



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVERSIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE  
BACTERIAS HETERÓTROFAS CULTIVABLES DEL  
PACÍFICO TROPICAL MEXICANO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**ISAAC GUZMÁN BECERRIL**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SILVIA PAJARES MORENO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Guzmán

Becerril

Isaac

Universidad Nacional

Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308038228

2. Datos del tutor

Dra.

Silvia

Pajares

Moreno

3. Datos de sinodal 1

Dr.

Miroslav

Macek

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Laura

Espinosa

Asuar

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Luis David

Alcaraz

Peraza

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Morena

Avitia

Cao Romero

7. Datos del trabajo

escrito

Diversidad y actividad

enzimática de bacterias

heterótrofas del Pacífico

tropical mexicano

85 pp.

2018

*A México y a su Universidad Nacional.*

*Agradezco a mi familia por apoyarme:*

*A Yoya y Carmen, mis abuelas, por las raíces que me dieron. A mi mamá y mi papá por la parte mía que ellos formaron. A Halley, mi sobrina, por invitarme a seguir viendo lo importante en la vida. A Emmanuel, por el tiempo y espacio que compartimos. A mis hermanos, Mariana y Abraham, que me han acompañado desde que tengo recuerdos. A mis amigos, por darme algo más valioso que el conocimiento.*

*Agradezco también, además de su amistad, a la Dra. Silvia Pajares por enseñarme lo que no está en los libros y por dirigirme en este trabajo con empeño y profesionalismo. A la M. en C. Irma Wong por la compañía y ayuda en el trabajo de laboratorio. A Cassandra Montoya, por la retroalimentación y por el apoyo en el laboratorio. A Nadia Herrera por ampliar mi visión en las ciencias del mar. A Flor Duran, por la compañía. A Ramiro Ramos por los consejos. Al Proyecto PAPIIT-IA201617 de la Dra. Silvia Pajares por subvencionar la investigación llevada a cabo en esta Tesis. Al Instituto de Ciencias del Mar y a la Universidad Nacional Autónoma de México por los espacios, recursos y por la oportunidad de desarrollar este proyecto.*

## ÍNDICE

I.	Índice de tablas y figuras .....	6
II.	Resumen .....	7
III.	Abreviaturas.....	8
IV.	Introducción.....	9
	i.    Importancia de las bacterias heterótrofas en el océano .....	9
	ii.   Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana .....	12
	iii.  Filogenia molecular bacteriana con el gen que codifica el 16S rRNA... ..	14
	iv.   Estimadores de la diversidad microbiana .....	16
	v.    Composición bacteriana heterótrofa marina cultivable .....	19
	vi.   Potencial biotecnológico de bacterias heterótrofas marinas.....	22
V.	Justificación .....	23
VI.	Objetivos.....	24
	i.    General.....	24
	ii.   Particulares .....	24
VII.	Hipótesis .....	24
VIII.	Materiales y Métodos .....	25
	i.    Área de estudio & muestreo .....	25
	ii.   Perfiles y mapas oceanográficos .....	27
	iii.  Aislamiento y conservación de cepas.....	27
	iv.   Identificación molecular bacteriana .....	27
	a) Extracción DNA genómico .....	27
	b) PCR y electroforesis .....	28
	c) Secuenciación del gen que codifica el 16S y clasificación .....	29
	v.    Análisis filogenéticos, estadísticos y de diversidad .....	29
	vi.   Caracterización enzimática .....	30
	a) Lipasas & esterases .....	30
	b) Celulasas .....	30
	c) Quitinasas .....	30
	d) Oxidasas .....	30
	e) Catalasas .....	30
IX.	Resultados.....	30
	i.    Características hidrológicas de los sitios de muestreo .....	30
	ii.   Aislamiento bacteriano.....	38
	iii.  Análisis filogenéticos de los representantes bacterianos cultivados .....	39
	iv.   Análisis de la diversidad bacteriana .....	43
	v.    Caracterización enzimática.....	45
X.	Discusión .....	50
	i.    Características hidrológicas de las estaciones de muestreo.....	50
	ii.   Diversidad bacteriana cultivable y su relación con las variables hidrológicas .....	51
	iii.  Potencial enzimático de bacterias heterótrofas del Pacífico tropical mexicano .....	54
XI.	Conclusiones .....	57

XII.	Perspectivas .....	58
XIII.	Referencias .....	59
XIV.	Anexos .....	68

## I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b>	Estaciones de muestreo .....	26
<b>Tabla 2.</b>	Amplificación del gen que codifica el 16S rRNA bacteriano.....	28
<b>Tabla 3.</b>	Condiciones de la PCR.....	28
<b>Tabla 4.</b>	Medias $\pm$ DS de las variables hidrológicas según su distribución vertical.....	31
<b>Tabla 5.</b>	Componentes principales .....	31
<b>Tabla 6.</b>	Clasificación taxonómica bacteriana.....	35
<b>Tabla 7.</b>	Media $\pm$ DS índices de diversidad según su distribución vertical ....	44
<b>Figura 1.</b>	Bucle microbiano .....	10
<b>Figura 2.</b>	Construcción de un árbol filogenético .....	16
<b>Figura 3.</b>	Mapa del área de muestreo.....	26
<b>Figura 4.</b>	PCA de datos ambientales.....	32
<b>Figura 5.</b>	Perfil de temperatura .....	33
<b>Figura 6.</b>	Perfil de fluorescencia.....	34
<b>Figura 7.</b>	Perfil de oxígeno disuelto.....	35
<b>Figura 8.</b>	Mapa de oxígeno disuelto a 40 m de profundidad .....	36
<b>Figura 9.</b>	Perfil de oxígeno de Cabo Corrientes .....	37
<b>Figura 10.</b>	Perfil de oxígeno de Manzanillo .....	37
<b>Figura 11.</b>	Perfil de oxígeno de Maruata .....	37
<b>Figura 12.</b>	Colonias aisladas .....	38
<b>Figura 13.</b>	Morfotipos obtenidos .....	39
<b>Figura 14.</b>	Árbol filogenético .....	40
<b>Figura 15.</b>	Composición bacteriana por transecto .....	42
<b>Figura 16.</b>	Composición bacteriana costera.....	43
<b>Figura 17.</b>	Composición bacteriana oceánica .....	43
<b>Figura 18.</b>	NMDS de abundancias.....	45
<b>Figura 19.</b>	Actividad enzimática bacteriana .....	46
<b>Figura 20.</b>	Cepas lipolíticas .....	47
<b>Figura 21.</b>	Actividad lipolítica con T20.....	48
<b>Figura 22.</b>	Actividad lipolítica con T80.....	49



## II. RESUMEN

Las bacterias heterótrofas del medio marino degradan la materia orgánica, generando compuestos inorgánicos en el proceso. Estos procesos son parte esencial de los océanos porque regulan la dinámica de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y los ciclos biogeoquímicos. Estas transformaciones de materia son realizadas por enzimas que catalizan gran variedad de compuestos orgánicos, que además de la importancia ecológica, son de interés biotecnológico por sus aplicaciones potenciales en diferentes industrias. En este trabajo se cultivaron y caracterizaron bacterias heterótrofas del Pacífico tropical mexicano para conocer su diversidad y actividad enzimática potencial. El aislamiento de bacterias se realizó a lo largo de tres transectos (once estaciones) y a tres profundidades (superficie, primer máximo de clorofila y final de la oxiclina). Las cepas se caracterizaron morfológicamente y molecularmente y se determinó la actividad enzimática de celulasas, quitinasas, lipasas, esterases, oxidasas y catalasas. Se aislaron 2,412 colonias bacterianas pertenecientes a 231 diferentes morfotipos, de las cuales se caracterizaron molecularmente 79 cepas representativas pertenecientes a las clases Actinobacteria, Flavobacteriia, Bacilli, Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, que forman parte de los principales grupos de bacterias heterótrofas marinas cultivables. Aunque no hubo diferencias significativas entre las tres profundidades de muestreo, la mayor diversidad se encontró al final de la oxiclina. Asimismo, la diversidad bacteriana cultivable estuvo asociada con las características abióticas del mar, donde principalmente la temperatura, fluorescencia y oxígeno disuelto influyeron en la diversidad presente en la zona de estudio. La mayor parte de las bacterias cultivadas tuvieron actividad quitinolítica y solo cepas pertenecientes a Actinobacteria y Flavobacteriia fueron celulolíticas. Todas las cepas ensayadas fueron oxidasa positiva, excepto las pertenecientes a Actinobacteria y *Vibrio*. Una cepa perteneciente a *Vibrionaceae* fue catalasa negativa. Todas las cepas tuvieron actividad de lipasas y esterases, excepto las pertenecientes a *Bacillus*. Las cepas lipolíticas degradaron más eficientemente lípidos de cadena corta a 30°C que lípidos de cadena larga a 17°C. Las bacterias cultivadas con actividad enzimática tienen importancia potencial en la degradación de la materia orgánica, por lo tanto, podrían estar participando activamente en la dinámica de los nutrientes y en los principales ciclos biogeoquímicos en aguas del Pacífico tropical mexicano.

### III. ABREVIATURAS

<b>16S rRNA</b>	Operón codificante de 16S rRNA
<b>B/O</b>	Buque oceanográfico
<b>BBC</b>	Bomba biológica de carbono
<b>C</b>	Carbono
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CTD</b>	Conductividad-temperatura-profundidad
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifostato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>mLB</b>	Medio LB
<b>mM</b>	Medio marino
<b>mN</b>	Medio nutritivo
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MOD</b>	Materia orgánica disuelta
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Óxido nitroso
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>NMDS</b>	Escalamiento multidimensional no métrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>O<sup>-2</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH</b>	Hidroxilo
<b>PC1</b>	Componente principal 1
<b>PC2</b>	Componente principal 2
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Fosfato
<b>RDP</b>	Ribosomal Database Project
<b>RIDOM</b>	Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>T20</b>	Tween 20 (ácido laurítico)
<b>T80</b>	Tween 80 (ácido oléico)
<b>ZMO</b>	Zona de mínimo oxígeno

## IV. INTRODUCCIÓN

### **Importancia de las bacterias heterótrofas en el océano**

El océano es el ecosistema más grande de la biosfera y ocupa cerca del 70% de la superficie terrestre. Este ecosistema tiene características que lo hacen un medio heterogéneo ya que es un lugar con presiones y salinidades altas, temperaturas bajas y ausencia de luz. En este vasto ecosistema, las bacterias heterótrofas se han adaptado para sobrevivir a estas condiciones tan variantes (Das et al., 2006). Como consecuencia, a lo largo de su historia evolutiva, estos microorganismos han desarrollado genes, moléculas y diferentes procesos bioquímicos mediante los cuales han logrado colonizar este ambiente.

Las bacterias heterótrofas son organismos clave para entender la dinámica ecológica del sistema marino. Estas bacterias regulan la dinámica de muchos compuestos y de esta manera regulan también la dinámica de los ciclos biogeoquímicos en el océano (Arrigo, 2005; Falkowski, 2012). Compuestos como el CO<sub>2</sub> y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) se generan como productos de la actividad bacteriana y pertenecen a los gases más potentes que generan el efecto invernadero (Kirchman, 2008). Dado que el océano representa el ecosistema más grande de la Tierra, se debe tener en cuenta el papel de los microorganismos en la salud del océano y, particularmente, en la dinámica biogeoquímica entre estos organismos y el ambiente marino, así como su posible impacto en el cambio climático (Das et al., 2006).

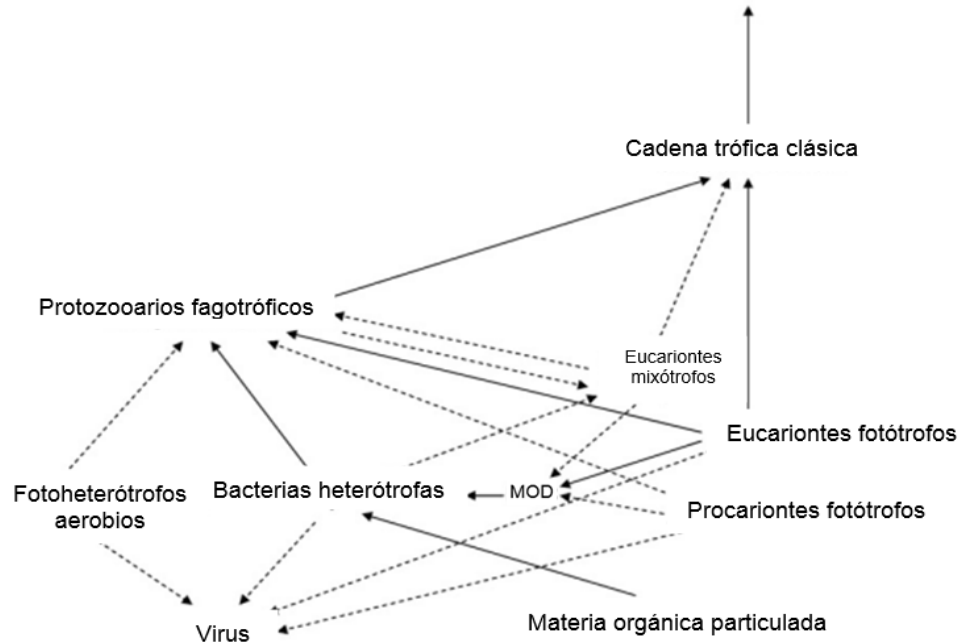
Las bacterias heterótrofas mineralizan la materia orgánica disuelta (MOD) en el océano, generando compuestos inorgánicos como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (Sherr & Sherr, 2008). Específicamente en el mar abierto, aproximadamente el 90% de la MOD es mineralizada por estas bacterias en la zona superior oceánica, y solamente entre el 1% y 10% llega a aguas profundas (Azam & Malfatti, 2007), lo cual refleja la alta actividad biológica de estos microorganismos y su efectividad como descomponedores (Sherr & Sherr, 2008). La mineralización de la MOD también se puede realizar por medio de reacciones químicas abióticas y fotoquímicas (Kirchman, 2008), pero en menor proporción.

Una fracción importante de la MOD marina está compuesta por el carbono orgánico disuelto (COD), que es el mayor componente de la MOD, el cual está presente en una cantidad equivalente a todo el CO<sub>2</sub> atmosférico (Hedges & Oades, 1997). Por tanto, el océano tiene un papel muy importante en la absorción y regulación del carbono (C) a nivel global

debido a la actividad biológica oceánica (Neuer, et al., 2014). Este proceso de acumulación de C en el océano recibe el nombre de bomba biológica de carbono (BBC) y refleja el papel fundamental que tienen los microorganismos marinos en el secuestro de C a nivel global (Falkowski, 2012). Por ejemplo, se sabe que los microorganismos participantes en la dinámica de la BBC regulan la cantidad de C en la atmósfera, de manera que un aumento en la cantidad de C en el océano se traduce como una disminución en la cantidad de CO<sub>2</sub> atmosférico, y viceversa (Neuer et al., 2014).

Aunque el océano es rico en C, es un ambiente generalmente oligotrófico, es decir, los nutrientes son mayoritariamente escasos. Los nutrientes son regulados por la cantidad y la disponibilidad de MOD así por los microorganismos participantes en los procesos de mineralización (Kirchman, 2008; Falkowski, 2012). De esta forma la concentración de nutrientes en este ecosistema determina la diversidad microbiana presente y la presencia de otros organismos como protozoarios, hongos, algas y animales en el medio marino.

Una fracción importante de la producción primaria marina pasa a formar parte de la MOD, la cual es usada por bacterias heterótrofas, que después son consumidas por protozoarios (Azam et al., 1983; Fenchel, 2008); la integración de nutrientes en la cadena trófica comienza por la descomposición de la MOD por bacterias heterótrofas, para después ser aprovechadas por flagelados bacterióvoros, que a su vez son presa de ciliados, y así sucesivamente en la cadena trófica (Azam et al., 1983; Ducklow, 1983). A esta dinámica trófica se le conoce como bucle microbiano (**Figura 1**), término que enfatiza las interacciones no lineales y la complejidad en los cambios de la materia orgánica (MO) en la cadena trófica entre microorganismos en la columna de agua.



**Figura 1.** Bucle microbiano. Las flechas oscuras corresponden a la dinámica descrita en el artículo original de Azam et al. (1983), las flechas punteadas son interacciones propuestas posteriormente. Obtenido y modificado de Fenchel et al. (2008).

En aguas oligotróficas, el bucle microbiano tiene gran influencia en la mineralización de la MO y en la incorporación de nutrientes en la red trófica, con lo cual se regenera la producción de nutrientes en sistemas nutricionalmente pobres (Chisholm, 1992; Fuhrman, 2008). Es importante mencionar que la MO en el océano proviene de la actividad biológica de microorganismos fotótrofos y eucariontes mixótrofos (Fenchel, 2008).

Recientemente se ha estudiado el papel de los virus en el bucle microbiano. Estos microorganismos, al ser patógenos muy específicos de ciertos grupos microbianos, pueden alterar la dinámica del ciclo de nutrientes al modificar la actividad y abundancia de estos grupos funcionalmente importantes, tales como las bacterias heterótrofas (Fuhrman, 2008).

Dada la importancia de los microorganismos marinos en general, en los últimos años, ha habido un gran interés por el estudio de su diversidad metabólica y fisiológica y, en particular los procariontes, así como la estructura de las comunidades, sus patrones de distribución y sus efectos e importancia en el ecosistema marino (Bolhuis & Cretoiu, 2016; Moran, 2015; Pommier et al., 2007). Los procariontes marinos tienen gran potencial biotecnológico porque de ellos se han aislado gran variedad de compuestos con actividad

biológica, tales como enzimas, las cuales tienen múltiples aplicaciones industriales (Manivasagan et al., 2014).

### **Técnicas moleculares e importancia de los cultivos bacterianos**

Tradicionalmente los microorganismos han sido estudiados mediante pruebas físicas y bioquímicas (Oliver, 1982). Este enfoque requiere del cultivo de los microorganismos, sin embargo, se sabe que el número de bacterias que pueden crecer en medios de cultivos es mucho menor a la cantidad de bacterias viables en una muestra ambiental (Fuhrman, 2008), siendo una gran limitación en el estudio de la diversidad microbiana.

Se estima que solamente del 0.001 al 1% de la diversidad bacteriana ha sido descrita (Hawksworth & Colwell, 1992), es decir, si conocemos cerca de 14,800 especies de bacterias (número de especies descritas según el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; <http://www.dsmz.de/>), entonces desconocemos casi 3 millones de especies (Colwell, 1997; Overmann, 2010) y, con ello, su papel e importancia ecológica en la biosfera, así como las aplicaciones potenciales de sus productos naturales. A esta discordancia entre la cantidad de bacterias totales y aquellas que generan colonias en placa se conoce como la gran anomalía de conteo en placa (Staley & Konopka, 1985).

Ante este problema, donde el estudio de la diversidad bacteriana está limitado por la cantidad de bacterias que se pueden aislar en medios de cultivo, las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación han permitido estudiar y clasificar la diversidad sin la necesidad de aislar y cultivar a las bacterias (Schneider & Riedel, 2010). Además, la secuenciación de genes y genomas bacterianos han permitido el estudio de la composición y evolución de las especies, así como el estudio cuantitativo y cualitativo del papel de las proteínas y enzimas bacterianas en el ambiente (Schneider & Riedel, 2010).

El estudio de la diversidad microbiana marina usando herramientas moleculares ha tenido grandes avances, como por ejemplo el descubrimiento de grupos bacterianos heterótrofos, como SAR11, y picoautótrofos, como *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, así como grupos desconocidos denominados SAR116 y SAR202 (Das et al., 2006)

El descubrimiento de estos grupos desconocidos a través de su DNA enfatiza la necesidad de mejorar las estrategias y de incrementar los esfuerzos en el cultivo de

microorganismos para el mejor conocimiento de su diversidad y metabolismo, pues no basta tener el genoma de un organismo para estudiarlo en su totalidad. Asimismo, para el estudio biotecnológico y fisiológico de estos microorganismos el cultivo es indispensable, ya que es necesario contar con la cepa bacteriana para su manipulación.

Para lograr el aislamiento exitoso de bacterias se deben conocer los requerimientos nutricionales y energéticos bacterianos, así como las condiciones abióticas que necesiten para crecer (Overmann, 2010). Cada bacteria necesita además de algún compuesto específico para su crecimiento, conocidos como factores de crecimiento, tales como: aminoácidos, purinas/pirimidinas, vitaminas y ácidos grasos, como porfirinas y colesterol (Overmann, 2010). Así mismo se sabe que las interacciones entre microorganismo-microorganismo y microorganismo-hospedero son determinantes para el crecimiento de ciertos grupos bacterianos, es decir, el establecimiento bacteriano depende de aspectos ecológicos que puedan generar cambios fisicoquímicos, intercambio y conversión de metabolitos, señalización y quimiotaxis, ocasionando la adaptación, especialización y la ocupación de diferentes nichos por las bacterias (Braga, et al., 2016).

En caso de ser posible el cultivo, se pueden realizar pruebas bioquímicas para conocer aspectos específicos de las bacterias aisladas. Estas pruebas forman parte de la caracterización fenotípica de los microorganismos y además de indicar aspectos funcionales importantes, también han sido usadas para establecer las relaciones filogenéticas y la taxonomía de las mismas (MacFaddin, 2003).

