiente en caso de posibles aplicaciones posteriores.

Estudiar la posible actividad enzimas responsables de la actividad degradadora de moléculas AHL de los sobrenadantes de los cultivos de bacterias activas.

Realizar los ensayos pertinentes para inhibir biopelículas con más cepas conocidas como formadoras de biopelículas, tanto patógenas como aquellas relacionadas al proceso de biofouling.

Confirmar los resultados de inhibición de biopelículas con microscopía láser confocal, de forma que se logre visualizar las biopelículas de cada población bacteriana.

Evaluar en campo la actividad antifouling de los extractos activos incluidos en la formulación de pinturas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y.H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41: 1709-1721.
- Álvarez, B., P. Secades, M. Prieto, M.J. McBride & J.A. Guijarro. 2006. A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4044-4053.
- Antranikian, G., M. Suleiman, C. Schäfers, M.W. Adams, S. Bartolucci, J.M. Blamey, N.K. Birkeland, E. Bonch-Osmolovskaya, M.S. da Costa, D. Cowan, M. Danson, P. Forterre, R. Kelly, Y. Ishino, J. Littlechild, M. Moracci, K. Noll, T. Oshima, F. Robb, M. Rossi, H. Santos, P. Schönheit, R. Sterner, R. Thauer, M. Thomm, J. Wiegel & K.O. Stetter. 2017. Diversity of bacteria and archaea from two shallow marine hydrothermal vents from Vulcano Island. *Extremophiles*, 21: 733-742.
- Baker, B.J., L.R. Comolli, G.J. Dick, L.J. Hauser, D. Hyatt, B.D. Dill, M.L. Land, N.C. VerBerkmoes, R.L. Hettich & J.F. Banfield. 2010. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 8806-8811.
- Battistuzzi, F.U. & S.B. Hedges. 2008. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26: 335-343.
- Brelles-Marino, G. & E.J. Bedmar. 2001. Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *Journal of biotechnology*, 91: 197-209.
- Brencic, A. & S.C. Winans. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 155-194.
- Bull, A.T. & J.E. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in microbiology*, 15: 491-499.

- Canet, C., R.M. Prol-Ledesma, J.A. Proenza, M.A. Rubio-Ramos, M.J. Forrest, M.A. Torres-Vera & A.A. Rodríguez-Díaz. 2005. Mn–Ba–Hg mineralization at shallow submarine hydrothermal vents in bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology*, 224: 96-112.
- Case, R.J., Y. Boucher Y., I. Dahllöf, C. Holmström, W.F. Doolittle & S. Kjelleberg. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73: 278-288.
- Chao, A., R.L. Chazdon, R.K. Colwell & T.J. Shen. 2005. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology letters*, 8: 148-159.
- Chao, A., R.K. Colwell, C.W. Lin & N.J. Gotelli. 2009. Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators. *Ecology*, 90: 1125-1133.
- Christiaen, S.E., G. Brackman, H.J. Nelis & T. Coenye. 2011. Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *Journal of microbiological methods*, 87: 213-219.
- Covarrubias-Rodríguez. 2016. Caracterización de las comunidades microbianas en sedimentos del Golfo de México, mediante análisis metagenómico. Tesis Maestría. Ensenada, B.C., 68 p.
- Cowan, D., R. Daniel & H. Morgan. 1985. Thermophilic proteases: properties and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 3: 68-72.
- Cruz, M.M., I.V. Vega, H.L. Cobo, M.D. del Prado & P.N.C. Moreno 2013. Parasite fauna of *Paranthias colonus* (valenciennes, 1846) from El Sargento, Baja California Sur, México. *Neotropical Helminthology*, 7: 13-28.
- Dávila-Ramos, S., A. Estradas-Romero, R.M. Prol-Ledesma & K. Juárez-López. 2015. Bacterial populations (first record) at two shallow hydrothermal vents of the Mexican Pacific west coast. *Geomicrobiology Journal*, 32: 657-665.