Por otra parte, la caracterización de cultivos bacterianos no queda extenta de la utilización de técnicas moleculares, como lo son las tres que se enlistan a continuación:

- 1) La PCR, técnica inventada por Kary Mullis a mediados de los ochentas, permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de DNA en un periodo corto de tiempo. En una PCR el DNA a ser amplificado se mezcla con desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), solución buffer, DNA polimerasa y un par de *primers* (iniciadores o cebadores). Los primers son oligonucleótidos (20 a 30 nucleótidos) de cadena sencilla de DNA complementarios a los nucleótidos localizados en los extremos del fragmento a amplificar. La reacción se lleva a cabo a lo largo de tres pasos, en los cuales la temperatura juega un papel muy importante: la desnaturalización (1) es la etapa donde se rompen los enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, ocasionando que el DNA se abra formando

cadenas simples, esto ocurre entre los 94°C y los 96°C. La hibridación o alineamiento (2) es la etapa donde la temperatura baja a un rango de 55°C a 65°C para que los primers se puedan unir al sitio complementario del fragmento de DNA a amplificar. Y la elongación o extensión (3) es la etapa donde la temperatura se incrementa hasta los 72°C para que la DNA polimerasa pueda agregar nucleótidos en el extremo 3' de cada primer, para sintetizar la hebra complementaria del DNA. Al final de estos pasos la cantidad de fragmentos de DNA se habrá aumentado exponencialmente. En la PCR se realizan entre 20 y 40 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, donde finalmente se obtienen millones de copias de un fragmento específico de DNA (Thieman & Palladino, 2012).

2) La electroforesis en gel de agarosa es otra técnica muy común en el estudio de la diversidad bacteriana y, en general, cuando se trabaja con DNA. Se basa en la separación del DNA de acuerdo con su carga y tamaño en pares de bases. El DNA, debido a los grupos fosfato en su estructura, tiene carga negativa, por lo tanto, cuando es sometido a un campo eléctrico la molécula migra hacia el polo positivo. La distancia que el DNA recorre es inversamente proporcional al tamaño del fragmento de DNA. No es posible visualizar al DNA por sí mismo, por lo cual se agregan colorantes a la electroforesis, como el bromuro de etidio, el cual se intercala entre las pares de bases del DNA y fluoresce cuando se le expone a luz UV (Thieman & Palladino, 2012). Esta técnica se realiza en un gel de agarosa, un polímero aislado de algas que al solidificar forma un gel semisólido poroso, por el cual los fragmentos de DNA viajan. La concentración de agarosa en el gel varía de 0.5% al 2% y depende de los propósitos de la electroforesis.

3) La secuenciación se usa para determinar el orden de nucleótidos en un fragmento de DNA o de todo el genoma. Una de las técnicas de secuenciación más usadas es la desarrollada por Frederick Sanger en 1977. En esta técnica, el DNA se replica junto con desoxirribonucleótidos, DNA polimerasa, primers y didesoxirribonucleotidos (ddNTP). Los ddNTP tienen un hidrógeno unido al C3' de la desoxirribosa en lugar de un grupo hidroxilo (OH). Cuando un ddNTP se incorpora a la cadena de DNA, ésta deja de polimerizarse porque la ausencia de un OH evita la formación del enlace fosfodiéster con un nuevo nucleótido. Los fragmentos amplificados se separan por medio de un gel capilar donde un láser y un detector son usados para observar la fluorescencia de cada ddNTP, generándose un cromatograma



con la secuencia de ddNTP incorporados al final de cada fragmento (Thieman & Palladino, 2012).

Actualmente, se han desarrollado nuevas técnicas que han permitido la secuenciación masiva de DNA, las más usadas son conocidas como NGS. Estas técnicas han permitido investigar a más detalle la composición filogenética y la diversidad funcional de las comunidades microbianas de una manera global. Sus principales usos son la secuenciación de todo el genoma, metagenómica, metatranscriptómica y proteómica. Algunas de las plataformas más usadas son Roche/454, Illumina/Solexa, Life/APG y HeliScope/Helicos BioSciences, las cuales son más rápidas y menos costosas que la secuenciación de Sanger anteriormente descrita (Rastogi y Sani, 2011).

### **Filogenia molecular bacteriana con el gen que codifica el 16S rRNA**

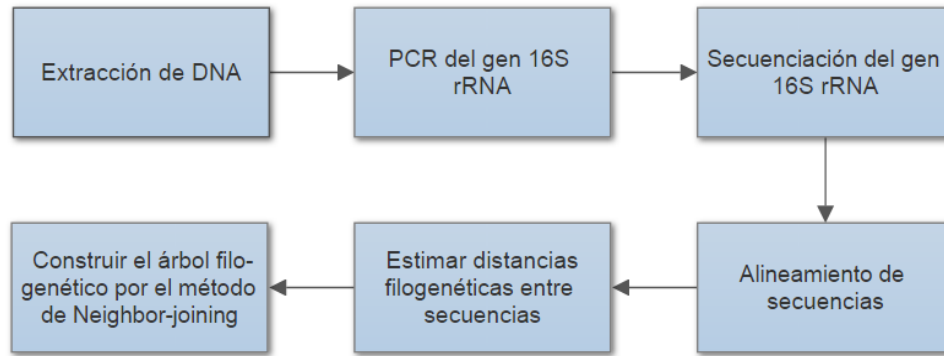
Con el desarrollo de la PCR y la secuenciación, el gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano, el 16S rRNA (o SSU rRNA), se ha usado ampliamente como marcador molecular para establecer relaciones taxonómicas entre bacterias (Woese et al., 1990; Harayama & Kasai, 2006). El 16S rRNA ha mantenido constante su forma y función dada su importancia biológica (modificaciones mayores en la secuencia del gen formarían ribosomas disfuncionales ocasionando la muerte de los microorganismos) y, en los casos donde ha habido cambios, estos suceden de manera tal que pueden aportar información de su historia evolutiva. Además, hay poca evidencia de transferencia horizontal de genes en esa región del genoma (Harayama & Kasai, 2006; Rodicio & Mendoza, 2004), lo cual lo ha convertido en un marcador filogenético ampliamente usado para la identificación y caracterización de la diversidad bacteriana, incluso ocasionando el descubrimiento de grupos nuevos de microorganismos (Das et al., 2006).

La especie es la unidad fundamental en la clasificación biológica, sin embargo, cuando hablamos de bacterias, que son organismos asexuales y que con frecuencia presentan eventos de transferencia genética horizontal, hacer esta distinción no resulta tan fácil. Se han propuesto varias definiciones para describir a la especie bacteriana, siendo la más aceptada la propuesta por Wayne y colaboradores, donde se establece que una cepa bacteriana pertenece a una especie dada o forma parte de un mismo grupo filogenético si se tiene un 70% de similitud al hibridar su DNA (Wayne et al., 1987). Ese porcentaje de similitud se

relaciona con la secuencia del ribosoma, es decir, si dos cepas bacterianas tienen el 70% de similitud al hibridar su DNA, sus secuencias que codifican para el ribosoma se parecen en al menos un 97% (Rodicio & Mendoza, 2004).

Actualmente, las comparaciones entre secuencias se pueden hacer mediante varios programas informáticos y bases de datos de libre acceso como GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information), RDP (Cole et al., 2014), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), entre otros (Rodicio & Mendoza, 2004).

Para realizar un análisis filogenético basado en la secuencia del gen que codifica el 16S rRNA se deben seguir una serie de pasos (**Figura 2**): (1) Extracción de DNA, (2) amplificación mediante PCR de la secuencia del 16S rRNA, (3) secuenciación del 16S rRNA, (4) alineamiento de las secuencias obtenidas con otras disponibles, (5) estimación de las “distancias filogenéticas” entre cada par de secuencias, para después (6) construir un árbol filogenético a partir de las distancias obtenidas usando un algoritmo en particular. Uno de los métodos más conocidos es Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), sin embargo, hay otras aproximaciones. Este método es una aproximación filogenética basada en la similitud entre secuencias, sin embargo, no es el único método para determinar relaciones filogenéticas entre grupos microbianos (Harayama & Kasai, 2006). Actualmente tres métodos son los más usados en filogenética: máxima parsimonia (todos los caracteres tienen el “mismo peso” y se prefiere el árbol filogenético con la mínima cantidad de cambios evolutivos), *maximum likelihood* (estima la probabilidad de que tan bien la matriz de caracteres es explicada por los árboles filogenéticos) e inferencia bayesiana (estima la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos) (Peña, 2011). Finalmente (7) la estimación de si nuestra reconstrucción filogenética es robusta mediante el método de bootstrap (Harayama & Kasai, 2006).



**Figura 2.** Diagrama de flujo para la construcción de un árbol filogenético con base en las secuencias del gen que codifica el 16S rRNA bacteriano.

### **Estimadores de diversidad microbiana**

El grupo de organismos más grande sobre la Tierra son los procariontes (Whitman et al, 1998), sin embargo, aún se desconoce gran parte de su diversidad y, con ello, el papel funcional que estos organismos tienen en la biosfera (Overmann, 2010). El conjunto de organismos y su actividad biológica determinan el estado y la dinámica de los procesos ambientales en los ecosistemas (Schneider & Riedel, 2010). De esta manera, la ecología microbiana describe la presencia y los efectos de los microorganismos en el lugar donde habitan; también describe los patrones de las comunidades y los explica en términos de sus interacciones con el ambiente en sus componentes bióticos y abióticos (Heip et al., 1998)

En general, la diversidad de los organismos se puede categorizar en tres grupos, en relación con su escala geográfica o espacial. La diversidad  $\alpha$  se refiere a la riqueza de especies en una localidad, es decir, a una escala local. La diversidad  $\beta$  mide la diferencia entre localidades en términos de su composición de especies, es decir, describe la diferencia en composición entre sitios. Y la diversidad  $\gamma$  mide el número de especies en una región y es el resultado de la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ . Las escalas geográficas referidas varían dependiendo del organismo de estudio, en particular de su tamaño y de la distribución del mismo (Calderón-Patrón et al., 2012; Rodríguez & Vázquez-Domínguez, 2003). Existen diferentes medidas de diversidad que dan información cuantitativa de la variación biológica que caracteriza a las poblaciones (espacial y temporalmente) (Heip, Herman, & Soetaert, 1998). La diversidad de una localidad puede expresarse en términos del número total de especies presentes en un área. Esta medida se conoce como riqueza de especies y hay varios métodos para estimarla

(Madigan et al., 2015). Un método sencillo para estimar el número de especies a partir de muestreos de individuos es el índice de Chao (Gotelli & Ellison, 2013). Este índice es un estimador no paramétrico que ha sido ampliamente usado dado que no asume ningún tipo de distribución para la abundancia de especies. Colwell y Coddington (1994) desglosaron este índice en dos:

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{f_1^2}{2f_2} \text{ si } f_2 > 0 \quad (1)$$

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{f_1(f_1 - 1)}{2(f_2 + 1)} \text{ si } f_2 = 0 \quad (2)$$

En ambas ecuaciones  $S_{obs}$  es el número de especies observadas en la muestra de referencia,  $f_1$  es el número de singletons (especies en la muestra de referencia representadas por un individuo) y  $f_2$  es el número de dobletones (especies en la muestra de referencia representada por dos individuos). La ecuación 1 es la forma estándar, mientras que la ecuación 2 es una forma corregida que puede ser usada cuando no hay dobletones ( $f_2 = 0$ ). Este índice es un estimador asintótico mínimo, lo cual significa que la riqueza de especies verdadera probablemente será por lo menos tan grande como la calculada por la ecuación 1 (Gotelli & Ellison, 2013). En general, mientras más grande sea la diferencia entre la riqueza de especies observada  $S_{obs}$  y el estimador (Chao1), más grande será la incertidumbre (Gotelli & Ellison, 2013).

El índice de diversidad de Shannon incorpora la riqueza de especies y la uniformidad:

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \log (p_i)$$

En esta ecuación  $p_i$  es la proporción del ensamblaje total representado por especies  $i$  ( $p_i = \frac{n_i}{N}$ ),  $n_i$  es el número de individuos en la muestra que pertenece a la especie “i”. Mientras más especies en el ensamblaje y más uniforme sus abundancias relativas, más grande será  $H'$  (Gotelli & Ellison, 2013).

El índice de Shannon es una aplicación de la teoría de la información, basado en la idea de que la mayor diversidad corresponde a la mayor incertidumbre en escoger aleatoriamente un individuo de una especie en particular (Gliessman, 2002). Este índice no

tiene unidades y eso lo hace difícil de interpretar. Asimismo, este índice es sensible al número de individuos y de muestras colectadas.

Por otro lado, el índice de Simpson mide la probabilidad de que dos organismos tomados al azar pertenezcan a la misma especie. Mientras más pequeño sea el valor calculado para este índice, mayor será la diversidad presente.

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

El índice de Simpson es el inverso de un índice de dominancia de la comunidad con el mismo nombre. Este índice está basado en el principio de que un sistema es más diverso cuando ninguna de las especies componentes puede ser considerada como más dominante que cualquiera de las otras especies (Gliessman, 2002).

### **Ordenamiento de datos biológicos y ambientales**

Para el estudio de las comunidades bacterianas en su ambiente es necesario considerar la influencia de las variables ambientales a las cuales están sometidas, ya que influyen en el crecimiento bacteriano, su distribución, abundancia y finalmente en su diversidad y, con ello, el papel que tienen en el ecosistema.

Las ordenaciones son un conjunto de métodos estadísticos multivariados usados para ilustrar los patrones importantes de un conjunto de datos, así como discriminar o separar muestras de acuerdo con las variables. De esta manera, las ordenaciones son técnicas de reducción y visualización de los datos (Gotelli & Ellison, 2013). Entre las más usadas destacan el análisis de componentes principales (PCA) y el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).

Un PCA reduce la dimensionalidad de los datos, es decir, crea nuevas y pocas variables clave (cada una hecha a partir de las variables originales) que expliquen la variación total presente en los datos. Un PCA será exitoso conforme exista una inter-correlación fuerte entre variables y debe realizarse a partir de datos normalizados a la misma escala relativa (Gotelli & Ellison, 2013). Las variables nuevas creadas, llamadas componentes principales, pueden ser ordenadas con base al porcentaje de variación que compone el conjunto de datos.

Generalmente, el mayor porcentaje de variación explicado en un PCA se encuentra en el primer par de componentes principales (Gotelli & Ellison, 2013).

Un ordenamiento NMDS, en contraste con un PCA, no reduce la cantidad de variables a graficar, sino que posiciona lejos a los objetos diferentes y cerca a los objetos más parecidos entre sí en el espacio del ordenamiento. Para llevar a cabo un NMDS se debe generar una matriz de distancia o disimilitud. Después, se ordena cada una de las observaciones en el espacio dimensional y se computan las distancias entre cada una de las observaciones (Euclidianas, Bayes, etc.). Se realiza una regresión entre las distancias de la matriz original y las distancias calculadas en el paso anterior para, posteriormente, calcular el estrés (que tanto se adecuan entre sí las observaciones observadas y calculas). Enseguida, se cambia de posición las observaciones en el espacio dimensional y se repiten los pasos, con la idea de encontrar el valor más pequeño para el estrés. Una vez encontrado ese valor mínimo, se grafican las posiciones de las diferentes observaciones (Gotelli & Ellison, 2013). Este tipo de análisis suele usarse para el ordenamiento de datos biológicos. Adicionalmente, en un NMDS se puede correlacionar las variables ambientales con los datos biológicos mediante regresiones de Pearson para poder visualizar la relación entre ellos.

### **Composición bacteriana heterótrofa marina cultivable**

La estructura de la comunidad bacteriana puede ser definida por los grupos funcionales y por las características taxonómicas o filogenéticas de las bacterias que constituyen la comunidad. En general, la diversidad bacteriana marina actual reconoce 20 linajes cultivables (Fuhrman, 2008; Giovannoni & Stingl, 2005), siendo los más representativos los que se mencionan a continuación.

**Clase Alphaproteobacteria.** Compuesta por 10 órdenes, 26 familias y aproximadamente 300 géneros. En esta clase destacan principalmente dos órdenes: Rhizobiales y Rhodobacterales, donde este último tiene representantes marinos destacados (*Roseobacter*, *Roseovivax*, *Sulfitobacter*, etc.) (Giovannoni & Stingl, 2005). Estos microorganismos crecen en medios ricos en nutrientes y tienen una abundancia aproximada del 20% en comunidades costeras, la cual disminuye rápidamente conforme aumenta la profundidad oceánica. Esta clase es importante funcionalmente porque participa en las transformaciones del azufre, tal como la producción del gas dimetilsulfuro, compuesto

implicado en la regulación de clima (ej.: *Roseobacter*, *Sulfitobacter*), y en la desnitrificación (ej.: *Rhodobacter* y *Paracoccus*) (Fuhrman, 2008; Lucena, 2012).

*Roseobacter* merece una mención especial, ya que se trata de un género fotoheterótrofo aerobio, es decir tienen bacterioclorofila *a* (Buchan et al., 2005). *Roseobacter* representa una gran fracción del bacterioplancton y se encuentra formando parte del plancton, sedimentos, hielos marinos, superficies animales, etc. (Fuhrman, 2008). Este género no realiza la fotosíntesis, pero puede generar ATP a partir de energía lumínica, lo cual representa un nuevo e importante suministro de energía en la cadena trófica, específicamente en el bucle microbiano y en los procesos de mineralización (Buchan et al., 2005).

**Clase Gammaproteobacteria.** Es la clase con más órdenes dentro de las proteobacterias, y sus integrantes tienen una alta diversidad morfológica y funcional. Los órdenes Vibrionales, Oceanospirillales y Alteromonadales tienen representantes marinos que se distinguen por tener tasas altas de crecimiento, por crecer en rangos amplios de concentraciones de O<sub>2</sub> y temperatura, además pueden ser quimioautótrofos o fotoautótrofos (Fuhrman, 2008; Williams et al., 2010).

Vibrionales: Está compuesto por bacterias quimioorganótrofas de crecimiento rápido en medios nutritivos (Bertrand et al., 2015). El género *Vibrio* es el grupo más conocido de este orden y sus integrantes tienen importancia en el ciclo de nutrientes, además degradan hidrocarburos (Guerinot et al., 1982; Hada et al., 1984). Algunas especies de este grupo son patógenas de humanos, mamíferos, moluscos y crustáceos, como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus* (Pacha & Kiehn, 1969; Izumiya et al., 2011), mientras que otros miembros como *AliVibrio fischeri*, tienen bioluminiscencia y son simbioses de peces (Wei & Young, 1989). *Photobacterium* es otro género perteneciente a este orden que puede crecer en un amplio rango de presiones y temperaturas en el medio marino (El-Hajj et al., 2010).

Oceanospirillales: Son bacterias marinas quimioorganótrofas, aerobias y anaerobias facultativas, halófilas y halotolerantes y capaces de respirar nitrato (Lucena, 2012). Dentro de este orden destaca el género *Halomonas*, que son bacterias capaces de degradar hidrocarburos (Bertrand et al., 2015).

Pseudomonadales: Es el orden donde pertenece la especie tipo de la clase Gammaproteobacteria y es uno de los más diversos, ya que agrupa aproximadamente a 130

especies (Lucena, 2012). *Psychrobacter* es un género marino de especial interés dentro de este orden porque puede crecer a bajas temperaturas, lo cual tiene gran potencial en biotecnología (Bozal, 2003).

**Alteromonadales:** Son quimioorganótrofas marinas halófilas que contiene géneros representativos como *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* y *Marinobacterium* (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007). Estas bacterias son Gram-negativas y tienen formas bacilares rectas y curvas. También poseen una alta diversidad ecológica funcional y pueden ser tanto anaerobios estrictos como facultativos (Lucena, 2012). Algunas especies de *Pseudoalteromonas* secretan muchos compuestos extracelulares que pueden tener efectos en la fauna marina (Costa-Ramos & Rowley, 2004).

**Phylum Bacteroidetes.** Son heterótrofas Gram-negativas con representantes aerobios y anaerobios (Bertrand et al., 2015). Está constituido por bacterias muy diversas metabólicamente, que han colonizado gran variedad de hábitats marinos y continentales (Fuhrman, 2008; Lucena, 2012). Destacan las siguientes clases:

**Bacteroidia:** Está formada por cocobacilos y bacilos rectos, principalmente son aerobios, pero también pueden ser anaerobios facultativos. Bacteroidales es el orden tipo (Lucena, 2012). Estos microorganismos crecen en ambientes marinos ricos en MO (Bertrand et al., 2015) y se han aislado en aguas residuales, sedimentos marinos y lagos salinos alcalinos (Lucena, 2012).

**Flavobacteriia:** Son quimioorganótrofas aerobias, bacilos o filamentosas, Gram-negativas, no esporuladas, algunas desnitrificantes con importancia en la degradación de la MO (Bertrand et al., 2015). Está compuesta por tres familias Blattabacteriaceae, Cryomorphaceae y Flavobacteriaceae (Lucena, 2012), donde las últimas dos tienen representantes marinos.

**Phylum Actinobacteria.** Son bacterias Gram-positivas con una gran diversidad de morfologías. Este grupo tiene la capacidad de sintetizar antibióticos (Manivasagan et al., 2014) y puede degradar moléculas grandes, tales como agar, alginatos, celulosa, quitina y varios tipos de lípidos (Goodfellow & Haynes, 1984). Consta de cinco subclases, todas con representantes marinos: Acidimicrobidae, Rubrobacteridae, Coriobacteridae, Sphaerobacteridae y Actinobacteridae. Esta última subclase es la más grande, ya que contiene más de 10 órdenes. El orden Actinomycetales está compuesto por bacterias de filamentos



ramificados, son quimioorganótrofas aerobias. La familia Nocardiaceae con los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* son típicas de sedimentos acuáticos, activos en la degradación de contaminantes (Bertrand et al., 2015).

### **Potencial biotecnológico de bacterias heterótrofas marinas**

Las bacterias marinas durante el crecimiento celular producen metabolitos secundarios que pueden tener aplicaciones biotecnológicas importantes. Un ejemplo son los Actinomicetos, que tienen gran importancia biotecnológica e industrial, debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad biológica (como son compuestos con actividad antitumoral, antifúngica (Asolkar et al., 2006), anticancerígenos (Williams et al., 2007; Wu et al., 2006), antibacterianos (Riedlinger et al., 2004; Romero et al., 1997) y antiinflamatorios (Renner et al., 1999) así como enzimas con importancia funcional (Manivasagan et al., 2014). De esta manera, la actividad metabólica y enzimática que tienen las bacterias heterótrofas, en particular las marinas, les permite degradar muchos tipos de compuestos biológicos, tales como la celulosa, quitina y diferentes tipos de lípidos, lo cual resulta interesante por las aplicaciones biotecnológicas e industriales que presentan. A continuación, se enlistan algunos de los ejemplos más importantes:

La celulosa es la biomolécula más abundante en el planeta, ya que representa cerca de la mitad de todo el material orgánico de la biosfera (Decker, 2003). La importancia de los microorganismos capaces de catabolizar la celulosa radica en su capacidad de modificar la dinámica trófica de la MOD (Hendricks et al., 1995), así como industrialmente en procesos fermentativos, en la producción de glucosa para consumo humano (Decker, 2003; Mandels & Weber, 1969). Las celulasas de bacterias marinas han recibido especial atención en el tratamiento de biomasa de microalgas para la producción de gas y otros combustibles (Muñoz, et al, 2014).

La quitina es el componente principal de tegumentos de insectos, crustáceos y hongos (Sakai et al., 1998). Este polisacárido es abundante en el medio marino y ha recibido especial atención como recurso para la utilización de biomasa (Tsujibo et al., 1992). Una de las principales características del medio marino es la falta de nutrientes en el ambiente, por lo cual los microorganismos capaces de usar la quitina como fuente de C representan una fuente importante de suministro de materia orgánica biodisponible para la biota marina (Tsujibo et

al., 1992). Tanta es la eficacia de los sistemas degradadores de quitina en el medio marino que, a pesar de ser una molécula muy abundante en la columna de agua, escasamente se ha encontrado en el lecho marino (Howard et al., 2003).

Los lípidos son degradados por lipasas o esterases. Las lipasas son carboxilesterasas que degradan cadenas largas de acilgliceroles, mediante la hidrólisis del enlace éster de triacilgliceroles, liberando glicerol y ácidos grasos (Pandey et al., 1999). Las esterases son también carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis del enlace éster de sustratos con cadenas cortas de ácidos grasos solubles en agua (Lo Giudice et al., 2006). En particular, las lipasas y esterases de bacterias marinas adaptadas a ambientes fríos son de interés por su eficiente actividad catalítica. Las lipasas y esterases pueden ser usadas en detergentes y en la industria cosmética y alimentaria como biocatalíticos o en procesos de biorremediación para la eliminación de grasas en ambientes acuáticos (Lo Giudice et al., 2006; Margesin & Schinner, 1994; Pandey et al., 1999; Suzuki et al., 2001).

Por otro lado, el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), son productos oxidativos de la degradación aerobia de los azúcares (Gregory et al., 1977). Las catalasas se encuentran en bacterias aerobias y anaerobias facultativas (Gregory et al., 1977) y se encargan de la defensa biológica contra la toxicidad del  $O_2$  (MacFaddin, 2003). Las catalasas se usan para degradar el  $H_2O_2$  residual en varios procesos industriales para la producción de textiles, papel, semiconductores y alimentos (Vijayakumar et al., 2014). Las oxidasas, enzimas membranales presentes en los organismos aeróbicos, también catalizan la reducción de  $O_2$  a  $H_2O_2$  y utilizan la energía libre obtenida de esta reacción para bombear protones a través de la membrana (Contreras, 1999). Sin embargo, el metabolismo de los productos oxidativos de la degradación de azúcares y las oxidasas de bacterias marinas es muy diverso y varía en función del grupo bacteriano en estudio (González-Lama y Diez del Pino, 1996).

## V. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias heterótrofas son los principales microorganismos en el medio marino que mineralizan la MO; por lo tanto, estos microorganismos regulan la dinámica de la MO, así como otros procesos involucrados directamente en los diferentes ciclos biogeoquímicos marinos (Arrigo et al., 2005; Falkowski et al., 2008). Estas bacterias producen enzimas y compuestos bioactivos con importancia ecológica y aplicaciones (biotecnológicas) potenciales en industrias con importancia económica (farmacéutica, cosmética y alimentaria) (Bolhuis & Cretoiu, 2016). Por lo tanto, este trabajo contribuye a la exploración microbiológica del medio marino, aumentando el conocimiento de la diversidad bacteriana heterótrofa cultivable en aguas oceánicas del Pacífico tropical mexicano, así como los efectos potenciales que sus enzimas tienen en el ecosistema y las posibles aplicaciones biotecnológicas e industriales que pueden llegar a tener.

## VI. OBJETIVOS

### **Objetivo principal**

Conocer la diversidad y actividad enzimática potencial de importancia ecológica y biotecnológica de bacterias heterótrofas cultivables del Pacífico tropical mexicano.

### **Objetivos particulares**

- a. Analizar las variables hidrológicas obtenidas de las estaciones de muestreo localizadas en tres transectos del Pacífico tropical mexicano.
- b. Cultivar y aislar bacterias heterótrofas de las estaciones de muestreo.
- c. Identificar morfológica y molecularmente (marcador 16S rRNA) a las bacterias aisladas.
- d. Analizar filogenéticamente las bacterias aisladas y determinar sus índices de diversidad.
- e. Relacionar la diversidad bacteriana con las características hidrológicas de los sitios de muestreo.
- f. Identificar cepas con actividad enzimática de importancia ecológica y biotecnológica.

## VII. HIPÓTESIS

- Dado el O<sub>2</sub> disuelto, la fluorescencia y la temperatura presentes en las estaciones de muestreo, se espera observar diferencias en la diversidad bacteriana heterótrofa cultivada entre las estaciones y las profundidades muestreadas.
- Dada la diversidad bacteriana aislada del Pacífico tropical mexicano y las características hidrológicas de cada sitio de muestreo, se espera observar una relación entre los grupos bacterianos obtenidos y las características hidrológicas de los sitios de muestreo.
- Se espera encontrar actividad enzimática de los aislados bacterianos obtenidos en el Pacífico tropical mexicano con importancia ecológica potencial en procesos de mineralización e importancia biotecnológica potencial en procesos industriales.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

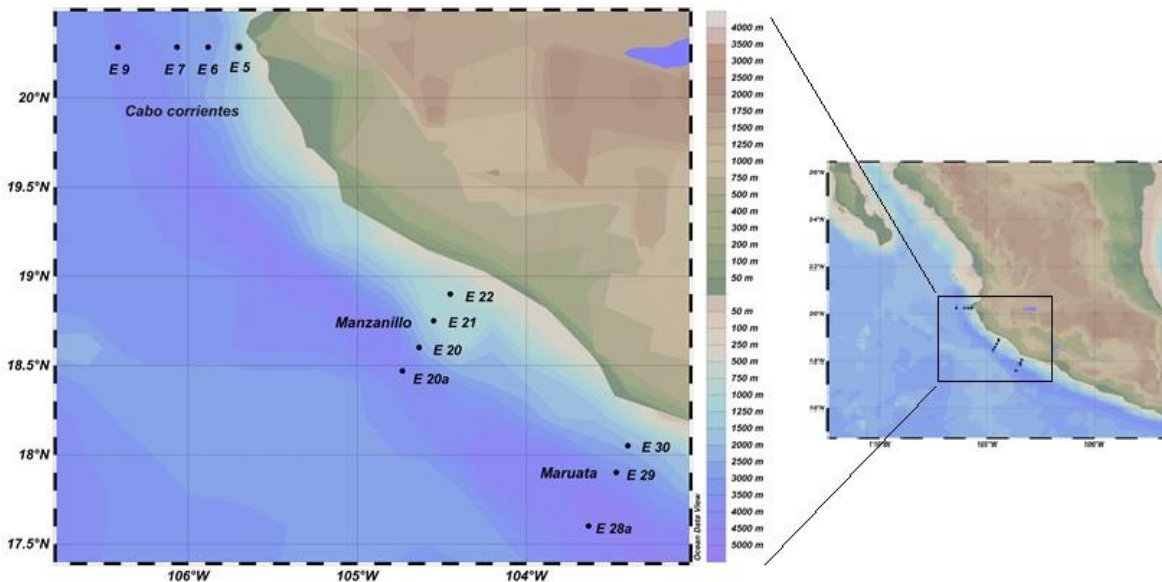
### Área de estudio y muestreo

La colecta de agua para el aislamiento de bacterias heterótrofas se realizó en el Pacífico tropical mexicano, en costas de Cabo Corrientes en Jalisco, Manzanillo en Colima y Maruata en Michoacán. La colecta se efectuó durante la campaña oceanográfica *MareaR VIII* a bordo del buque oceanográfico (B/O) *El Puma* de la Universidad Nacional Autónoma de México, del 31 de marzo al 11 de abril de 2016.

El agua se colectó en once estaciones, a lo largo de tres transectos oceánicos con una longitud aproximada de 50 a 80 km cada uno (**Figura 3; Tabla 1**). En cada estación se realizaron mediciones en tiempo real a cada metro de profundidad de los siguientes datos ambientales: O<sub>2</sub> disuelto, temperatura, fluorescencia, salinidad, presión y densidad, utilizando un *CTD* (conductividad-temperatura-profundidad) y un sensor de O<sub>2</sub> *Seabird*, que se calibró mediante el método Winkler (Williams & Jenkinson, 1982).

**Tabla 1.** Información de las estaciones de muestreo.

Transecto	Estación	Coordenadas		Profundidades de muestreo (m)			Profundidad máxima estación (m)
		Latitud	Longitud	Superficial	Máximo de clorofila	Fin de la oxiclina	
Cabo Corrientes	E5	20°17'6.36"N	105°42'7.272"O	5	10	30	135
Cabo Corrientes	E6	20°17'5.028"N	105°53'4.091"O	5	40	60	2260
Cabo Corrientes	E7	20°17'4.344"N	106°4'3.035"O	5	35	60	2300
Cabo Corrientes	E9	20°17'4.308"N	106°25'4.979"O	5	50	80	3777
Manzanillo	E20a	18°45'6.3"N	104°33'0.287"O	5	17	43	840
Manzanillo	E20	18°28'15.6"N	104°44'4.272"O	5	25	50	1080
Manzanillo	E21	18°45'6.3"N	104°33'0.287"O	5	28	50	2220
Manzanillo	E22	18°54'4.5"N	104°27'4.86"O	5	26	40	4560
Maruata	E28a	17°36'4.788"N	103°38'0.348"O	5	49	75	4515
Maruata	E29	17°54'6.948"N	103°2'8.808"O	5	40	75	2985
Maruata	E30	18°3'6.768"N	103°24'2.88"O	5	26	40	1687



**Figura 3.** Mapa del área de muestreo con los tres transectos: Cabo corrientes (E9, E7, E6, E5), Manzanillo (E20a, E20, E21, E22) y Maruata (E28a, E29, E30).

En cada estación se colectaron muestras de agua a tres profundidades con botellas oceanográficas Niskin de 10 L acopladas a una roseta, con base en la información obtenida por medio de los perfiles del CTD: a cinco metros, en el primer pico de clorofila (entre 20 y 40 m) y en el final de la oxiclina (de 40 a 80 m).

## **Perfiles y mapas oceanográficos**

De acuerdo a los datos ambientales obtenidos, con el software *Ocean Data View* (Schlitzer, 2016) se realizaron los mapas del muestreo, los perfiles de O<sub>2</sub> disuelto, fluorescencia y temperatura en relación a la profundidad de cada una de las estaciones, así como perfiles transversales de O<sub>2</sub> disuelto por profundidad en cada transecto. Además, se hizo un mapa de superficie mostrando la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el área de muestreo a 40 m de profundidad.

## **Aislamiento y conservación de cepas**

Las 33 muestras de agua colectadas fueron sembradas en medio marino (mM), medio nutritivo (mN) y medio LB (mLB) en los laboratorios del B/O *El Puma* y en el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML-UNAM). Los medios se modificaron mediante la adición de sales para recrear las condiciones nutrimentales del ecosistema marino (**ANEXO I**). Las sales suplementadas fueron fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sulfato de hierro (II) heptahidratado [FeSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O)], cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio hexahidratado [MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O)], cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) y sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los cultivos se incubaron de 28 a 30 °C y de 1 a 7 días.

En placa, crecieron dos mil cepas las cuales fueron descritas morfológicamente con base a una clave morfológica de colonias bacterianas (**ANEXO II**). Posteriormente, a partir de estas cepas, se realizó el aislamiento por agotamiento de una selección de morfología representativa conformada por doscientas colonias, de las cuales se seleccionaron 80 representantes para identificarlas molecularmente.

Con los aislados bacterianos se elaboró un cepario para la conservación de las cepas en caldos nutritivo y LB suplementados con glicerol al 20%, y almacenadas a -80°C.

## **Identificación molecular bacteriana**

### **a) Extracción de DNA genómico**

Se extrajo el DNA genómico de 80 cepas bacterianas representativas de los morfotipos mediante paquetes comerciales de la marca Wizard (extracción por Salting out) y Qiagen

(extracción por membrana de sílice de alta afinidad). Se usó proteinasa K [10 mg/mL] y lisoenzima [10 mg/mL] para degradar completamente los componentes celulares, principalmente los presentes en la pared bacteriana. El DNA obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* para determinar la concentración y la pureza del DNA.

#### b) PCR y electroforesis

Se realizó la PCR del gen que codifica el 16S rRNA con los primers 27F y 1492R (Lane, 1991). Los reactivos y las concentraciones usadas en la PCR se enlistan en la **Tabla 2**. La reacción se realizó en un termociclador *Eppendorf AG 22331 Hamburg*, con las condiciones mostradas en la **Tabla 3**.

**Tabla 2.** Reactivos usados en la amplificación del gen que codifica el 16S rRNA bacteriano. Se muestran las concentraciones y el volumen de estos para una reacción de 25  $\mu$ L.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Buffer	[10 X]	[1x]	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	[25 mM]	[2 mM]	2 $\mu$ L
Primer 27F	[10 $\mu$ M]	[0.3 $\mu$ M]	0.75 $\mu$ L
Primer 1492R	[10 $\mu$ M]	[0.3 $\mu$ M]	0.75 $\mu$ L
dNTPs	[10 mM]	[0.2 mM]	0.5 $\mu$ L
Taq polimerasa (Axygen)	[5 u/ $\mu$ L]	[0.025 u/ $\mu$ L]	0.125 $\mu$ L
DNA	[20 ng / $\mu$ L]	[2 ng/ $\mu$ L]	1-2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	-	-	Completar a 25 $\mu$ L

**Tabla 3.** Condiciones de la PCR. La reacción se llevó a cabo durante 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	52	1
Extensión	72	1.2
Extensión final	72	10

Al finalizar la PCR se realizó la electroforesis de los productos de la reacción, para confirmar la amplificación específica del fragmento de DNA deseado. La electroforesis se

realizó en gel de agarosa al 1%, donde se agregó bromuro de etidio. Al DNA se agregó 2.5  $\mu$ L de loading buffer. El gel se corrió con 5  $\mu$ L de ladder (100-10,000 pb) a 75 V por 20 min. Al terminar la electroforesis se realizó la visualización del gel en equipo *Bio-Rad* con el software *ImageLab*.

### c) Secuenciación del gen que codifica el 16S rRNA y clasificación

Los productos de PCR que amplificaron correctamente para el gen que codifica el 16S rRNA y que además tenían una concentración igual o superior a 20 ng/ $\mu$ L se mandaron a secuenciar por el método de Sanger a los laboratorios MacroGen © en U.S.A. Las secuencias se clasificaron mediante la herramienta *Sequence match* del software en línea *Ribosomal Database Project* <https://rdp.cme.msu.edu> (Cole et al., 2014; Wang et al., 2007).

### **Análisis filogenéticos, estadísticos y de diversidad**

Para la reconstrucción filogenética, en el software *BioEdit* (Hall, 1999) se realizó la edición manual de secuencias y la alineación múltiple de las mismas por medio de Clustal W. El árbol filogenético se hizo en el software MEGA7 (Kumar et al., 2016) por el método de similitud Neighbor-Joining con un bootstrap de 10,000 repeticiones. El árbol se editó en el software en línea *Tree Of life (iTOL)* (Ciccarelli et al., 2006) y con el paquete interactivo *Tree Of Life (iTOL) v3* <http://itol.embl.de/>.

Con el software STATISTICA (StatSoft, 2012) se realizaron ANOVAS de una vía y un análisis de comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey a las variables ambientales (temperatura, O<sub>2</sub>, fluorescencia, etc.) y biológicas (índices de diversidad) por profundidad de muestreo para determinar si fueron significativamente diferentes entre sí.

En el software *PrimeR 7* (Clarke & Gorley, 2015) se realizó un PCA para los datos abióticos y un NMDS para los datos biológicos (abundancia de morfotipos), el cual se hizo transformando los datos por raíz cuadrada. La matriz se construyó por el método de similitud de Bray Curtis y el análisis se hizo con 50 reinicios. Para relacionar los parámetros hidrológicos y la abundancia bacteriana cultivada en las estaciones y profundidades muestreadas se realizó una regresión múltiple entre las dos primeras dimensiones del NMDS y las variables ambientales en *PrimeR 7* (Clarke & Gorley, 2015).



En *PrimeR 7* se obtuvieron los índices de diversidad de Shannon y Simpson para cada una de las tres profundidades de muestreo. El índice de Chao1 se realizó con el software R 3.0.2 (R Development Core Team, 2015).

### **Caracterización enzimática**

Para conocer la actividad enzimática con importancia ecológica en el medio marino y de interés biotecnológico (celulasas, catalasas, quitinasas, oxidasas, lipasas y esterases) de las bacterias aisladas, se realizó una serie de pruebas bioquímicas a cepas representativas de cada grupo bacteriano (**ANEXO III**).

El ensayo para celulasas se realizó por el método de Teather y Wood (Teather & Wood, 1982) con modificaciones en el medio para bacterias marinas (Tsuji et al., 1992; Tsuji et al., 1998). La detección de catalasas se llevó a cabo mediante el método de MacFaddin (MacFaddin, 2003). El ensayo de oxidasa se realizó por el método de Kovacs (Kovacs, 1956). La presencia de quitinasas se determinó mediante el método descrito por Howard y colaboradores (Howard et al., 2003). El ensayo de lipasas y esterases se efectuó por el método de Sierra con modificaciones (Bruni et al., 1982; Lo Giudice et al., 2006; Sierra, 1956). Este último ensayo se realizó a dos diferentes temperaturas de incubación (17°C y a 30°C) y con dos sustratos diferentes (Tween 20 y 80) con la finalidad de observar a qué temperatura y con qué sustrato hay mayor actividad lipolítica.

## **IX. RESULTADOS**

### **Características hidrológicas de los sitios de muestreo**

Se realizó el perfil hidrológico (O<sub>2</sub>, temperatura, fluorescencia, densidad, salinidad y presión) de las estaciones de muestreo en relación con la profundidad (**ANEXO IV: Tabla S1**), siendo el O<sub>2</sub> disuelto, la temperatura y la concentración de clorofila a (medida en fluorescencia) las variables principales de acuerdo con la hipótesis y, por tanto, se analizarán con más detalle.

En general, la temperatura y el O<sub>2</sub> fueron más altos a los 5 m de profundidad y disminuyeron significativamente conforme la profundidad aumentó (**Tabla 4**). La presión y la densidad aumentaron significativamente conforme aumentó la profundidad. La salinidad

fue significativamente menor a los 5 m de profundidad con respecto al final de la oxiclina. La fluorescencia no fue diferente entre las tres profundidades de muestreo debido a la alta variación que hubo a los 5 m y en el máximo de clorofila.

**Tabla 4.** Medias  $\pm$  DS de las variables hidrológicas en las tres profundidades de estudio. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre profundidades ( $p < 0.05$ ). La salinidad no fue significativamente diferente entre 5 m (*a*) y máximo de clorofila (*a*), ni entre máximo de clorofila (*b*) y final de oxiclina (*b*).