- Delafont, V., A. Samba-Louaka, D. Bouchon, L. Moulin & Y. Héchar. 2015. Shedding light on microbial dark matter: a TM6 bacterium as natural endosymbiont of a free-living amoeba. *Environmental microbiology reports*, 7: 970-978.
- Dixit, S., R.C. Dubey, D.K. Maheshwari, P.K. Seth & V.K. Bajpai. 2017. Roles of quorum sensing molecules from *Rhizobium etli* RT1 in bacterial motility and biofilm formation. *Brazilian journal of microbiology*, 48: 815-821.
- Dong, Y.H. & L.H. Zhang 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *The Journal of Microbiology*, 43: 101-109.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19:1-48
- Ferrara-Guerrero, M.J., J.M. Romero-Jarero, S. Saitz-Ceballos, M.T. Núñez-Cardona, F.J. Villena-Irive. 1987. Distribución de bacterias en los sedimentos de la región sur del Golfo de California, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 15: 195-204.
- Fisher, C.R., K. Takai & N. Le Bris. 2007. Hydrothermal vent ecosystems. *Oceanography*, 20: 14-23.
- Forrest, M.J., J. Ledesma-Vázquez, W. Ussler III, J.T. Kulongoski, D.R. Hilton & H.G. Greene. 2005. Gas geochemistry of a shallow submarine hydrothermal vent associated with the El Requesón fault zone, Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology*, 224: 82-95.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66: 365-378.
- Gallut-Rubio, P. 2016. *Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de manantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, BCS, México*. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., 70 p.

- García-Maldonado, J.Q. 2009. *Análisis espacio temporal de la comunidad de cianobacterias de manantiales hidrotermales intermareales*. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., 87 p.
- Giovannelli, D., G. d'Errico, E. Manini, M. Yakimov & C. Vetriani. 2013. Diversity and phylogenetic analyses of bacteria from a shallow-water hydrothermal vent in Milos island (Greece). *Frontiers in microbiology*, 4: 184.
- Hanada, S. (2014) The Phylum Chloroflexi, the Family Chloroflexaceae, and the Related Phototrophic Families Oscillochloridaceae and Roseiflexaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 515-532 p.
- Handelsman, J., M.R. Rondon, S.F. Brady, J. Clardy & R.M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5: R245-R249.
- Hirayama, H., M. Sunamura, K. Takai, T. Nunoura, T. Noguchi, H. Oida, Y. Furushima, H. Yamamoto, Oomori, Tamotsu & K. Horikoshi. 2007. Culture-dependent and-independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. *Applied and environmental microbiology*, 73: 7642-7656.
- Hobbie, J.E., R.J. Daley & S. Jasper. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33: 1225-1228.
- Hobel, C.F., V.T. Marteinson, G.O. Hreggvidsson & J.K. Kristjánsson. 2005. Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA and chitinase genes. *Applied and environmental microbiology*, 71: 2771-2776.
- Howland, J.L. 2000. *The surprising archaea: discovering another domain of life*. New York: Oxford University press.

- Hua, N.P., A. Hamza-Chaffai, R.H. Vreeland, H. Isoda & T. Naganuma. 2008. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58: 2409-2414.
- Imhoff, J.F., A. Hiraishi & J. Süling. 2005. Anoxygenic phototrophic purple bacteria *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US. 119-132 p.
- Innis, M.A., K.B. Myambo, D.H. Gelfand & M.A. Brow. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 9436-9440.
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719–1728.
- Jensen, P.R., E. Gontang, C. Mafnas, T.J. Mincer & W. Fenical. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental microbiology*, 7: 1039-1048.
- Jiang, P., J. Li, F. Han, G. Duan, X. Lu, Y. Gu & W. Yu. 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One*, 6: e18514.
- Johnson, M.R., C.I. Montero, S.B. Connors, K.R. Shockley, S.L. Bridger & R.M. Kelly. 2005. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Molecular microbiology*, 55: 664-674.
- Jorgensen, B.B. & A. Boetius. 2007. Feast and famine—microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 770–781.
- Kalpana, B.J., S. Aarthy & S.K. Pandian. 2012. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167: 1778-1794.

- Khiyami, M.A., E.A. Serour, M.M. Shehata & A.H. Bahklia. 2012. Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11: 4053-4062.
- Kielak, A.M., C.C. Barreto, G.A. Kowalchuk, J.A. van Veen & E.E. Kuramae. 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, 7: 744.
- Kokare, C.R., S. Chakraborty, A.N. Khopade & K.R. Mahadik. 2009. Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8: 159-168.
- Lamed, R.J. & J.G. Zeikus. 1981. Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochemical Journal*, 195: 183-190.
- Leal-Acosta, M.L. & R.M. Prol-Ledesma. 2016. Caracterización geoquímica de las manifestaciones termales intermareales de Bahía Concepción en la Península de Baja California. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 68: 395-407.
- Leadbetter, J.R. & E.P. Greenberg. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology*, 182: 6921-6926.
- Lentini, V., C. Gugliandolo, B. Bunk, J. Overmann & T.L. Maugeri. 2014. Diversity of prokaryotic community at a shallow marine hydrothermal site elucidated by Illumina sequencing technology. *Current microbiology*, 69: 457-466.
- López, U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64: 7-31.
- Lule, A.D. 2007. *Participación de las moléculas señal acilo homoserina lactona, en la movilidad swarming en Vibrio spp, aislada de raíces del mangle negro Avicennia germinans*. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., 95 p.

- Magallanes, O. 1992. *Estudio del comportamiento de los procesos fisico-químicos de estero de Santispac en B.C.S., a través de una serie de 24 horas*. Res. IX Congr. Nal. Oceanogr. 21. En Castañeda, O. y F. Contreras. 1993. Serie: Bibliografía comentada sobre ecosistemas costeros mexicanos. Vol 1: Baja California Norte y Sur. CONABIO/UAM-I/CDELM, 489 p.
- Magurran, A.E. 1988. Why diversity?. En *Ecological diversity and its measurement*. Springer, Dordrecht. 1-5 p.
- Mamaeva, E.V., Y.P. Galach'yants, K.V. Khabudaev, D.P. Petrova, T.V. Pogodaeva, T.B. Khodzher & T.I. Zenskaya. 2016. Metagenomic analysis of microbial communities of the sediments of the Kara Sea shelf and the Yenisei Bay. *Microbiology*, 85: 220-230
- Maugeri, T. L., V. Lentini, C. Gugliandolo, F. Italiano, S. Cousin & E. Stackebrandt. 2009. Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy). *Extremophiles*, 13: 199-212.
- McFall, C.C. 1968. Reconnaissance geology of Concepcion Bay Area, Baja California, México: Stanford University Publications. *Geological Science*, 10: 1-25.
- Mendoza-Cruz, M., I. Valles-Vega, H. Lozano-Cobo, M. Gómez-del Prado Rosas & P.N. Castro-Moreno. 2013. Parasite fauna of *Paranthias colonus* (Valenciennes, 1846) from El Sargento, Baja California Sur, México. *Neotropical Helminthology*, 7:13-28.
- Mohammad, B.T., H.I. Al Daghistani, A. Jaouani, S. Abdel-Latif & C. Kennes. 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus liqueniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International journal of microbiology*, 2017:12 p.
- Morales, M., E. Ortiz, V. Caballero & R. Núñez. 2010. El funcionamiento de la colección de bacterias marinas. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 19.