Parámetros	5 m	Máximo de clorofila	Final de la oxiclina
Temperatura (°C)	25.14 $\pm$ 1.85 <i>a</i>	22.13 $\pm$ 1.76 <i>b</i>	18.06 $\pm$ 1.30 <i>c</i>
Oxígeno ( $\mu\text{mol/kg}$ )	192.44 $\pm$ 30.65 <i>a</i>	147.49 $\pm$ 48.45 <i>b</i>	28.55 $\pm$ 22.24 <i>c</i>
Fluorescencia ( $\text{mg/m}^3$ )	0.16 $\pm$ 0.49 <i>a</i>	0.44 $\pm$ 0.52 <i>a</i>	0.02 $\pm$ 0.05 <i>a</i>
Presión (psi)	5.62 $\pm$ 0.57 <i>a</i>	32.47 $\pm$ 12.09 <i>b</i>	56.79 $\pm$ 15.12 <i>c</i>
Salinidad (psu)	34.47 $\pm$ 0.10 <i>a</i>	34.54 $\pm$ 0.09 <i>ab</i>	34.63 $\pm$ 0.09 <i>b</i>
Densidad ( $\text{kg/m}^3$ )	22.89 $\pm$ 0.59 <i>a</i>	23.82 $\pm$ 0.54 <i>b</i>	24.97 $\pm$ 0.38 <i>c</i>

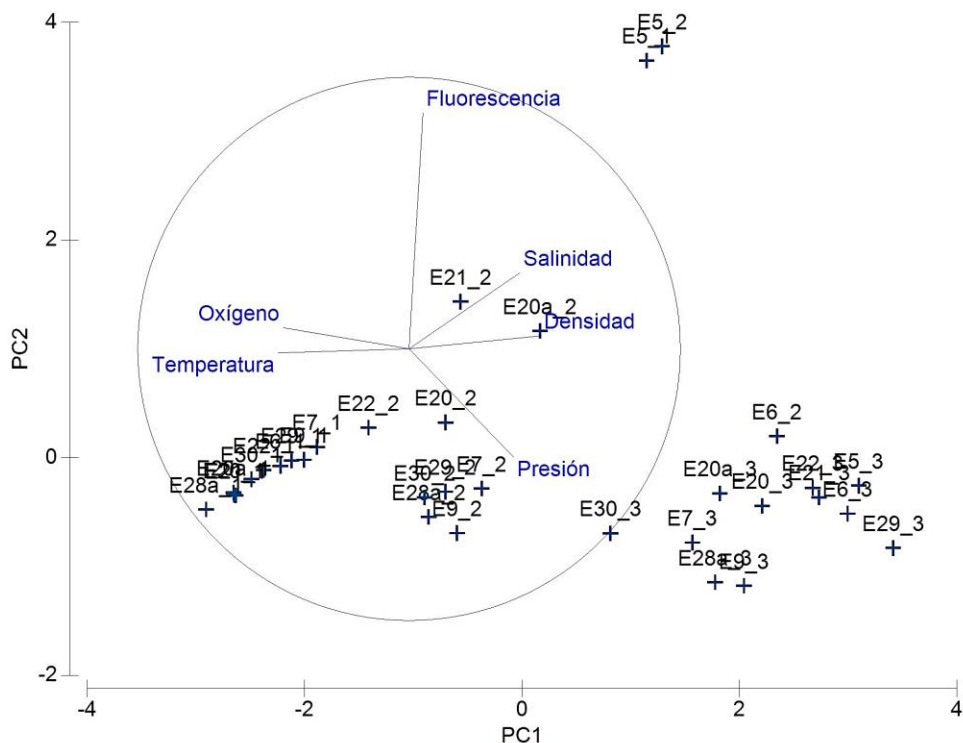
El PCA resultante de los datos ambientales de las estaciones de muestreo formó cinco componentes, de los cuales los dos primeros explican el 88.5 % de la variación total de los datos. El componente principal 1 (PC1) explicó el 64.9 % y el componente principal 2 (PC2) explicó el 23.6% de la variación total (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Variación explicada por cada componente en el PCA.

Componente	Variación (%)	Variación acumulada (%)
1	64.9	64.9
2	23.6	88.5
3	5.8	94.2
4	3.3	97.5
5	2.2	99.7

En el PCA se observa que el PC1 agrupó las estaciones por profundidad de muestreo (**Figura 4**): la primera profundidad (5 m), la segunda profundidad (máximo de clorofila) y la tercera profundidad (final de oxiclina). El hecho que se agrupen las profundidades sugiere que las características ambientales en cada una de ellas son parecidas entre sí. El PC2 separó

las estaciones E5\_1 y E5\_2 de las demás estaciones, debido a que fueron las más diferentes en términos de la clorofila *a*.

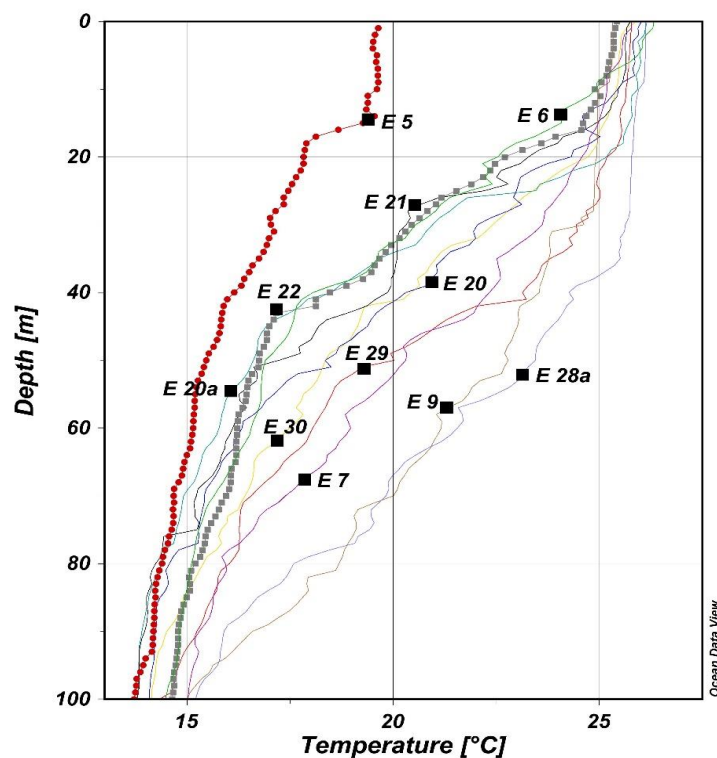


**Figura 4.** PCA de los datos ambientales de las estaciones de muestreo. Cada vector apunta a la dirección de aumento de cada variable hidrológica y su longitud indica la fuerza de la correlación entre la variable y los valores de la ordenación. La etiqueta de las muestras se compone del número de estación, seguido de la profundidad (1= 5 m, 2= máximo de clorofila y 3= final de la oxiclina).

Los vectores representando las variables hidrográficas explican la contribución de cada una de ellas en las estaciones. Las tres profundidades se diferenciaron entre sí principalmente por la concentración de O<sub>2</sub>, temperatura, presión, salinidad y densidad. Por ejemplo, la profundidad de 5 m está influenciada positivamente por el O<sub>2</sub> y la temperatura, y negativamente por la presión, lo cual tiene sentido porque los primeros metros de profundidad tienen más O<sub>2</sub> y poseen mayor temperatura y no están sometidos a altas presiones. Además, el análisis mostró que E5\_1 y E5\_2 están influenciadas positivamente por la clorofila *a*, lo cual sugiere que en esas profundidades de la estación E5 hay niveles altos de comunidades de organismos fotótrofos.

## Temperatura

La temperatura osciló entre los 14°C y los 26°C (**Figura 5**). Aproximadamente, la temperatura se mantuvo a 26°C en los primeros 10 m de profundidad en todas las estaciones (excepto E5), a partir de la cual comenzó a descender. La temperatura en las estaciones costeras (E5, E6, E21, E22) disminuyó más rápido conforme aumentó la profundidad, en contraste con las estaciones oceánicas (E9, E7, E28a), donde disminuyó lentamente. Todas las estaciones a los 100 m de profundidad tuvieron una temperatura entre los 14°C y los 15°C. La temperatura en E5 (Cabo Corrientes) varió notablemente con respecto a las demás: en los primeros 10 m de profundidad fue de 19°C y a los 20 m comenzó a descender muy rápidamente hasta alcanzar 15°C a los 60 m. A los 100 m la temperatura de esta estación fue la más baja de entre todas las demás estaciones (13.7°C).

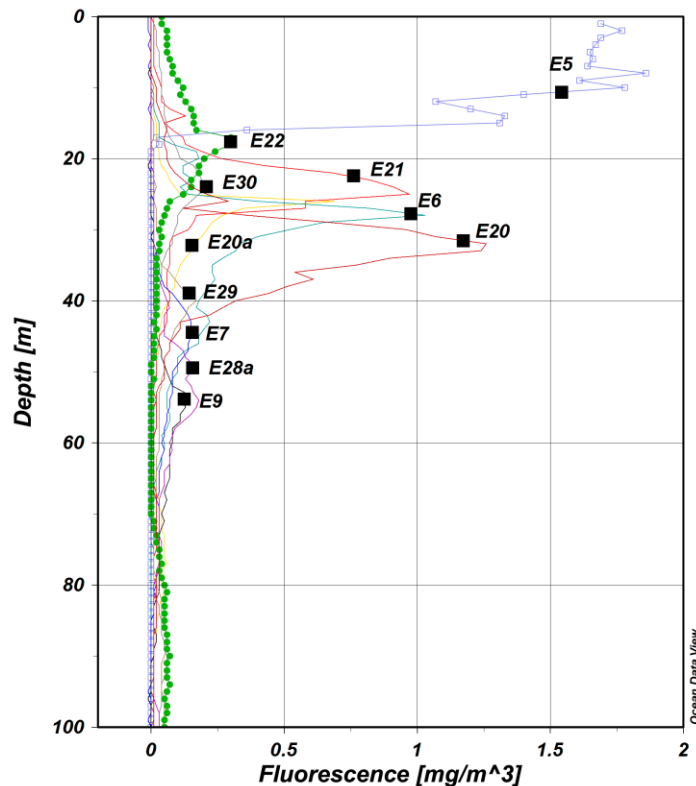


**Figura 5.** Perfiles de temperatura para todas las estaciones del muestreo.

## Clorofila *a*

La clorofila *a* se mantuvo en 0 mg/m<sup>3</sup> en los primeros 20 m de profundidad de todas las estaciones, con excepción de la E5, es decir, la abundancia de fotótrofos fue baja cerca de la

superficie excepto en la estación E5 (**Figura 6**). Entre los 20 y 40 m de profundidad las estaciones costeras (E5, E6, E22, E21) tuvieron las mayores concentraciones de clorofila *a*. Por debajo de los 40 m se presentaron los máximos de clorofila *a* de las estaciones oceánicas (E9, E7, E28a, E29, E20a), los cuales fueron casi un orden de magnitud menor a los correspondientes a las estaciones costeras. En la E5 (Cabo Corrientes) se observó gran variación en la cantidad de clorofila *a* en comparación con las otras estaciones, presentando  $1.5 \text{ mg/m}^3$  de clorofila, más que en las demás estaciones en los primeros 20 m.

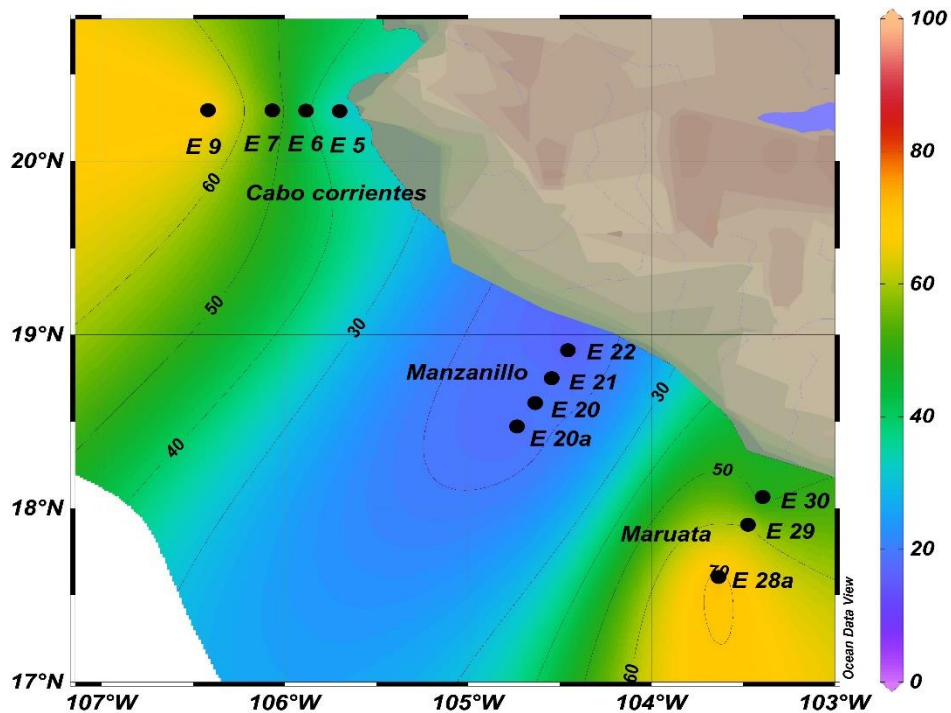


**Figura 6.** Perfiles de clorofila *a* para todas las estaciones de muestreo.

## Oxígeno

Todas las estaciones, excepto la E5, tuvieron una concentración de  $200 \mu\text{mol/kg}$  de  $\text{O}_2$  en sus primeros 20 m de profundidad (**Figura 7**), a partir de la cual el  $\text{O}_2$  comenzó a disminuir. A los 40 m de profundidad, las estaciones oceánicas (E7, E9, E28a, E29) de los transectos de Cabo Corrientes y Maruata se mantuvieron cercanas a los  $200 \mu\text{mol/kg}$ , mientras que en las estaciones costeras (E5, E6, E30), incluyendo a todas las estaciones del transecto de





**Figura 8.** Mapa de  $O_2$  (%) a los 40 m de profundidad para todas las estaciones. Los datos de cada estación fueron extrapolados para crear un mapa continuo de la distribución de  $O_2$ .

Para tener una visión más completa de la variación de la concentración de  $O_2$  por transecto se elaboraron perfiles transversales de  $O_2$  por profundidad en términos del porcentaje ( $100\% = 200 \mu\text{mol/kg}$ ), donde 0 km corresponde a la costa.

En aguas superficiales el transecto de Cabo Corrientes tuvo la menor concentración de  $O_2$  ( $\sim 50\%$  de  $O_2$ ) en la zona costera (**Figura 9**). A partir de los 20 km de distancia a la costa, el  $O_2$  comenzó a aumentar, de manera que después de los 80 km la concentración de  $O_2$  en los primeros metros de profundidad fue muy alta ( $> 80\%$  de  $O_2$ ). Algo similar ocurrió en la ZMO ( $O_2 < 10\% = 20 \mu\text{mol/kg}$ ), la cual fue muy amplia y comenzó cerca de los 50 m de profundidad, pero se desplazó a mayores profundidades conforme aumentó la distancia hacia la costa. En las estaciones del transecto de Manzanillo (**Figura 10**) la ZMO se presentó de manera uniforme aproximadamente a 50 m de profundidad. En el transecto de Maruata (**Figura 11**) la profundidad a la cual apareció la ZMO incrementó conforme aumentó la distancia hacia la costa. El  $O_2$  en este transecto tuvo una distribución similar al transecto de Cabo Corrientes, salvo que las primeras profundidades de la estación costera (E30) tuvieron una mayor concentración de  $O_2$  ( $> 70\%$ ).

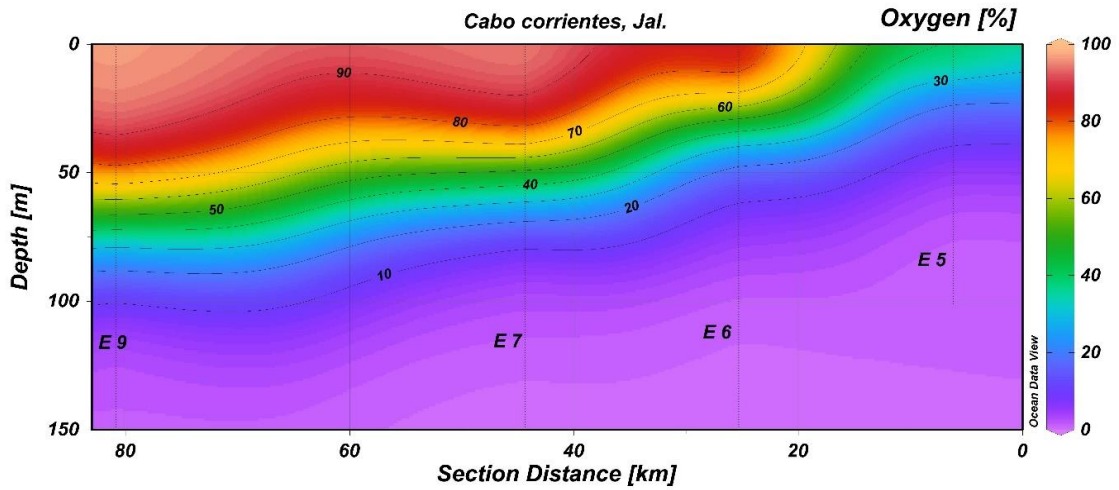


Figura 9. Perfil de O<sub>2</sub> (%) del transecto de Cabo Corrientes.

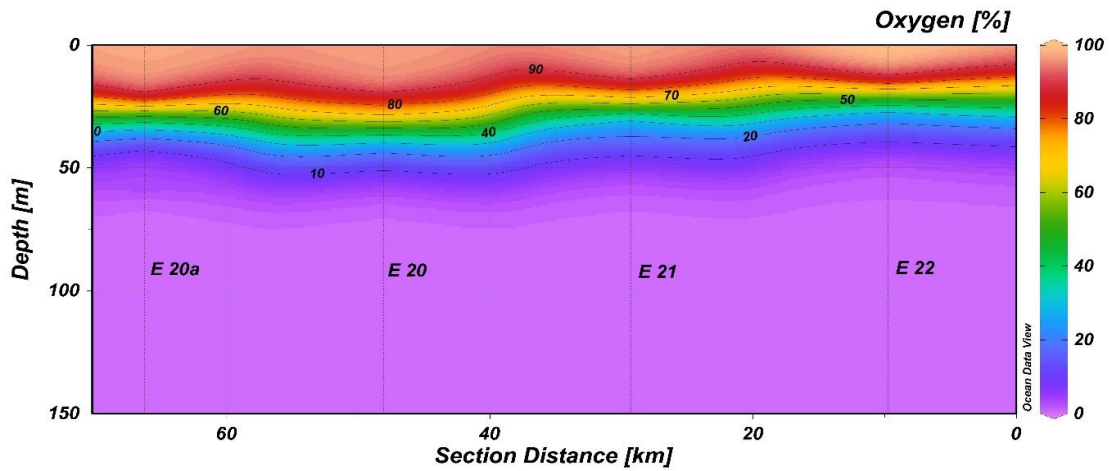


Figura 10. Perfil de O<sub>2</sub> (%) del transecto de Manzanillo.

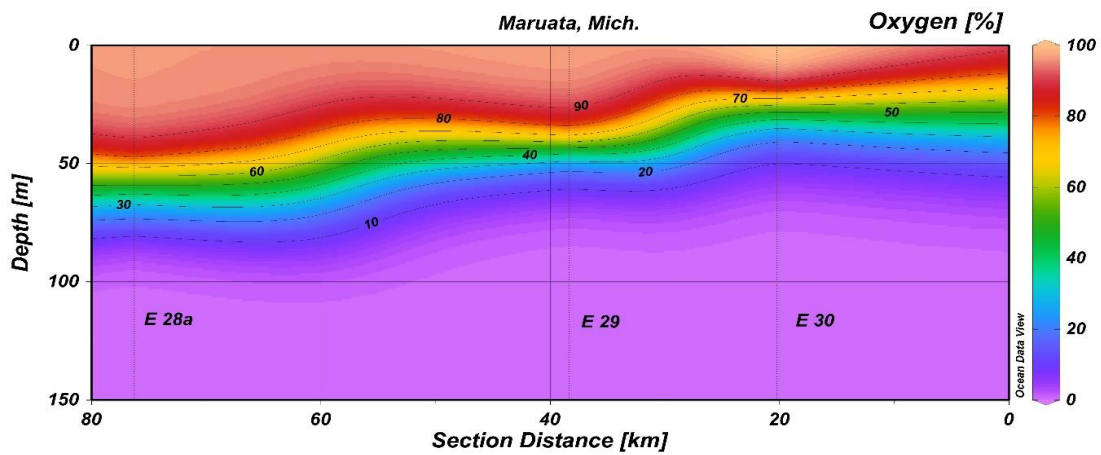
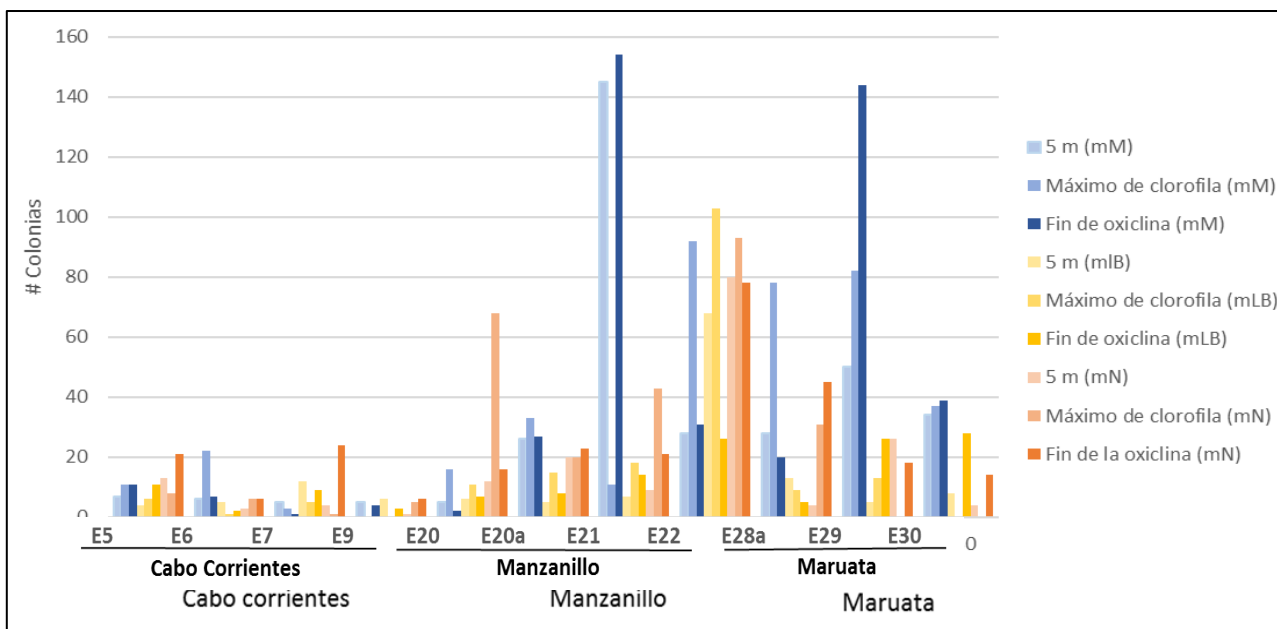


Figura 11. Perfil de O<sub>2</sub> (%) para el transecto de Maruata.



### Aislamiento bacteriano

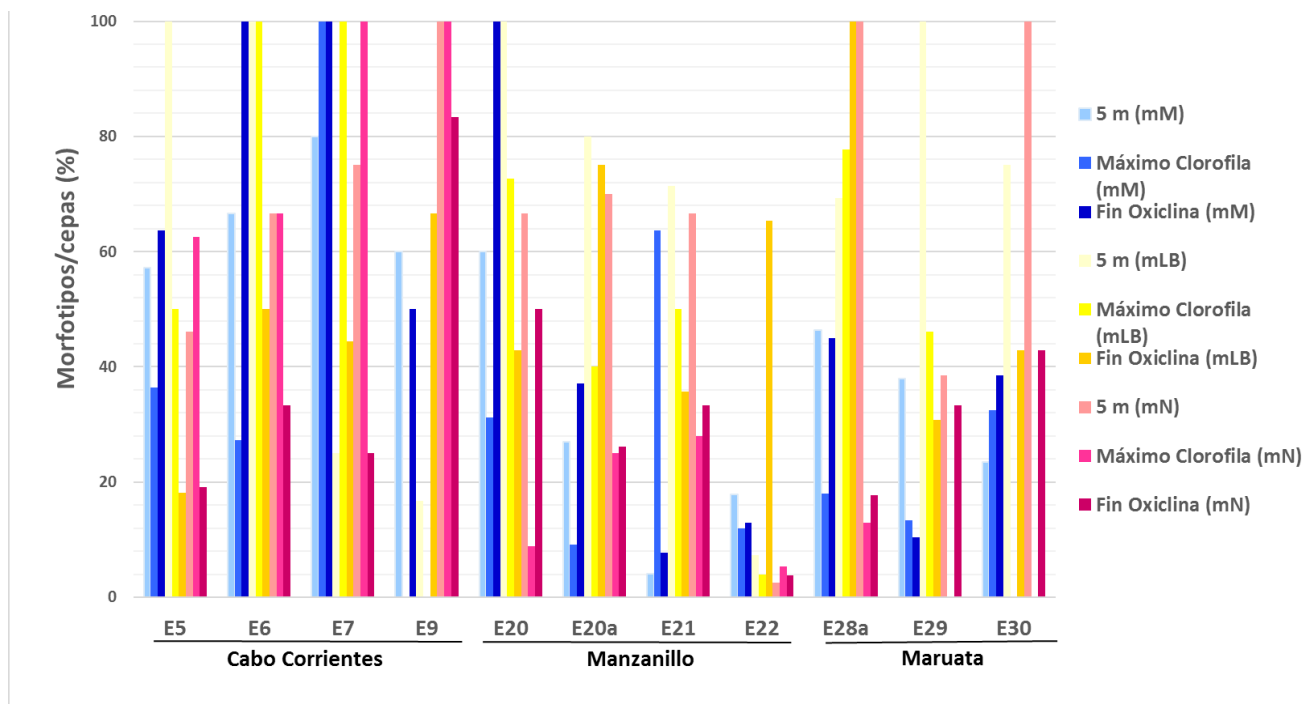
A partir de los tres medios de cultivo utilizados se obtuvieron 2,412 colonias bacterianas, pertenecientes a 231 morfotipos diferentes (**Figura 12**). En mM se obtuvieron 1,163 colonias, siendo el medio de cultivo donde más colonias crecieron (principalmente a los 5 m de profundidad y al final de la oxiclina), mientras que en mLB se obtuvieron 459 colonias y en mN 723 colonias. Además, la mayor cantidad de colonias fueron aisladas en las estaciones de los transectos de Manzanillo y Maruata, en particular en las estaciones E21 (413 colonias), E22 (594) y E29 (358). Mientras que en Cabo Corrientes se aislaron menos colonias (219 cepas entre todas las estaciones del transecto).



**Figura 12.** Número de colonias aisladas por profundidad, medio de cultivo y estación de muestreo.

El mayor porcentaje de morfotipos/cepas fue obtenido en las estaciones de Cabo Corrientes (**Figura 13**). Porcentajes altos corresponden a estaciones donde el número de cepas fue igual o similar al número de morfotipos encontrados, mientras que porcentajes bajos corresponden a estaciones donde el número de cepas fue mucho mayor al número de morfotipos encontrados. Los porcentajes de las estaciones están divididos por medio de cultivo para poder comparar con la tabla 12. Se observó que el número de cepas obtenidas en las estaciones E6, E7, E9 (Cabo Corrientes), E20 (Manzanillo) y E28a (Maruata) fue igual o similar al número de morfotipos encontrados. Por el contrario, las estaciones E21 y E22

(Manzanillo) tuvieron menores porcentajes, es decir, el número de cepas pertenecientes a un mismo morfotipo fue menor.



**Figura 13.** Porcentaje de morfotipos obtenidos con respecto al número de colonias aisladas por profundidad, medio de cultivo y estación de muestreo.

### Análisis filogenéticos de los representantes bacterianos cultivados

Los análisis filogenéticos se hicieron a partir de una submuestra de 80 cepas representativas de las morfo-especies, la cual estuvo compuesta por bacterias pertenecientes a cuatro phyla (Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes), cinco clases (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria y Bacilli), diez órdenes, quince familias y veintidós géneros.

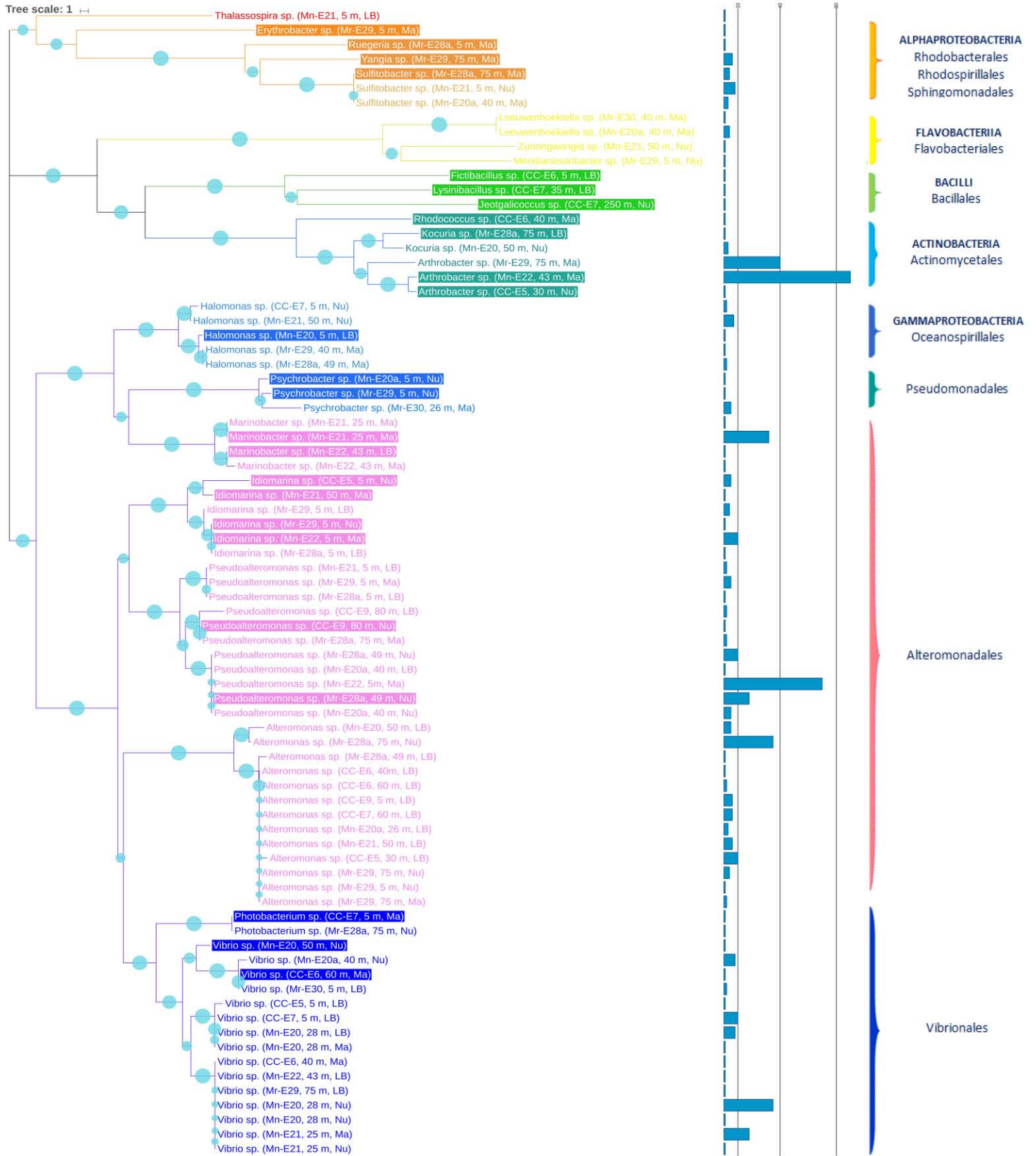
La reconstrucción filogenética a partir de estos 80 representantes agrupó correctamente a los aislados bacterianos de acuerdo con su clasificación (**Figura 14**). El análisis mostró que dos aislados que se caracterizaron morfológicamente como cepas diferentes, en realidad eran la misma cepa. Dado esto, el árbol filogenético que se presenta está formado por una submuestra de 79 cepas.

Los representantes de la clase Gammaproteobacteria fueron los más abundantes en la submuestra (73.7 %). Además, fue el grupo que menos diferencias (en términos de la

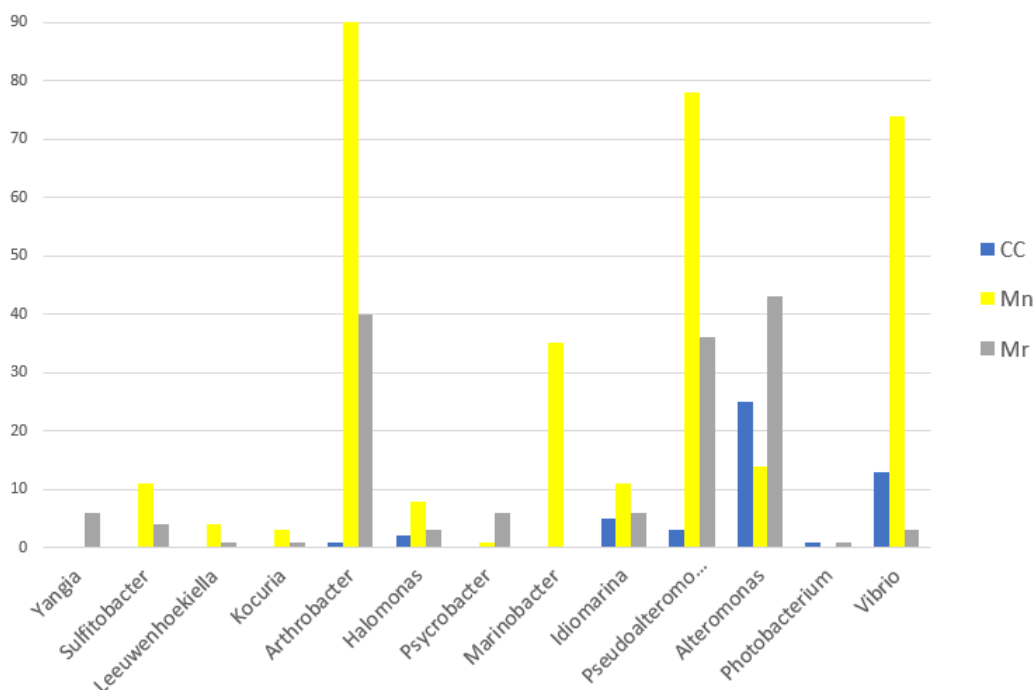
distancia) mostró entre todo el conjunto de bacterias en el análisis, lo cual se explica también por la alta abundancia de este grupo en la reconstrucción filogenética. De forma contraria, se observó que las cepas más diferentes (en términos de distancia) fueron las pertenecientes a las Flavobacterias, Bacilli y Actinobacterias. Además, el análisis mostró la presencia de bacterias pertenecientes a algunos géneros de Actinomicetos, bacterias de interés biotecnológico por la diversidad de compuestos bioactivos que sintetizan. Se obtuvieron bacterias pertenecientes a géneros con roles funcionales importantes en el ecosistema, tales como *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, y *Vibrio*. Las bacterias menos abundantes fueron las pertenecientes a las clases Flavobacteria y Bacilli, representando el 5% y el 3.7% del total, respectivamente.

Con base en las morfo-especies, las bacterias más abundantes fueron dos cepas pertenecientes a las Actinobacterias (género *Arthrobacter*) con 90 y 40 colonias, cada una y otras dos cepas pertenecientes a las Gammaproteobacteria (géneros *Pseudomonas* y *Alteromonas*) con 70 y 35 colonias respectivamente.

**Figura 14.** Árbol filogenético de las secuencias de los representantes bacterianos cultivados hecho con el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 10,000 repeticiones. Los valores de Bootstrap se muestran en círculos, donde el tamaño corresponde al porcentaje de veces en las cuales se formaron las diferentes ramas del árbol. La etiqueta se compone del género bacteriano, en paréntesis se muestran las iniciales del transecto –Cabo Corrientes (CC), Manzanillo (Mn) y Maruata (Mr) –, la estación de muestreo, la profundidad a la cual se aisló la bacteria y el medio de cultivo usado. El color de la etiqueta corresponde al orden bacteriano y el color de las ramas corresponde a la clase a la cual pertenece la bacteria. Los nombres de cepas resaltados indican las cepas a las que se les realizaron pruebas enzimáticas. A un costado se muestra una gráfica de barras que corresponde a la abundancia de aislados obtenidos para cada cepa según su morfotipo.



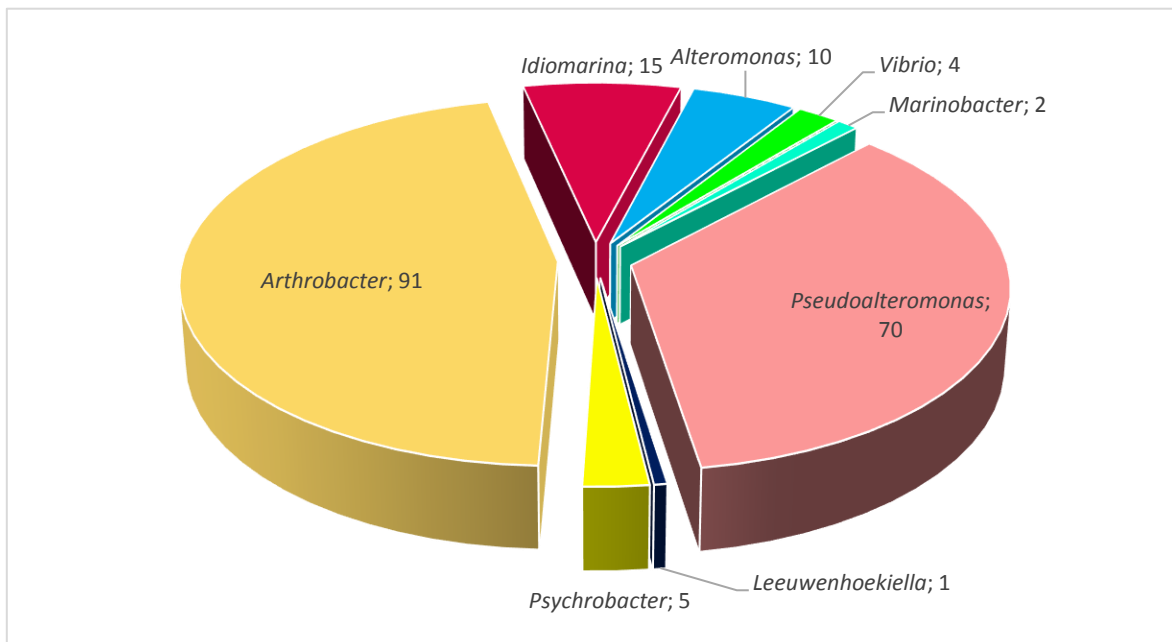
En relación con la distribución por transecto de las bacterias representativas más abundantes (con más de una cepa cultivada) del análisis filogenético (**Figura 14**), los géneros *Arthrobacter*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio* fueron predominantes en el transecto de Manzanillo. También se observa que géneros como *Arthrobacter*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* y *Vibrio* son cosmopolitas, es decir, se lograron cultivar a partir de agua de todos los transectos (**Figura 15**).



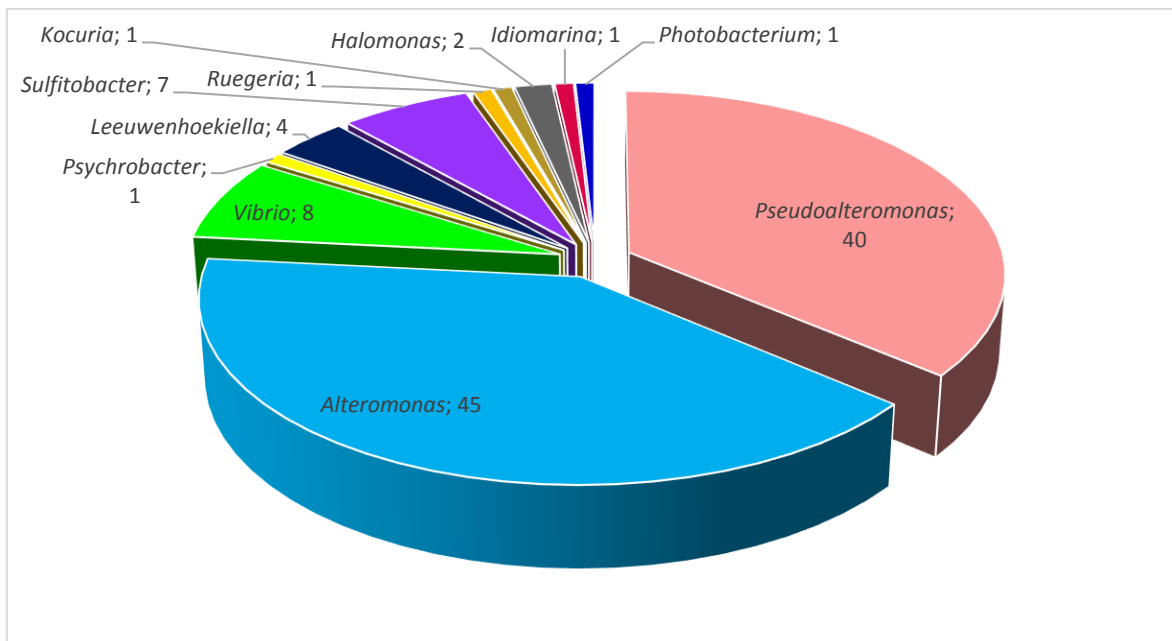
**Figura 15.** Número de cepas de cada representante bacteriano aislado por género (con más de una cepa cultivada) y transecto, pertenecientes al análisis filogenético.