- Morohoshi, T., Y. Tominaga, N. Someya & T. Ikeda. 2015. Characterization of a novel thermostable N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium *Thermaerobacter marianensis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120: 1-5.
- Naranjo-Gaybor, S.J. 2017. *Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos*. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá., 293 p.
- Nichols, J.D., M.R. Johnson, C.J. Chou & R.M. Kelly. 2009. Temperature, not LuxS, mediates AI-2 formation in hydrothermal habitats. *FEMS microbiology ecology*, 68: 173-181.
- Nicolaus, B., M. Kambourova & E.T. Oner. 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31: 1145-1158.
- Nithyanand, P. & S.K. Pandian. 2009. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS microbiology ecology*, 69: 384-394.
- Ogasahara, K., A. Imanishi & T. Isemura. 1970. Studies on Thermophilic α -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *The Journal of biochemistry*, 67: 65-75.
- Parsek, M.R., D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan & E.P. Greenberg. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 4360-4365.
- Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. *Annual review of ecology and systematics*, 5: 285-307.
- Proctor, L.M. 1997. Nitrogen-fixing, photosynthetic, anaerobic bacteria associated with pelagic copepods. *Aquatic Microbial Ecology*, 12: 105-113.
- Prol-Ledesma, R. M., C. Canet, M.A. Torres-Vera, M.J. Forrest & M.A. Armienta. 2004. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal

system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 137: 311-328.

Pucci, G.N., A.J. Acuña, M.L. Llanes, M.C. Tiedemann & O.H. Pucci. 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44: 49-58.

Pucci, G. N., A. Acuña, N. Tonin, M.C. Tiedemann & O.H. Pucci. 2010. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista Peruana de Biología*, 17: 237-244.

Rivardo, F., R.J. Turner, G. Allegrone, H. Ceri & M.G. Martinotti. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 83: 541-553.

Rodelas, B., J.K. Lithgow, F. Wisniewski-Dye, A. Hardman, A. Wilkinson, A. Economou, P. Williams & J.A. Downie. 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Journal of bacteriology*, 181: 3816-3823.

Rodríguez-Valdez, G. 2017. *Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur*. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., 105 p.

Romero-Bernárdez, M. 2010. *Intercepción de señales de comunicación bacteriana tipo " N"-Acilhomoserín Lactonas (AHLs) en bacterias aisladas del medio marino*. Tesis Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, 379 p.

Rothballer, M., J. Uhl, J. Kunze, P. Schmitt-Kopplin & A. Hartmann. 2018. Detection of the Bacterial Quorum-Sensing Signaling Molecules N-Acyl-Homoserine Lactones (HSL) and N-Acyl-Homoserine (HS) with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and via Ultrahigh-Performance Liquid

Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (UHPLC-MS). *Quorum Sensing*, 1673: 61-72

- Sangwan, P., S. Kovac, K.E. Davis, M. Sait & P.H. Janssen. 2005. Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia. *Applied and environmental microbiology*, 71: 8402-8410.
- Sayem, S. A., E. Manzo, L. Ciavatta, A. Tramice, A. Cordone, A. Zanfardino, M. De Felice & M. Varcamonti. 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell factories*, 10: 74.
- Schaefer, A.L., D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan & E.P. Greenberg. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 9505-9509.
- Seo, M.J., B.S. Lee, Y.R. Pyun & H. Park. 2011. Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldoxylosilyticus* YS-8. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75: 1789-1795.
- Sievert, S.M., W. Ziebis, J. Kuever & K. Sahm. 2000. Relative abundance of Archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallow-water hydrothermal vent quantified by rRNA slot-blot hybridization. *Microbiology*, 146: 1287-1293.
- Sompong, U., P.R. Hawkins, C. Besley & Y. Peerapornpisal. 2005. The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 365-376.
- Sonnleitner, B. 1983. *Biotechnology of thermophilic bacteria—growth, products, and application*. In *Microbial Activities*. Springer, Berlin, Heidelberg. 69-138 p.
- Soto, L.A., & A. Estradas Romero. 2013. La exploración en el mar profundo de ambientes extremos: sistemas hidrotermales. La frontera final: el océano profundo. INECC, México, 105-149.