De la distribución de las bacterias representativas (a partir del análisis filogenético) entre estaciones costeras (E5, E22, E30) y oceánicas (E9, E20a, E28a), se observan géneros característicos para estas dos zonas. Por ejemplo, *Arthrobacter* y *Marinobacter* solo se aislaron en estaciones costeras (**Figura 16**) y *Kocuria*, *Halomonas*, *Sulfitobacter*, *Ruegeria* y *Photobacterium* solo se encontraron en estaciones oceánicas (**Figura 17**). Por otro lado, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Psychrobacterium*, *Leeuwenhoekella*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio* se aislaron tanto en estaciones costeras como oceánicas, sugiriendo que estos géneros son cosmopolitas. Además, los géneros considerados cosmopolitas presentaron diferentes

abundancias dependiendo de la zona. *Vibrio* tuvo una abundancia de 4 cepas en estaciones oceánicas y 8 cepas en estaciones costeras, mientras que *Pseudoalteromonas* presentó 70 cepas en estaciones costeras y 40 cepas en estaciones oceánicas.



**Figura 16.** Composición de representantes bacterianos aislados de las estaciones costeras.



**Figura 17.** Composición de representantes bacterianos aislados de las estaciones oceánicas.

### Análisis de la diversidad bacteriana cultivada

Se realizó una serie de índices ecológicos para conocer la diversidad de bacterias cultivables por muestra y profundidad de muestreo (**Tabla 7, ANEXO IV: Tabla S2**).

**Tabla 7.** Media  $\pm$  DS de cada índice de diversidad por profundidad de muestreo. La letra *a* significa que ninguna media fue estadísticamente diferente entre profundidades ( $p < 0.05$ ).

Índice	5 m	Máximo de clorofila	Final de la oxiclina
Chao1	26.17 $\pm$ 12.77 <i>a</i>	20.74 $\pm$ 9.67 <i>a</i>	25.30 $\pm$ 13.79 <i>a</i>
Shannon (H')	2.09 $\pm$ 0.64 <i>a</i>	1.84 $\pm$ 0.32 <i>a</i>	2.14 $\pm$ 0.28 <i>a</i>
Simpson ( $\lambda$ )	0.18 $\pm$ 0.15 <i>a</i>	0.19 $\pm$ 0.15 <i>a</i>	0.15 $\pm$ 0.08 <i>a</i>

Las pruebas estadísticas mostraron que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las profundidades de muestreo. Sin embargo, se observó que las muestras correspondientes a los 5 m de profundidad fueron las que tuvieron más riqueza de acuerdo con Chao y las pertenecientes al máximo de clorofila fueron las que menos riqueza tuvieron. El índice de Shannon fue mayor al final de la oxiclina y menor en el máximo de clorofila, mientras que la dominancia (Simpson) fue mayor en el máximo de clorofila y menor al final de la oxiclina. Significando que el final de la oxiclina fue la profundidad más diversa de acuerdo a Shannon y a Simpson, y máximo de clorofila es el menos diverso de acuerdo a los tres índices.

El análisis NMDS de los datos biológicos separó las muestras según la abundancia de morfotipos (**Figura 18**). Se distingue un grupo formado por las estaciones E7\_2, E6\_3, E7\_1, E30\_2, E20\_3, E6\_1, E9\_3, E9\_1, E5\_1 y E5\_2, las cuales estuvieron separadas entre sí, sugiriendo que las abundancias de los morfotipos bacterianos fueron diferentes en estas estaciones. Se observó otro grupo de estaciones con mayor cercanía entre sí compuesto del resto de las estaciones, indicando mayor similitud entre ellas en términos de la abundancia bacteriana. Sin embargo, no se observó ningún patrón claro de agrupación. Dicha distribución homogénea se corroboró con los resultados de la ANOVA en los índices de diversidad, los cuales indicaron que la diversidad no fue significativamente diferente entre profundidades.

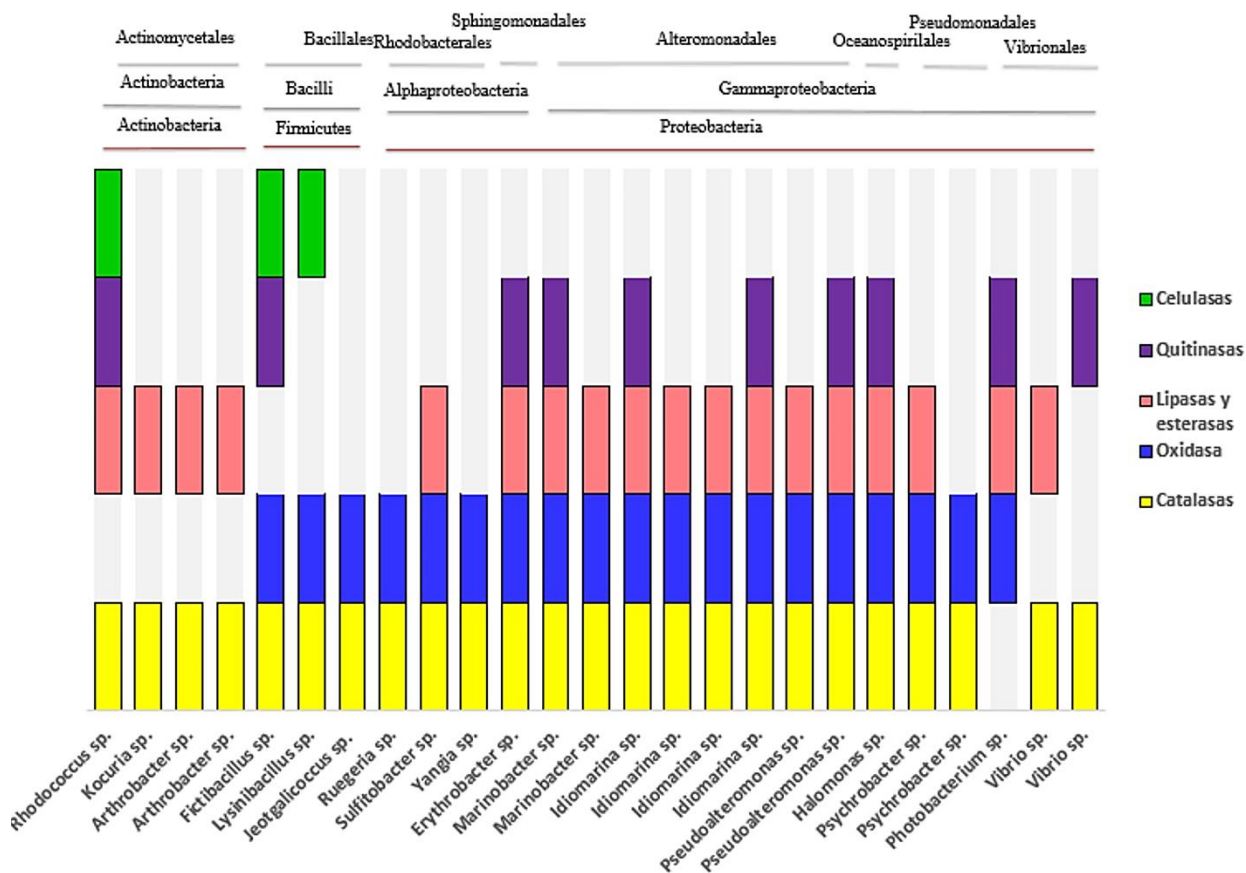
Las correlaciones de Pearson entre el MDS1 y las variables ambientales (vectores) mostraron correlación inversa con la temperatura y el O<sub>2</sub>, mientras que la salinidad, presión, densidad y fluorescencia tuvieron correlación directa con el MDS1. Con el MDS2, la presión





## Caracterización enzimática

Se realizaron pruebas para detectar la actividad de celulasas, quitinasas, lipasas, esterasas, oxidasas y catalasas a una submuestra de 25 cepas de las 79 cepas analizadas filogenéticamente (**Figura 19**).



**Figura 19.** Actividad enzimática de celulasas, quitinasas, lipasas, esterasas, oxidasas y catalasas de las cepas ensayas. En color se muestran resultados positivos para cada una de las enzimas. Las barras de color gris indican la ausencia de actividad enzimática. La parte superior muestra la taxonomía de las bacterias ensayadas (de arriba hacia abajo: familia, clase y orden) y al pie de la gráfica el género de la cepa ensayada.

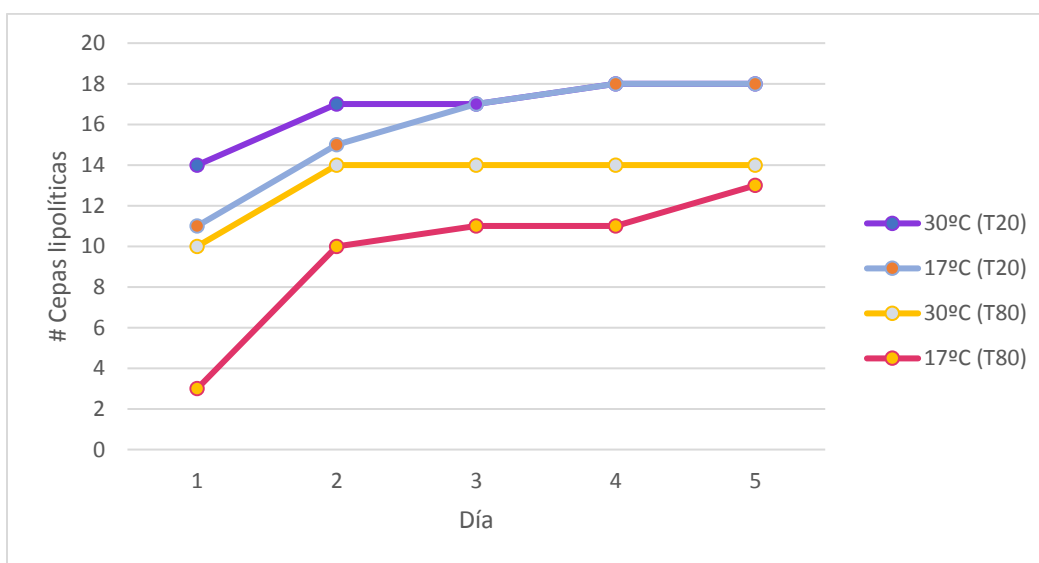
Solo las cepas pertenecientes a los géneros *Rhodococcus* (clase Actinobacteria) *Fictibacillus* y *Lysinibacillus* (clase Bacilli) fueron positivas para celulasas. Por otro lado, ningún representante perteneciente a las Proteobacterias tuvo actividad celulolítica. El ensayo para quitinasas fue negativo para todas las Alphaproteobacterias, excepto la cepa perteneciente al género *Erythrobacter*. Al menos un miembro de las otras clases tuvo

actividad quitinolítica. Por ejemplo, *Rhodococcus* (clase Actinobacteria) y *Fictibacillus* (clase Bacilli) fueron quitinolíticos.

Las Alphaproteobacterias ensayadas fueron negativas para lipasas y esterases, a excepción de la cepa perteneciente al género *Sulfitobacter*. Un Actinomiceto del género *Rhodococcus* fue la única cepa que resultó positiva para celulasas, quitinasas y lipasas y esterases, sugiriendo que este género bacteriano podría tener un papel importante en los procesos de mineralización de la MO en el Pacífico tropical mexicano.

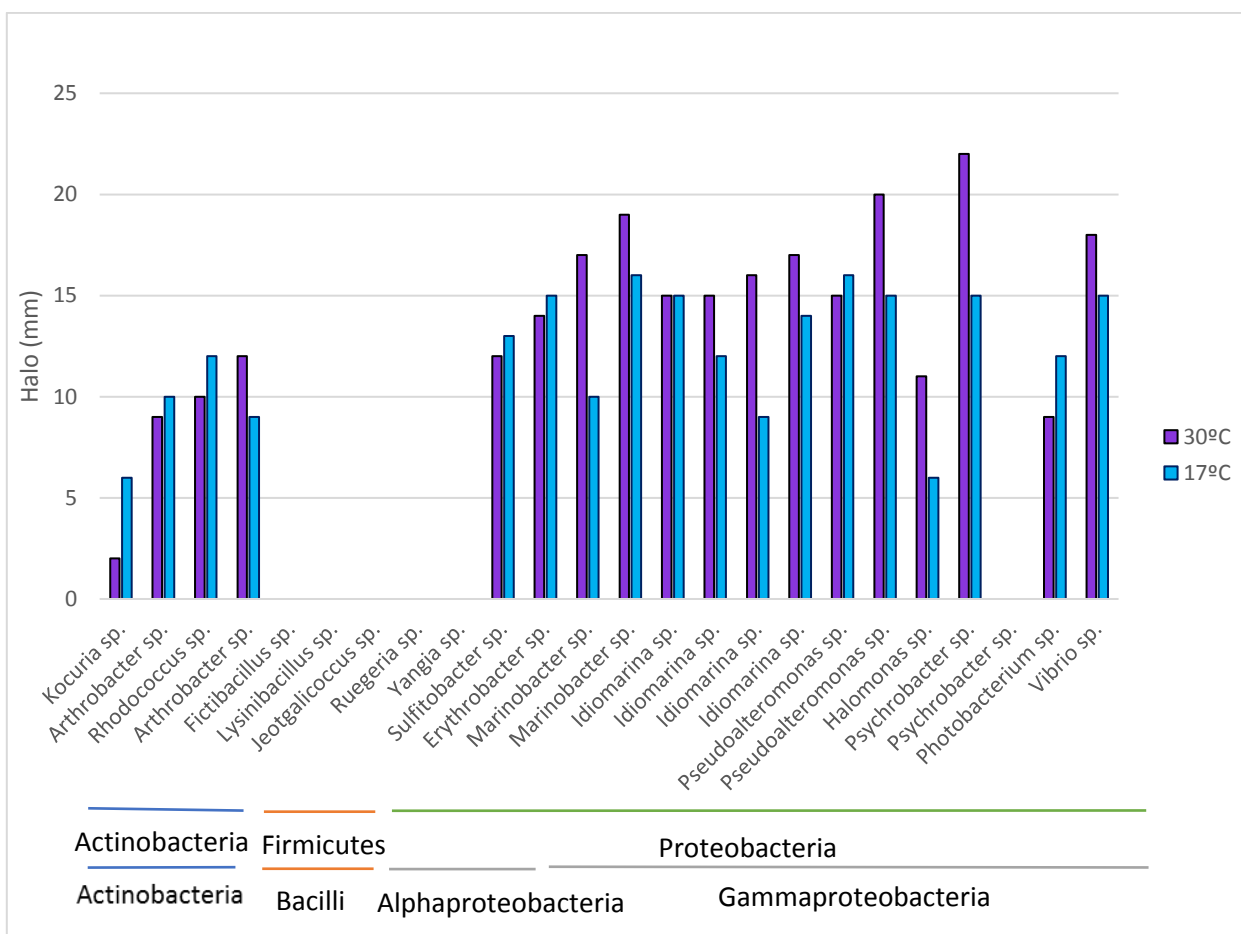
Hubo cepas que no presentaron actividad de oxidasas, como las pertenecientes a las Actinobacterias y el género *Vibrio*. Solo la cepa perteneciente al género *Photobacterium* fue negativa para catalasas.

Respecto a las pruebas de lipasas y esterases (**Figura 20**), hubo más cepas que degradaron T20 a 30°C que a 17°C al primer día de incubación. Sin embargo, al quinto día de incubación la cantidad de cepas que degradaron T20 crecidas a 17°C y 30°C fue la misma (18 cepas de 25 ensayadas). En contraste, menos cepas degradaron T80, y entre las que pudieron hacerlo hubo más cepas que lo hicieron a 30°C (10 cepas al inicio de la incubación y 14 cepas al quinto día de incubación) que a 17°C (3 cepas al inicio de la incubación y 13 cepas al quinto día de incubación). En los primeros días de incubación las cepas lipolíticas que degradaron T20 fueron más que las que degradaron T80. En el último día de incubación la diferencia entre cepas que degradaron T20 y T80 fue menor.



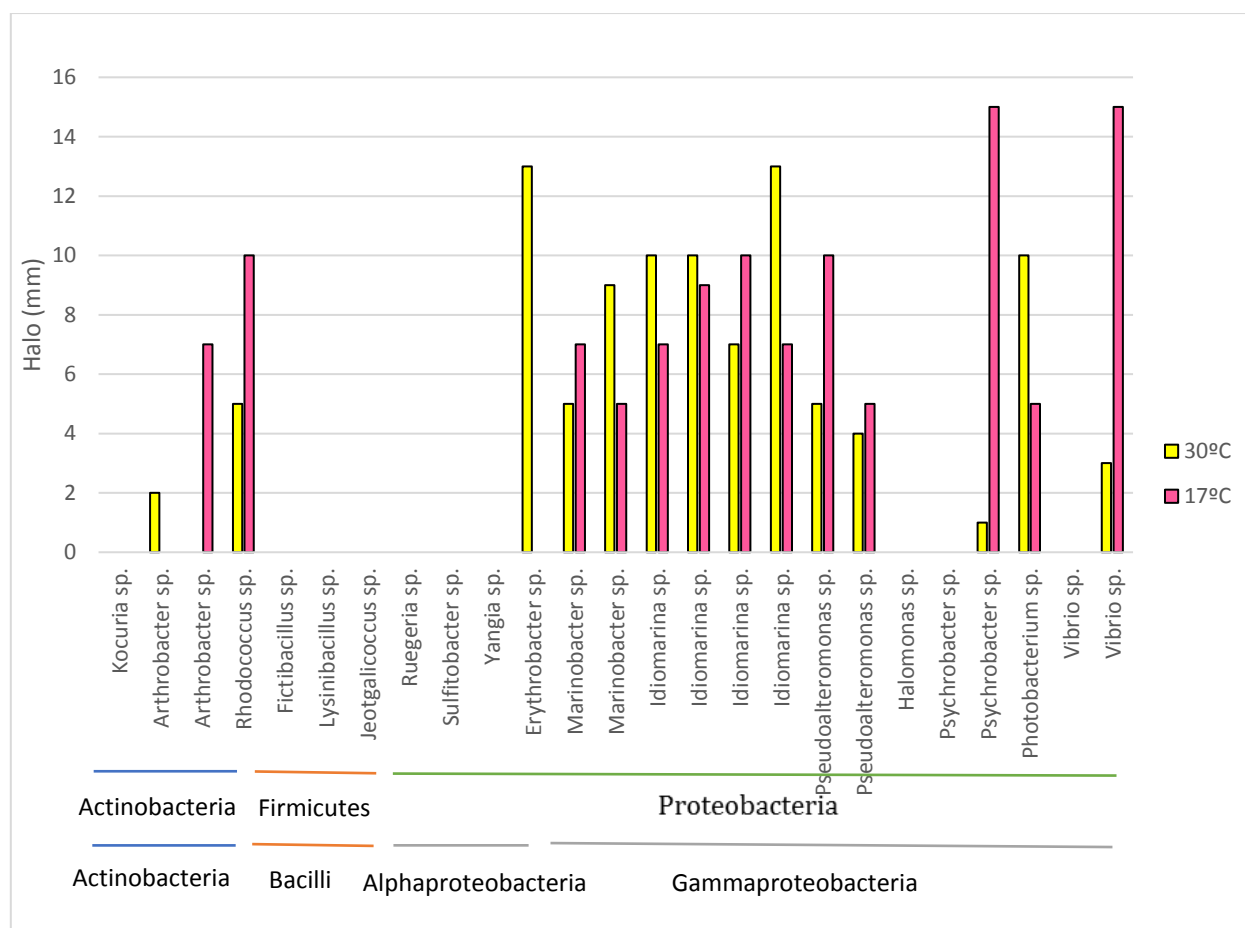
**Figura 20.** Número de cepas lipolíticas por día a 17°C y 30°C con T20 y T80 como sustratos.

Entre las cepas lipolíticas que degradaron T20 sobresalen las Actinobacteria y las Proteobacteria porque son capaces de degradar este sustrato a las dos temperaturas de incubación (17 y 30°C). En contraste, las cepas pertenecientes a los Firmicutes no presentaron actividad lipolítica a ninguna temperatura de incubación (**Figura 21**). Además, la actividad lipolítica varía según el tipo bacteriano y la temperatura. Los Actinomycetos degradaron mejor T20 a 17°C, mientras que la actividad lipolítica de las Proteobacterias fue heterogénea en ambas temperaturas de incubación y no todos sus representantes tuvieron actividad lipolítica.



**Figura 21.** Actividad lipolítica (tamaño del halo) de cepas bacterianas a 17°C y 30°C con T20 como sustrato.

La cantidad de cepas capaces de degradar T80 fue menor que las cepas que degradaron T20 (**Figura 22**). Por ejemplo, hubo Actinobacterias que degradaron T20 pero no degradaron T80. Lo mismo ocurrió para las Gammaproteobacteria, donde cepas de los géneros *Halomonas*, *Vibrio* y *Psychrobacter* degradaron T20, pero no T80. En general fue menor la actividad lipolítica con T80, no solo por la cantidad de cepas que degradaron ese sustrato, sino también por la baja actividad (tamaño de halo) que cada cepa presentó. Además, la actividad lipolítica se relacionó con el grupo bacteriano, de manera que las Actinobacterias tuvieron más actividad lipolítica a 17°C, mientras que ninguna cepa perteneciente a Bacilli fue lipolítica en ninguna de las dos temperaturas de incubación (17 y 30°C). Las Proteobacterias, al igual que con T20, mostraron heterogeneidad en la degradación de T80.