- Suárez-Moya, A. 2017. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*, 30: 305-311.
- Süss J, B. Engelen, H. Cypionka & H. Sass. 2004. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation dependent methods. *Microbiology Ecology*, 51: 109-121
- Takai, K. & K. Horikoshi. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152: 1285-1297.
- Tang, K., K. Liu, N. Jiao, Y. Zhang & C-T.A. Chen. 2013. Functional Metagenomic Investigations of Microbial Communities in a Shallow-Sea Hydrothermal System. *PLoS ONE*, 8: e72958.
- Tarasov, V. G., A.V. Gebruk, A.N. Mironov & L.I. Moskalev. 2005. Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chemical Geology*, 224: 5-39.
- Tringe, S. G., C. Von Mering, A. Kobayashi, A.A. Salamov, K. Chen, H.W. Chang, M. Podar, J.M. Short, E.J. Mathur, J.C. Detter, P. Bork, P. Hugenholtz & E.M. Rubin. (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308: 554-557.
- Van Dover, C. 2000. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press. 425 p.
- Verma, P., R.V. Raghavan, C.O. Jeon, H.J. Lee, P.V. Priya, G. Dharani & R. Kirubakaran. 2017. Complex bacterial communities in the deep-sea sediments of the Bay of Bengal and volcanic Barren Island in the Andaman Sea. *Marine genomics*, 31: 33-41.
- Wang, L., M.K. Cheung, H.S. Kwan, J.S. Hwang & C.K. Wong. 2015. Microbial diversity in shallow-water hydrothermal sediments of Kueishan Island, Taiwan as revealed by pyrosequencing. *Journal of basic microbiology*, 55: 1308-1318.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments. *Nature*, 223: 858-858.

- Wiegel, J. 1998. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles*, 2: 257-267.
- Yeoh, Y.K., Y. Sekiguchi, D.H. Parks, & P.Hugenholtz. 2015. Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage. *Molecular biology and evolution*, 33: 915-927.
- Yohandini, H., Julinar & Muharni. 2015. Isolation and Phylogenetic Analysis of Thermophile Community Within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22: 143-148.
- Zeikus, J.G. 1979. Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1: 243-252.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Composición taxonómica a nivel de filo de bacterias presentes en las muestras de los distintos sitios de muestreo.

Familia	Total	BS	CBS	MS	CMS	SS	CSS	BLL	CBLL	MLL	CMLL	SLL	CSLL
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Sin asignación, Otro	5.5%	2.6%	13.9%	3.3%	11.0%	4.8%	2.6%	7.1%	1.0%	6.4%	0.7%	10.5%	2.3%
Archaea; Crenarchaeota	1.0%	0.0%	0.2%	0.6%	0.0%	0.3%	1.5%	1.0%	0.1%	6.2%	1.2%	0.7%	0.3%
Archaea; Euryarchaeota	0.7%	0.0%	0.8%	0.0%	0.7%	0.0%	0.7%	1.2%	0.1%	0.8%	0.0%	2.1%	2.3%
Archaea; Parvarchaeota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.3%	0.0%
Bacteria; OP8	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.3%	0.0%
Bacteria; Acidobacteria	4.1%	1.2%	3.7%	0.6%	3.2%	4.4%	9.3%	0.5%	6.1%	1.5%	2.6%	6.5%	9.2%
Bacteria; Actinobacteria	16.4%	3.1%	29.7%	4.1%	31.8%	40.8%	15.6%	2.4%	9.6%	4.3%	10.7%	20.9%	23.3%
Bacteria; AncK6	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
Bacteria; Aquificae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria; BHI80-139	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria; BRC1	0.3%	0.0%	0.7%	0.6%	1.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria; Bacteroidetes	4.5%	4.6%	1.7%	15.2%	1.1%	1.7%	6.2%	6.9%	5.1%	0.8%	4.9%	2.4%	3.0%
Bacteria; Caldithrix	1.1%	5.9%	0.9%	1.3%	1.0%	0.0%	0.1%	2.7%	0.3%	1.0%	0.1%	0.0%	0.4%
Bacteria; Chlamydiae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria; Chlorobi	0.1%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%

Bacteria; Chloroflexi	12.0 %	12.2 %	11.2 %	16.0 %	9.3 %	20.7 %	5.0 %	9.4 %	2.2 %	39.5 %	1.8% %	10.4% %	6.7 %
Bacteria; Cyanobacteria	12.6 %	11.7 %	1.0 %	28.3 %	0.7 %	0.0 %	8.2 %	29.0 %	31.0 %	0.9 %	37.8 %	1.2 %	1.0 %
Bacteria; Deferribacteres	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.2 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; EM3	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.4 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Fibrobacteres	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.1 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Firmicutes	2.7 %	13.1 %	0.6 %	0.3 %	0.0 %	0.4 %	8.2 %	0.4 %	1.4 %	3.2 %	0.4% %	1.8 %	2.1 %
Bacteria; Fusobacteria	0.3 %	3.3 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; GAL15	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.1 %	0.0 %
Bacteria; GN02	0.1 %	0.1 %	0.2 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; GN04	0.1 %	0.4 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Gemmatimonadetes	3.0 %	0.0 %	8.3 %	1.3 %	10.1 %	3.3 %	1.0 %	0.0 %	0.4 %	1.3 %	0.2% %	5.1 %	4.9 %
Bacteria; KSB3	0.0 %	0.3 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; LCP-89	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; NC10	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; NKB19	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.1% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Nitrospirae	1.1 %	1.1 %	2.1 %	1.1 %	2.3 %	0.0 %	0.8 %	2.2 %	0.6 %	1.6 %	0.2% %	1.0 %	0.0 %
Bacteria; OD1	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.2 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %
Bacteria; OP1	0.7 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.1 %	4.6 %	0.0 %	2.0 %	0.1 %	1.2 %	0.0% %	0.8 %	0.0 %
Bacteria; OP11	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.3 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.6 %	0.0% %	0.0 %	0.0 %

Bacteria; OP8	0.9 %	0.2 %	0.2 %	1.8 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.4 %	0.0 %	8.6 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; OP9	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Planctomycetes	1.2 %	0.6 %	0.7 %	0.5 %	0.5 %	2.5 %	1.2 %	0.2 %	0.5 %	1.5 %	0.6%	2.6 %	2.6 %
Bacteria; Poribacteria	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria;_Proteobacteria	28.5 %	35.8 %	21.7 %	23.6 %	24.8 %	10.1 %	34.1 %	31.3 %	38.7 %	16.7 %	36.4 %	32.0 %	36.6 %
Bacteria; SBR1093	0.2 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.1 %	1.7 %	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.4%	0.1 %	0.0 %
Bacteria; SC4	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.2 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; SR1	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Spirochaetes	0.2 %	1.6 %	0.1 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.5 %	0.4 %	0.1%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; TM6	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.7 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %	1.5 %
Bacteria; TM7	0.2 %	0.0 %	0.2 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	1.2 %	0.0 %	0.2 %	0.1 %	0.1%	0.2 %	0.0 %
Bacteria; Thermotogae	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria; Verrucomicrobia	1.0 %	0.8 %	0.4 %	0.2 %	0.2 %	3.2 %	2.0 %	0.4 %	1.3 %	0.5 %	1.8%	0.0 %	1.5 %
Bacteria; WPS-2	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria;_WS3	0.2 %	0.7 %	0.1 %	0.1 %	0.2 %	0.0 %	0.3 %	0.5 %	0.1 %	0.0 %	0.1%	0.0 %	0.0 %
Bacteria;_WS6	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.1 %	0.0%	0.0 %	0.0 %
Bacteria;_Caldithrix	0.6 %	0.1 %	1.1 %	0.4 %	0.9 %	0.0 %	0.2 %	0.5 %	0.2 %	0.8 %	0.0%	0.5 %	1.7 %
Bacteria; Thermi	0.2 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.2 %	1.5 %	0.3 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0%	0.2 %	0.6 %