**Figura 22.** Actividad lipolítica (tamaño del halo) de cepas bacterianas a 17°C y 30°C con T80 como sustrato.

## X. DISCUSIÓN

### **Características hidrológicas de las estaciones de muestreo**

El O<sub>2</sub> disuelto, la temperatura, la presión, la salinidad y la densidad varían significativamente conforme cambia la profundidad. El O<sub>2</sub> y la temperatura fueron mayores en la primera profundidad (5 m). El O<sub>2</sub> se encuentra en mayor cantidad en la superficie del océano debido a las interacciones de éste con la atmósfera y la actividad biológica de organismos fotótrofos, mientras que la temperatura en el océano también es mayor en los primeros metros de profundidad dada las interacciones con el sol (Bollmann et al., 2010). En profundidades mayores el O<sub>2</sub> disminuye, debido a la alta demanda de oxígeno por parte de microorganismos aerobios y el bajo suministro de este gas por fuentes oceanográficas y biológicas como corrientes ricas en oxígeno y fotótrofos, respectivamente. Lo cual las ZMO (Gallo & Levin, 2016), tal como la que se produce en el Pacífico tropical mexicano. Las concentraciones más bajas de O<sub>2</sub> se presentaron en las estaciones más costeras. Esto podría deberse a la aparición de la ZMO en aguas más superficiales en esta zona (Helly & Levin, 2004), además de que las costas se asocian con zonas eutróficas donde hay cantidades bajas de O<sub>2</sub>, ligadas a zonas de alta productividad biológica (Gallo & Levin, 2016; Kamykowski & Zentara, 1990).

Con excepción de la E5, la concentración de O<sub>2</sub> fue similar en los primeros 15 m de profundidad para todas las estaciones. En las estaciones más oceánicas de Cabo Corrientes y Maruata el O<sub>2</sub> fue alto, incluso después de los 40 m profundidad. Estas variaciones en el O<sub>2</sub> y por lo tanto en la extensión de la ZMO explican los patrones de actividad biológica presentes (bacterias aerobias y organismos fotótrofos se encuentran en antes de la primera oxiclina oceanica) y la variación de otras variables ambientales, tales como la fluorescencia y temperatura, en el océano. Por ejemplo, la temperatura influye en la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el océano porque el calentamiento del agua provoca cambios en las constantes de solubilidad, lo cual afecta directamente la cantidad de O<sub>2</sub> disuelto. De esta forma, aguas frías tienen más O<sub>2</sub> que aguas cálidas. Diferentes temperaturas también provocan la estratificación de la columna de agua y pueden alterar la actividad metabólica de los organismos (Bollmann et al., 2010).

La estación E5 es un caso especial, ya que en ella se observó que la temperatura hasta los primeros 20 m de profundidad fue menor, la clorofila *a* fue la más alta y la concentración

de O<sub>2</sub> fue la más baja de todas las estaciones. Estas características son similares a las reportadas en las surgencias oceánicas. Las surgencias son fenómenos oceánicos donde masas de agua profundas frías, con poco O<sub>2</sub> y con altas cantidades de nutrientes se mueven hacia la superficie sustituyendo a masas de agua cálidas, ricas en O<sub>2</sub> y con pocos nutrientes (Kamykowski & Zentara, 1990). Los máximos de clorofila surgen en aguas con altos nutrientes, como en dichas zonas de surgencias o también en zonas cercanas a la costa, en las que el aporte de nutrientes es por parte de ríos, que generan la eutrofización del agua de mar. Estas aguas con altas cantidades de nutrientes son ideales para el florecimiento de algas, las cuales al morir son consumidas por bacterias heterótrofas (Falkowski, 2012). Por lo tanto, en estas regiones, la respiración de microorganismos aerobios consume O<sub>2</sub> y con ello disminuye la abundancia de otros microorganismos dependientes de O<sub>2</sub> (Medina-Silva et al., 2018; Pereira Brandini et al., 2014). Esto pudo suceder en las estaciones E21 y E20, pertenecientes al transecto de Manzanillo, el cual tuvo los niveles más bajos de O<sub>2</sub> y la ZMO a menor profundidad (50 m). La aparición de la ZMO a profundidades menores en esta área del Pacífico coincide con lo reportado por Helly y Levin (2004), donde mencionan que los trópicos presentan la ZMO a menor profundidad, incluyendo la región del Pacífico mexicano. Estas zonas más superficiales aparecen entre los 50 y los 100 m de profundidad (Gallo & Levin, 2016), donde convergen con la zona eufótica.

Por último, la fluorescencia no fue significativamente diferente entre profundidades, sin embargo se observó mayor concentración entre los 20 y los 40 m de profundidad. La fluorescencia se relaciona con la producción de biomasa (Wakeman, 1987), por lo tanto los picos encontrados a esas profundidades se asocian con alta actividad de fotótrofos en la columna de agua, tales como algas unicelulares y cianobacterias. Estos máximos dependen de factores como el crecimiento del fitoplancton y del contenido celular de clorofila *a* (Brandini et al., 2014).

### **Diversidad bacteriana cultivable y su relación con las variables hidrológicas**

Hubo diferencias en la cantidad de cepas bacterianas aisladas dependiendo el medio de cultivo, la estación (costera y oceánica) y transecto. Esas diferencias pueden deberse a las condiciones nutrimentales, fisiológicas y ambientales a las cuales crecen las bacterias en el medio donde se encuentran y la similitud de estas condiciones en el cultivo. Dadas las

condiciones de cultivo y las profundidades de muestreo, las bacterias de este trabajo deben ser aerobias o aerobias facultativas, ya que crecieron en presencia de O<sub>2</sub>. Además, estas bacterias son mesófilas, ya que crecieron en un rango de temperaturas entre los 17°C y los 30°C (Madigan et al., 2015).

Con base en el análisis del gen que codifica el 16S rRNA de la submuestra de cepas aisladas, se observó que la diversidad cultivada se corresponde con la diversidad heterótrofa reportada como predominante o representativa en el océano (Fuhrman, 2008; Giovannoni & Stingl, 2005). Por ejemplo, Gammaproteobacteria, con el 73.7% de las cepas presentes en la submuestra, fue la clase con mayor abundancia, la cual está considerada como una de las más abundantes y diversas en el océano (Giovannoni & Stingl, 2005; Williams et al., 2010). Alphaproteobacteria también está considerado como un grupo abundante en el océano y en este trabajo fue el segundo grupo con mayor abundancia, representando un 8.7% de las cepas caracterizadas molecularmente. Las Actinobacterias representaron el 7.5% y también suelen tener alta abundancia en el medio marino (Bertrand et al., 2015). La alta abundancia en el cultivo de estos tres géneros pudo deberse a la similitud entre medio de cultivo y las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de estos grupos. Por ejemplo, en los Actinomicetos, las cepas del género *Arthobacter* fueron mayormente aisladas a partir de agua correspondiente con el inicio de la oxiclina, donde posiblemente la concentración de O<sub>2</sub> tuvo un papel fundamental en el crecimiento de este grupo bacteriano.

Respecto a la diversidad, no hubo diferencias significativas en los índices de diversidad para las bacterias aisladas en las tres profundidades de estudio. Esto puede ser debido al movimiento de masas de agua por las corrientes oceánicas, que favorecerían el intercambio de nutrientes y MO entre las diferentes profundidades (Signoret et al., 2006), promoviendo que se mantenga homogénea la cantidad de bacterias heterótrofas en la columna de agua en estas tres profundidades. Sin embargo, a pesar de que estadísticamente la diversidad fue homogénea, se observa una mayor diversidad a los 5 m y sobre todo al final de la oxiclina. Estas diferencias pueden atribuirse a las condiciones ambientales y nutrimentales presentes en esas profundidades. Por ejemplo, a los 5 m de profundidad hay más cantidad de O<sub>2</sub> disuelto en el océano, lo cual favorece el crecimiento de bacterias aerobias heterótrofas. Además, las comunidades bacterianas en esa zona están sujetas a mayor temperatura (se observó que el crecimiento óptimo de las bacterias cultivadas en este

trabajo fue a 30°C) y no compiten por nutrientes con organismos fotótrofos (los picos de fluorescencia que corresponden a la mayor abundancia de fotótrofos se observaron entre 20 y 40 m de profundidad). En cuanto a la alta diversidad encontrada al final de la oxiclina, podría deberse a que las zonas con niveles bajos de O<sub>2</sub> pueden tener alta actividad biológica y suele asociarse a altas tasas de respiración de organismos aerobios, considerándose un nicho para bacterias heterótrofas (Medina-Silva et al., 2018).

Dado que no hay información sobre índices de diversidad para bacterias cultivables en Pacífico tropical mexicano, se hizo una comparación con otros estudios de bacterias en ambientes marinos y acuáticos continentales. La riqueza calculada mediante Chao1 fue menor con respecto a la reportada para bacterias cultivables en medios marinos y acuáticos continentales (34.5-70) (Sosa, 2011; Zheng et al., 2014). El índice de Shannon no tiene una escala determinada, sin embargo, valores entre 1.5 y 3, como los obtenidos en las estaciones muestreadas, son considerados indicadores de zonas con diversidad media. Aunque este índice tampoco fue significativamente diferente entre las tres profundidades muestreadas, varió ampliamente, lo cual puede ser reflejo de la diversidad en el océano dependiendo las características ambientales. Los valores de este indicador son menores en comparación con los reportados (6.7-7.5) en otros estudios de diversidad con bacterias heterótrofas marinas (Zheng et al., 2014), pero similares con los reportados (2.8-3.0) para sistemas acuáticos continentales (Sosa, 2011). Este índice es sensible al número de individuos y a la cantidad de muestras colectadas (Gotelli & Ellison, 2013). En este estudio el tamaño de la muestra fue pequeño (2,412 cepas) en comparación con estudios no dependientes de cultivo, por lo cual puede que los estimadores calculados estén subestimando la diversidad bacteriana heterótrofa presente en los sitios de muestreo, indicando solo la diversidad bacteriana cultivada del Pacífico mexicano, la cual corresponde a una fracción muy pequeña de la diversidad total. En cuanto al índice de Simpson, el valor reportado para bacterias heterótrofas en ambientes marinos (0.0011-0.0061) sugiere una mayor diversidad que la calculada en este trabajo (Zheng et al., 2014), sin embargo, para ambientes acuáticos continentales (0.04-0.11) el valor es similar (Sosa, 2011).

Las variables ambientales, en especial la temperatura y el O<sub>2</sub> disuelto, influyen en la distribución del bacterioplancton marino (Sunagawa et al., 2015). La estratificación del agua por cambios bruscos de temperatura, las zonas con poca concentración de O<sub>2</sub> y las ZMO



pueden representar barreras al flujo génico (Rogers, 2000), delimitando el área de distribución de ciertos grupos bacterianos en el océano. Por ejemplo, en estaciones costeras con mayor temperatura y menor concentración de O<sub>2</sub> disuelto, se encontraron géneros, como *Halomonas*, *Kocuria*, *Leeuwenhoekiella*, *Sulfitobacter* y *Photobacterium*, que no estaban presentes en estaciones oceánicas. Por otro lado, las zonas de surgencias aumentan el flujo y la actividad biológica en aguas superficiales por el aporte de nutrientes y O<sub>2</sub> disuelto (Kamykowski & Zentara, 1990). Por ejemplo, el transecto de Cabo Corrientes está influenciado por una fuerte surgencia, que genera la eutrofización de aguas nutricionalmente pobres, produciendo el aumento de actividad de fotótrofos en la columna de agua y de bacterias heterótrofas, y con ello el aumento en las tasas de respiración ocasionando la expansión de la ZMO, limitando así la distribución de bacterias dependientes de O<sub>2</sub>.

En coincidencia con lo anterior, el menor número de cepas aerobias se obtuvieron del transecto de Cabo Corrientes donde el O<sub>2</sub> fue menor en los primeros metros de profundidad y en las estaciones costeras. Por el contrario, la mayor cantidad de cepas aerobias fueron aisladas de los transectos de Maruata y Manzanillo, siendo este último, el transecto que presentó la ZMO más superficial. Esto puede ser debido a que las bacterias son restringidas a un área menor, aumentando la concentración y diversidad de estas zonas como resultado de una ZMO que restringe la distribución de estos microorganismos aerobios.

Además, se observa la importancia del O<sub>2</sub> en la abundancia de las bacterias heterótrofas a partir del NMDS. Con base en ese análisis podemos notar que la mayoría de las muestras (y la abundancia de bacterias aisladas de ellas) están influenciadas por el O<sub>2</sub> y la temperatura en la columna de agua. En contraste, variables como la fluorescencia, densidad, presión y salinidad solamente fueron importantes en pocas muestras (E5\_1, E5\_2, E6\_2, E7\_2 y E30\_1).

### **Potencial enzimático de bacterias heterótrofas del Pacífico mexicano**

El análisis filogenético mostró la presencia de cepas pertenecientes a géneros bacterianos con interés ecológico, dado las enzimas extracelulares que estos géneros son capaces de sintetizar. Las cepas más importantes en este sentido son las pertenecientes a las Actinobacterias (Goodfellow & Haynes, 1984; Manivasagan et al., 2014) y los géneros

*Vibrio*, *Alteromonas* (Wang et al., 2007) y *Pseudoalteromonas* (Costa-Ramos & Rowley, 2004), entre otros.

En ambientes oligotróficos como el océano, los procesos de mineralización por parte de celulasas, quitinasas y lipasas representan una fuente importante de suministro de MO biodisponible y energía para la biota marina. La celulosa es el polímero con mayor abundancia en la biosfera (Decker, 2003) y es producido por algas y cianobacterias en el océano (Mihriyan, 2011). En este trabajo se encontraron solo tres cepas con actividad celulolítica, siendo una de ellas una Actinobacteria. Debido a la importancia de la clase Actinobacteria en la producción de enzimas extracelulares, se esperaba que todas las cepas pertenecientes a este grupo fueran capaces de degradar la celulosa. Las otras dos cepas celulolíticas pertenecieron a la clase Bacilli, grupo reconocido por crecer en ambientes marinos ricos en MO (Bertrand et al., 2015), y que pueden estar participando activamente en la mineralización de la celulosa en el océano.

La mineralización de la celulosa es un proceso complejo que involucra varias enzimas. Para conocer las enzimas específicas en este proceso se deben hacer otras pruebas. La despolimerización de la celulosa primeramente produce celobiosa y la despolimerización de la celobiosa genera glucosa (Himmel, et al., 2007). La glucosa en muchos organismos es una de las fuentes de C y energía más importantes (Jiang & Zhang, 2003), entonces, la mineralización de esta molécula representa una entrada de energía y nutrientes importante en las comunidades microbianas acuáticas y en otros organismos en la cadena trófica (Falkowski et al., 2008).

La quitina es el segundo polímero más abundante en la biosfera (Howard et al., 2003; Sakai et al., 1998; Tsujibo et al., 1998). En el océano se encuentra formando parte del exoesqueleto de crustáceos, diatomeas y *plumas* de calamares (Sakai et al., 1998). La despolimerización de la quitina se lleva a cabo por una serie de enzimas y como resultado del proceso se genera quitobiosa y N-acetil-D-glucosamina (Howard et al., 2003). Los resultados en este trabajo únicamente determinan la presencia o ausencia de actividad quitinolítica en bacterias, mas no se investigó con detalle el proceso de degradación. Se encontró actividad quitinolítica en bacterias de las clases Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, siendo ésta última la que más representantes quitinolíticos tuvo. Esta alta proporción se puede deber a la alta abundancia y diversidad

metabólica de los representantes de esta clase. La mineralización de la quitina, al igual que la celulosa, representa una entrada de energía y nutrientes en el bucle microbiano y, por lo tanto, al resto de la cadena trófica marina (Falkowski et al., 2008; Fenchel, 2008). La presencia de bacterias quitinolíticas en la columna de agua sugiere la participación de éstas en los procesos de mineralización en el océano.

Dentro de las enzimas que participan en la degradación de la MO marina, las lipasas y esterases mostraron ser abundantes y estar presentes en la mayoría de las cepas aisladas del Pacífico mexicano, con excepción de los Bacilli. Adicionalmente, las lipasas y esterases mostraron tener alta actividad a diferentes temperaturas, lo cual sugiere la participación potencial de bacterias pertenecientes a los órdenes Actinomycetales, Alteromonadales, Oceanospirilales, Pseudomonadales y Vibrionales en la mineralización de lípidos en el océano en un rango amplio de temperaturas. La temperatura de la zona de estudio osciló entre los 15°C y los 26°C, las cuales se corresponden al rango de temperaturas a las cuales hubo actividad lipolítica alta. Es decir, bacterias pertenecientes a órdenes mencionados pueden estar participando activamente en la degradación de lípidos en los primeros 100 m de profundidad en el Pacífico.

Por otro lado, las cepas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Idiomarina*, *Halomonas* y *Pseudoalteromonas* (Gammaproteobacteria) degradaron quitina y lípidos, lo cual las posiciona como importantes degradadores de MO en el medio marino por su participación potencial en la degradación de quitina y de ácidos grasos, respectivamente.

Las catalasas tienen importancia biológica en la defensa contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células (MacFaddin, 2003). En este trabajo, las catalasas estuvieron presentes en todas las cepas bacterianas, con excepción de una perteneciente al género *Photobacterium*. Esta cepa puede tener otro tipo de peroxidasas para evitar el estrés oxidante en lugar de catalasas. Las catalasas son solo un tipo específico de peroxidasas que reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin embargo, hay una gran variedad de peroxidasas capaces de realizar la misma acción (MacFaddin, 2003; Segal, 2011). La importancia aplicativa de estas enzimas yace en la fuerza de reacción en la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por ejemplo, la cepa perteneciente al género *Rhodococcus* tuvo una reacción violenta con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual significa que sus catalasas catalizan más eficientemente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por otro lado, la presencia de oxidasas en bacterias indica el tipo de respiración que el microorganismo posee (Contreras, 1999). Las bacterias oxidasa positivas son organismos aerobios y poseen al citocromo *c* como parte de su cadena respiratoria (Hausinger & Phillips, 2007; MacFaddin, 2003). Esta prueba fue positiva para las clases Bacilli, Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Sin embargo, no se encontraron en la clase Actinobacteria ni en el orden de los Vibrionales. Esto se puede deber a que estos organismos no poseen citocromo *c* oxidasa en su cadena transportadora de electrones o tienen algún otro mecanismo para obtener energía.

Hubo cepas que no presentaron actividad de oxidasas y catalasas. En general, las bacterias aerobias suelen ser positivas a esta prueba, ya que el O<sub>2</sub> es el último aceptor de electrones en el proceso de obtención de energía; y la presencia de catalasas está ligada con el metabolismo aerobio bacteriano porque estas enzimas participan en la degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que resulta de las reacciones metabólicas aerobias. Las Actinobacterias fueron negativas para esta prueba. Este resultado no necesariamente se relaciona con el metabolismo aerobio, sino a los elementos que componen la cadena transportadora de electrones, en la forma de obtención de energía y en los elementos que pueden estar interactuando con los componentes de la misma, por ejemplo, se sabe que en bacterias bioluminiscentes la emisión de luz está estrechamente relacionada con la cadena respiratoria, habiendo competencia entre la cadena respiratoria y el sistema luciferasa por el poder reductor (González-Lama y Díez del Pino, 1996). Solo la cepa perteneciente al género *Photobacterium* fue negativa para catalasas, lo que sugiere que este género no tiene un mecanismo contra el estrés por radicales libres o que tiene otras estrategias para contrarrestar la acción de esos radicales.

## XI. CONCLUSIONES

- a) La cantidad de O<sub>2</sub> disuelto en el transecto de Manzanillo fue menor que en los otros transectos. Es decir, la ZMO se presenta a profundidades más someras en Manzanillo que en Cabo corrientes y Maruata. Además, el O<sub>2</sub> en estaciones costeras fue menor y aumentó conforme aumenta la distancia a la costa, siendo las estaciones oceánicas las más ricas en O<sub>2</sub>.

- b)** Las estaciones costeras tuvieron picos más grandes de concentración de clorofila *a* que las estaciones oceánicas, reflejando una mayor actividad fototrófica en la costa debido a aguas ricas en nutrientes provenientes de posibles surgencias (en el caso de Cabo Corrientes) y de fuentes continentales.
- c)** En las tres profundidades estudiadas (5 m, máximo de clorofila y final de oxiclina) se aislaron representantes bacterianos pertenecientes a los principales grupos de bacterias heterótrofas marinas cultivables: Actinobacteria (*Actinomycetales*), Bacilli (*Bacillales*), Alphaproteobacteria (*Rhodobacterales* y *Sphingomonadales*), Gammaproteobacteria (*Alteromonadales*, *Oceanospirilales*, *Pseudomonadales* y *Vibrionales*).
- d)** Aunque no hubo diferencias significativas en la diversidad de bacterias heterótrofas cultivables entre las tres profundidades muestreadas, ésta fue mayor al final de la oxiclina, debido a que es una zona con una alta actividad biológica y donde convergen bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Por lo tanto, el O<sub>2</sub> podría ser un factor crucial en la distribución del bacterioplancton heterótrofo cultivable en el Pacífico tropical mexicano.
- e)** La composición bacteriana entre estaciones costeras y oceánicas fue diferente, sugiriendo una diferenciación de la composición en relación con las variables ambientales características de esas zonas.
- f)** Se encontraron cepas bacterianas con actividad enzimática sobre celulosa, quitina y lípidos lo que sugiere la participación potencial de estas bacterias en los procesos de mineralización de la MO en el Pacífico mexicano. Además, estas bacterias también tuvieron actividad enzimática en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y citocromo oxidasa, mostrando la importancia metabólica del oxígeno en estas bacterias.
- g)** La actividad enzimática en los procesos de mineralización depende del sustrato y de la temperatura. Las lipasas de las bacterias aisladas del Pacífico mexicano degradan mejor T20 (lípidos de cadenas cortas) que T80 (lípidos de cadenas largas) y lo hacen mejor a 30°C que a 17°C.