11.1 Anexo 2. Morfologías coloniales de las distintas cepas aisladas de los sitios de muestreo.

Colonia	Color	Forma	Borde	Elevación	Gram
1	Naranja	irregular	ondulado	elevado	positiva
2	Crema	irregular	entero	convexo	positiva
3	Crema	circular	ondulado	elevado	positiva
4	Beige	circular	ondulado	elevado	positiva
5	Beige	circular	entero	plano	positiva
6	Crema	circular	entero	plano	positiva
7	Crema	circular	entero	plano	positiva
8	Beige	irregular	filamentoso	elevado	negativa
9	Beige	Irregular	filamentoso	plano	negativa
10	Beige	circular	entero	elevado	positiva
11	Crema	circular	entero	elevado	positiva
12	beige	circular	entero	convexo	positiva
13	crema con café	circular	entero	convexo	negativa
14	crema	circular	entero	elevado	positiva
15	blanco	circular	entero	elevado	positiva
16	rosa	circular	entero	plano	positiva
17	verde	circular	entero	elevado	negativa
18	blanco	circular	ondulado	umbonado	positiva
19	crema	circular	ondulado	elevado	positiva
20	beige	circular	entero	elevado	positiva
21	beige	rizoide	entero	elevado	positiva
22	amarillo	circular	ondulado	umbonado	positiva
23	beige	irregular	ondulado	elevado	positiva
24	naranja	circular	filamentoso	umbonado	negativa
25	blanco	circular	entero	elevado	negativa
26	crema	irregular	filamentoso	elevado	positiva
27	crema	irregular	filamentoso	elevado	positiva
28	beige	circular	entero	plano	negativa
29	naranja	circular	entero	elevado	negativa
30	rojo	circular	entero	elevado	positiva
31	blanco	irregular	filamentoso	elevado	positiva
32	blanco	irregular	entero	plano	positiva
33	crema	irregular	entero	elevado	negativa
34	beige	rizoide	entero	elevado	positiva
35	verde	circular	entero	elevado	positiva
36	rosa	circular	entero	elevado	negativa
37	blanco	circular	entero	elevado	positiva
38	crema	circular	entero	plano	positiva
39	crema	circular	entero	elevado	positiva
40	blanco	irregular	entero	plano	positiva

41	blanco	circular	entero	elevado	positiva
42	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
43	beige	circular	entero	elevado	negativa
44	blanco	circular	entero	plano	positiva
45	blanco	circular	entero	elevado	positiva
46	blanco	circular	ondulado	umbonado	positiva
47	blanco	circular	ondulado	elevado	negativa
48	crema	circular	entero	elevado	positiva
49	blanco	rizoide	entero	elevado	positiva
50	blanco	circular	ondulado	umbonado	positiva
51	blanco	irregular	ondulado	elevado	negativa
52	crema	circular	filamentoso	umbonado	positiva
53	blanco	circular	entero	elevado	positiva
54	naranja	irregular	filamentoso	elevado	positiva
55	blanco	irregular	filamentoso	elevado	positiva
56	beige	circular	entero	convexo	negativa
57	beige	circular	ondulado	elevado	positiva
58	beige	circular	entero	plano	positiva
59	crema	circular	entero	plano	positiva
60	amarillo claro	circular	entero	convexo	negativa
61	amarillo	circular	entero	convexo	negativa
62	blanco	circular	entero	plano	positiva
63	blanco	circular	entero	plano	positiva
64	amarillo claro	circular	ondulado	convexo	negativa
65	blanco	circular	entero	elevado	positiva
66	amarillo	circular	ondulado	convexo	negativa
67	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
68	beige	irregular	entero	plano	positiva
69	beige	circular	entero	convexo	negativa
70	beige	irregular	filamentoso	plano	positiva
71	naranja	circular	ondulado	umbonado	negativa
72	beige	circular	entero	plano	positiva
73	crema	circular	entero	plano	positiva
74	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
75	amarillo oscuro	circular	entero	convexo	negativa
76	beige	irregular	filamentoso	elevado	positiva
77	naranja	circular	ondulado	umbonado	negativa
78	blanco	circular	entero	elevado	positiva
79	blanco	circular	entero	plano	positiva
80	amarillo	circular	entero	convexo	negativa
81	blanco	circular	entero	plano	positiva
82	blanco	circular	entero	elevado	positiva
83	negro	irregular	rizado	umbonado	negativa
84	crema	circular	entero	convexo	negativa
85	crema	circular	entero	convexo	negativa

86	crema	circular	entero	plano	positiva
87	crema	circular	entero	elevado	positiva
88	blanco	irregular	entero	plano	positiva
89	blanco	circular	entero	elevado	positiva
90	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
91	beige	circular	entero	plano	positiva
92	crema	circular	entero	elevado	positiva
93	blanco	circular	entero	convexo	negativa
94	beige	irregular	entero	plano	positiva
95	crema	circular	entero	plano	positiva
96	crema	circular	entero	plano	positiva
97	negro	irregular	rizado	umbonado	negativa
98	crema	circular	ondulado	elevado	positiva
99	blanco	circular	entero	plano	positiva
100	crema	circular	entero	convexo	negativa
101	naranja	irregular	ondulado	elevado	positiva
102	crema	irregular	entero	convexo	positiva
103	crema	circular	ondulado	elevado	positiva
104	beige	circular	ondulado	elevado	positiva
105	beige	circular	entero	plano	positiva
106	crema	circular	entero	plano	positiva
107	crema	circular	entero	plano	positiva
108	blanco	rizoide	entero	elevado	positiva
109	blanco	circular	ondulado	umbonado	negativa
110	blanco	irregular	ondulado	elevado	negativa
111	crema	circular	filamentoso	umbonado	positiva
112	blanco	circular	entero	elevado	negativa
113	naranja	irregular	filamentoso	elevado	positiva
114	blanco	irregular	filamentoso	elevado	positiva
115	beige	circular	entero	convexo	positiva
116	beige	circular	ondulado	elevado	positiva
117	beige	circular	entero	plano	negativa
118	crema	circular	entero	plano	positiva
119	amarillo claro	circular	entero	convexo	negativa
120	amarillo	circular	entero	convexo	positiva
121	blanco	circular	entero	plano	positiva
122	blanco	circular	entero	plano	positiva
123	amarillo claro	circular	ondulado	convexo	negativa
124	blanco	circular	entero	elevado	positiva
125	amarillo	circular	ondulado	convexo	positiva
126	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
127	beige	irregular	entero	plano	positiva
128	beige	circular	entero	convexo	positiva
129	beige	irregular	filamentoso	plano	negativa
130	naranja	circular	ondulado	umbonado	negativa

131	beige	circular	entero	plano	positiva
132	crema	circular	entero	plano	positiva
133	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva
134	amarillo oscuro	circular	entero	convexo	negativa
135	beige	irregular	filamentoso	elevado	positiva
136	naranja	circular	ondulado	umbonado	positiva
137	blanco	circular	entero	elevado	negativa
138	blanco	circular	entero	plano	positiva
139	amarillo	circular	entero	convexo	positiva
140	blanco	circular	entero	plano	negativa
141	blanco	circular	entero	elevado	positiva
142	beige	irregular	rizado	umbonado	positiva
143	blanco	rizoide	entero	elevado	positiva
144	blanco	circular	ondulado	umbonado	negativa
145	blanco	irregular	ondulado	elevado	positiva
146	crema	circular	filamentoso	umbonado	positiva
147	blanco	circular	entero	elevado	positiva
148	naranja	irregular	filamentoso	elevado	positiva
149	blanco	irregular	filamentoso	elevado	negativa
150	beige	circular	entero	convexo	negativa
151	beige	circular	ondulado	elevado	positiva
152	beige	circular	entero	plano	positiva
153	crema	circular	entero	plano	positiva
154	amarillo claro	circular	entero	convexo	negativa
155	amarillo	circular	entero	convexo	positiva
156	blanco	circular	entero	plano	negativa
157	blanco	circular	entero	plano	positiva
158	amarillo claro	circular	ondulado	convexo	positiva
159	blanco	circular	entero	elevado	positiva
160	amarillo	circular	ondulado	convexo	negativa
161	blanco	irregular	filamentoso	plano	positiva