## XII. PERSPECTIVAS

- a) Determinar la diversidad bacteriana heterótrofa en la misma área de estudio con métodos no dependientes de cultivo para hacer una mejor estimación de la diversidad presente en el Pacífico tropical mexicano.
- b) Conocer la variación temporal de la diversidad bacteriana heterótrofa del Pacífico tropical mexicano realizando el mismo estudio en diferentes épocas del año, para relacionar los cambios en la composición bacteriana y los procesos de mineralización con variaciones temporales en el O<sub>2</sub> disuelto, temperatura, salinidad, presión y densidad.
- c) Ampliar el número de muestras a lo largo de la columna de agua, incluyendo muestras por debajo de la oxiclina, e incluso en sedimentos.
- d) Determinar la actividad enzimática bacteriana con técnicas como qPCR para estimar cuantitativamente la expresión de las enzimas en esa zona del Pacífico tropical mexicano. Una mejor estimación de los procesos de mineralización debe incluir más enzimas con importancia ecológica, como enzimas del metabolismo del C, tales como Rubisco I y II, citrato liasa dependiente de ATP, Piruvato:ferrodoxina oxidoreductasa y 2-oxoglutarato:ferrodoxina oxidoreductasa y sus genes *cbbL* y *cbbM*, *aclB*, *porAB* y *oorAB*, respectivamente. También sería importante incluir enzimas del ciclo del nitrógeno, como la nitrato reductasa, óxido nítrico reductasa, óxido nitroso reductasa y sus genes *nirS/nirK*, *norB*, *nosZ*, respectivamente.

## XIII. REFERENCIAS

- Arrigo KR. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437, 349-355.
- Asolkar RN, Jensen, PR, Kauffman CA, & Fenical W. (2006). Daryamides A-C, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1756–1759.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, et al. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(3), 257–263.

- Azam F, Malfatti F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 782-791.
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, et al. (Eds). (2015). *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer Netherlands. 933 pp.
- Bolhuis H, Cretoiu MS. (2016). What is so special about marine microorganisms? Introduction to the Marine Microbiome—From Diversity to Biotechnological Potential. In: Stal L., Cretoiu M. (Eds). *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*. Springer. pp. 3-20.
- Bollmann M, Bosch T, Colijn C, et al. (2010). *World Ocean Review. Living with oceans*. Hamburg: Maribus, 232 pp.
- Bozal N. (2003). Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1093–1100.
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl 1), 86–98.  
<http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Bruni V, Maugeri T, Alonzo V. (1982). Lipolytic activity of marine bacteria. Influence of NaCl and MgCl<sub>2</sub>. *Marine Biology*, 67(2), 113–119.
- Buchan A, Gonzalez JM, Moran MA. (2005). Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10), 5665-5677.
- Calderón-Patrón J, Moreno C, Zuria I. (2012). La diversidad beta: medio siglo de avances. *Rev. Mex. Biodivers.*, 83, 879–891.
- Chisholm SW. (1992). Phytoplankton size. In: Falkowski PG, Woodhead AD. (Eds). *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum. pp 213–238.
- Ciccarelli F, Doerks T, von Mering C, et al. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311, 1283–1287.
- Clarke K & Gorley R. (2015). *PrimeR v7: User manual/tutorial*. Plymouth: PRIMER-E.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42: D633–D642.
- Colwell R. (1997). Microbial biodiversity and biotechnology. In Reaka-Kudla ML, Wilson DE, Wilson EO. (Eds). *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological*

- Resources Washington (DC): National Academy Press. pp 279-288.
- Contreras, M. (1999). Propiedades moleculares y catalíticas de la citocromo oxidasa en *Bacillus cereus*. UNAM.
- Costa-Ramos C, & Rowley AF. (2004). Effect of Extracellular Products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the Edible Crab Cancer pagurus. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 729–735.
- Das S, Lyla PS, Khan SA. (2006). Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10), 1325–1335.
- Decker SR, Adney WS, Jennings E, et al. (2003). Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Appl Biochem and Biotech*, 105- 108: 689-703.
- Ducklow HW. (1983). Production and Fate of Bacteria in the Oceans. *BioScience*, 33(8), 494.
- El-Hajj ZW, Allcock D, Tryfona T, et al. (2010). Insights into piezophily from genetic studies on the deep-sea bacterium, *Photobacterium profundum* SS9. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1189, 143–148.
- Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034–1039.
- Falkowski P. (2012). Ocean Science: The power of plankton. *Nature*. 483, S17-S20.
- Fenchel T. (2008). The microbial loop - 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366(1–2), 99–103.
- Fuhrman JA, Steele JA. (2008). Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks and relationships to function aquat. *Microb. Ecol.* 53, 69–81.
- Gallo ND, Levin, LA. (2016). Fish ecology and evolution in the world's oxygen minimum zones and implications of ocean deoxygenation. In *Advances in Marine Biology*, 74: 117-198.
- Giovannoni SJ, Stingl U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, 437 (7057), 343-348.
- Gliessman SR. (2002). Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible, Turrialba, LITOCAT.
- González-Lama Z y Díez del Pino A. (1996). Superóxido dismutasa y catalasa en bacterias bioluminiscentes marinas. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 12 (2). 131-137.
- Goodfellow M, Haynes JA. (1984). Actinomycetes in marine sediments. In Oritz-Oritz L,



- Bojalil LF, Yokoleff V. (Eds) Biological, Biochemical and Biomedical aspects of Actinomycetes. Academic press, Orlando, pp 453-472.
- Gotelli N, Ellison A. (2018). A primer of ecological statistics. Second Ed. Sinauer Associates. 614 pp.
- Gregory E, Kowalski J, Holdeman L. (1977). Production and some properties of catalase and superoxide dismutase from the anaerobe *Bacteroides distasonis*. *Bacteriology*, 129(3), 1298–1302.
- Guerinot ML, West P, Lee JV, et al. (1982). *Vibrio diazotrophicus* sp. nov., a Marine Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3), 350–357.
- Hada HS, West P, Lee, JV, et al. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 1–4.
- Harayama S, Kasai H. (2006). Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In Stackebrandt E. (Ed). *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Hausinger, R., & Phillips, A. (2007). Enzymatic Activity. In C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. A. Marzluf, T. M. Schmidt, & L. R. Snyder (Eds.), *Methods for general and molecular microbiology* (3th ed). ASM Prees, Washington (DC) pp. 504–526.
- Hawksworth DL, Colwell R. (1992). Biodiversity amongst microorganisms and its relevance. *Biodivers Conserv*, 1, 221–345.
- Hedges J, Oades JM. (1997). Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Org. Geochem*, 27, 319–361.
- Heip C, Herman P, Soetaert K. (1998). Indices of diversity and evenness. *Oceanis*, 24(4), 61–87.
- Helly J, Levin L. (2004). Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep Sea Res*, 51, 1159–1168.
- Hendricks CW, Doyle JD, Hugley B, et al. (1995). A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *61*(5), 2016–2019.
- Himmel ME, Baker JO, Adney WS, Decker SR. (2007). Cellulases , Hemicellulases , and Pectinases. In T.Reddy, T. Beveridge, J. Breznak, G. Marzluf (Eds). *Methods for general and molecular microbiology* (3th ed.) ASM Prees, Washington (DC) pp. 504–

- Howard MB, Ekborg NA, Weiner RM, Hutcheson SW. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 627–635.
- Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, et al.(2011). Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Molecular and Cellular Probes*, 25(4), 174–176.
- Jiang G, & Zhang BB. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 284(4), E671–E678.
- Kamykowski D & Zentara S. (1990). Hypoxia in the world ocean as recorded in the historical data set. *Deep Sea Res*, 37, 1861–1674.
- Kirchman, D. L. (2008). Introduction and overview. In D. L. Kirchman (Ed.), *Microbial ecology of the oceans*. 2nd ed. Wiley Blackwell, pp. 1–26.
- Kovacs N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178(4535), 703.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. pp. 115–175.
- Lo Giudice A, Michaud L, De Pascale D, et al. (2006). Lipolytic activity of Antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1039–1048.
- Lucena, T. (2012). Biodiversidad bacteriana marina: nuevos taxones cultivables. Tesis de doctorado en Biotecnología, Universidad de Valencia, España.
- MacFaddin JF. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3ra ed.). Medica Panamericana.
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, et al.(2015). *Brock Biology of Microorganisms*, 14th Edition. Pearson Education. USA.
- Mandels, M., & Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Cellulases and Their Applications*, 95, 391–414.
- Manivasagan P, Kang KH, Sivakumar K, et al. (2014). Marine actinobacteria: An important

- source of bioactive natural products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 38 (1), 172-188.
- Margesin R & Schinner F. (1994). Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *Biotechnology*, 33, 1–14.
- Medina-Silva, R, R. de Oliveira R, Pivel M, et al. (2018). Microbial diversity from chlorophyll maximum, oxygen minimum and bottom zones in the southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Marine Systems*, 178, 52–61.
- Mihrianyan A. (2011). Cellulose from Cladophorales green algae: from environmental problem to high-tech composite material. *Applied Polymer Science*, 119, 2449–2460.
- Moran MA. (2015). The global ocean microbiome. *Science*. 350 (6266), aac8455-aac8455.
- Muñoz, C., Hidalgo, C., Zapata, M., Jeison, D., Riquelme, C., & Rivas, M. (2014). Use of Cellulolytic Marine Bacteria for Enzymatic Pretreatment in Microalgal Biogas Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(14), 4199–4206.
- Neuer S, Iversen M, Fischer G. (2014). The Ocean's Biological Carbon pump as part of the global Carbon Cycle. *Limnology and Oceanography E-Lectures*, 4(4), 1–51.
- Oliver JD. (1982). Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep Sea Res*, 29, 795–798.
- Overmann J. (2010). Novel cultivation strategies for environmentally important microorganisms. Chapter 3. In: Barton, L., Mandl, M., Loy, A. (Eds) *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer Netherlands. pp. 69-89.
- Pacha RE & Kiehn ED. (1969). Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish: physiology, serology, and epidemiology. *Journal of Bacteriology*, 100(3), 1242–1247.
- Pandey A, Sailas B, Soccol C, et al. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Applied Biochem*, 29, 119–131.
- Paulmier A & Ruiz-Pino D. (2009). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Prog Oceanogr*, 80, 113–128.
- Peña, Carlos. (2011). Metodos de inferencia filogenetica. *Rev. peru. biol.* 18 (2): 265-267.
- Pereira Brandini F, Nogueira M, Simião M, et al. (2014). Deep chlorophyll maximum and plankton community response to oceanic bottom intrusions on the continental shelf in the South Brazilian Bight. *Continental Shelf Research*, 89, 61–75.

- Pommier T, Canback B, Riemann L, et al. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol*. 16 (4), 867-880.
- R Development Core Team. (2015). R Internals. *R Development Core Team*, 1, 63.
- Rastogi G y Sani R. (2011). Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. En Ahmad et al. (eds.), *Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications*. Springer, New York, NY, pp. 29-57.
- Ratledge C. (2008). Microbial Lipids. In Rehm H, Reed G. *Biotechnology: Second Edition*. 7-12, pp. 133-197.
- Renner MK, Shen Y, Cheng X, et al. (1999). Cyclomarins A-C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *Journal of the American Chemical Society*, 121(49), 11273-11276.
- Riedlinger J, Reicke A, Zähler H, et al. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *The Journal of Antibiotics*, 57(4), 271-279.
- Rodicio MDR & Mendoza MDC. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez P & Vázquez-Domínguez E. (2003). Escalas y diversidad de especies. En Morrone JJ y Llorente-Bousquets J. (Eds). *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp 109-114.
- Rogers AD. (2000). The role of the oceanic oxygen minima in generating biodiversity in the deep sea. *Deep Sea Res*, 47, 119-148.
- Romero F, Espliego F, Pérez Baz J, et al. (1997). Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 50(9), 734-737.
- Saitou N & Nei M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo*, 4(4), 406-425.
- Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, et al. (1998). Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3397-3402.

- Schlitzer R. (2016). Ocean Data View. Retrieved from <https://odv.awi.de>
- Schneider, T., & Riedel, K. (2010). Environmental Proteomics: Studying Structure and Function of Microbial Communities. In L. Barton, M. Mandl, & A. Loy (Eds.), *Geomicrobiology: molecular and environmental perspective*. Springer Netherlands, pp 91-108.
- Segal, C. A. (2011). Las catalasas de *Debaryomyces hansenii*: Análisis de su expresión. Tesis, UNAM.
- Sherr, E., & Sherr, B. (2008). Understanding roles of microbes in marine pelagic food webs : A brief history. In Kirchman D (Eds). *Microbial ecology of the oceans*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, New York, NY, pp. 27–44.
- Sierra, G. (1956). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23(1), 15–22.
- Signoret M, Monreal-Gómez MA, Aldeco J, Salas-de-León DA. (2006). Hydrography, oxygen saturation, suspended particulate matter, and chlorophyll-a fluorescence in an oceanic region under freshwater influence. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69(1–2), 153–164.
- Sosa V. (2011). Diversidad de linajes de bacterias cultivables en dos comunidades contrastantes en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Tesis Licenciatura, UNAM.
- Staley JT & Konopka A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.*, 39, 321–46.
- StatSoft, I. (2012). STATISTICA. Tulsa, OK, USA. Retrieved from <http://www.statsoft.com>
- Sunagawa S, et al.(2015). Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*. 348 (6237), 1261359-1261359
- Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, et al. (2001). Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *Biosci Bioeng*, 92, 144–148.
- Tarn J, Peoples L, Hardy K, et al. (2016). Identification of Free-living and Particle-Associated microbial communities present in Hadal regions of the Mariana trench. *Front Microbiol*, 7, 665.
- Teather RM & Wood PJ. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.

- Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780.
- Thieman, W., & Palladino, M. (2012). *Introduction to Biotechnology* (3er ed.). Benjamin Cummings. San Francisco. pp 416.
- Tsujibo H, Orikoshi H, Shiotani K, et al. (1998). Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 472–478.
- Tsujibo H, Yukio Y, Katsushiro M, et al. (1992). Purification properties and partial amino acid sequence of chitinase from marine alteromonas sp, strain O-7. *Microbiology*, 38, 891–897.
- Vijayakumar AD, Murugesan S, Jayapal J, et al. (2014). A Rapid Sensitive Detection Method by Plate Assay for Catalase Activity from. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 33–36.
- Wakeman S. (1987). Steroid geochemistry in the oxygen minimum zone of the eastern tropical North Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica*, 51, 3051–3069.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM & Cole JR. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37, 463–464.
- Wei SL & Young RE. (1989). Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes*. *Marine Biology*, 103(4), 541–546.
- Whitman WB, Coleman DC & Wiebe WJ. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583.
- Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, et al. (2010). Phylogeny of gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2305–2314.
- Williams PG, Miller ED, Asolkar RN, et al. (2007). Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of Organic Chemistry*, 72(14), 5025–5034.
- Woese C, Kandler O & Wheelis M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579.

- Wu SJ, Fotso S, Li F, et al. (2006). N-carboxamido-staurosporine and selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)*, 59(6), 331–337.
- Zheng B, Wang L & Liu L. (2014). Bacterial community structure and its regulating factors in the intertidal sediment along the Liaodong Bay of Bohai Sea, China. *Microbiological Research*, 169, 585–592.

## **XIV. ANEXOS**

### **ANEXO I:**

#### *MEDIOS DE CULTIVO USADOS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS*

Medio LB-marino (mLB)

Para preparar 1 L de mLB se usó caldo Luria Bertani comercial (25 g), agar bacteriano (15 g), agua marina artificial (35 g) y las siguientes sales:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (15 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (50 mg),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1 g),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (15 mg),  $\text{NaCl}$  (12 g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (30 g) y  $\text{CaCl}_2$  (2 g).

Medio Nutritivo-marino (mN)

Para preparar 1 L de mN se usó agar nutritivo comercial (23 g), agua marina artificial (35 g) y sales adicionales:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.5 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (50 mg) y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (15 mg).

Medio Marino (mM)

El medio mM es comercial y se preparó según las indicaciones del fabricante.

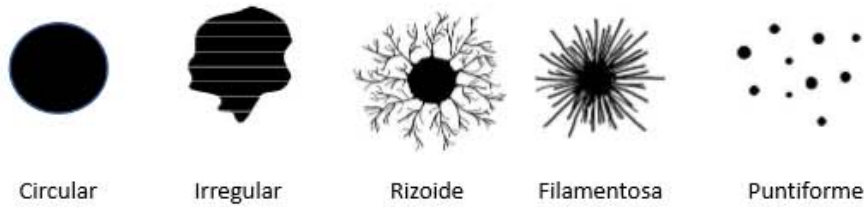


**ANEXO II:**  
**CLAVE MORFOLÓGICA**

**TAMAÑO:**



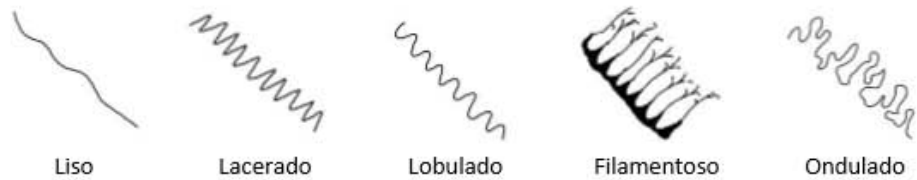
**FORMA:**



**ELEVACIÓN:**



**BORDE:**



**ESTRUCTURA:**



**COLOR:** Incolora o coloreada

**ANEXO III:  
PRUEBAS ENZIMÁTICAS**

Realizar estos protocolos en las condiciones asépticas adecuadas, dentro de una campana de flujo laminar.

**CELULASAS**

**FUNDAMENTO**

Hay dos aproximaciones al ensayo de actividad de celulasas: uno basado en la medición individual de las enzimas involucradas, y otro basado en medir la actividad total del complejo enzimático (Sharrock, 1988). La actividad total de celulasas puede ser detectada por unión diferencial de colorante en pequeñas concentraciones (0.002% p/v) de celulosa microcristalina soluble (Himmel et al., 2007). Entre los colorantes usados destaca el rojo Congo, que interactúa fuertemente con polisacáridos con uniones del tipo  $\beta$ -(1,4) (Teather & Wood, 1982), por lo tanto, puede evidenciar la hidrólisis de un amplio rango de celulasas (endoglucanasas y exoglucanasas, pero limitadamente la actividad de exoglucanasasendodependientes y B-glucosidasas). El rojo Congo es un colorante aniónico que interactúa con polisacáridos de cinco o más unidades de residuos de glucosa, además, su uso aumenta el contraste permitiendo el uso de concentraciones muy bajas del sustrato y de esta manera se genera un decremento en el tiempo requerido para detectar niveles bajos de actividad de celulasas (Sharrock, 1988). Este colorante permite la visualización de celulosa degradada, evidenciando la actividad de celulasas en cultivos sólidos (Sharrock, 1988).

Para la detección cualitativa de colonias bacterianas con actividad celulolítica se seguirá el método propuesto por Teather y Wood (1982), con algunas modificaciones para asegurar el crecimiento de bacterias marinas, respaldadas por los trabajos de Tsujibo y colaboradores (Tsujibo, 1992; Tsujibo et al., 1998).

**MATERIAL Y EQUIPO**

- 2 Frascos para almacenamiento de soluciones de 500 mL (Rojo Congo y NaCl).
- 2 Vasos de precipitados de 500 mL, probeta volumétrica y matraz Erlenmeyer 2 L.
- Asas bacteriológicas.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Cinta testigo.
- Incubadora.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Placas Petri.
- Plancha de calentamiento y agitación y agitadores.
- Torundas.

**REACTIVOS**

- Medio de cultivo Agar sólido Carboximetilcelulosa (CMC) 1% (p/v)

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Carboximetilcelulosa	10.0
Extracto de levadura	2.5

Peptona universal	2.5
Sulfato de amonio	0.5
Cloruro de calcio	0.5
Fosfato monobásico de potasio	0.1
Fosfato dibásico de potasio	0.1
Agar	15.0

- Sales marinas

Sal	Cantidad
Nitrato de amonio	15 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg/L
Sulfato de sodio	1 g/L
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	15 mg/L
NaCl	12 g/L
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	30 g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g/L

- Reactivos para el revelado de halos de actividad enzimática

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Rojo Congo 0.1 % (p/v)	1.0
NaCl 1 M	58.5

## MÉTODO

El medio se prepara de acuerdo a las cantidades indicadas. Se autoclava a 121°C por 20 minutos. Se inocula con las cepas de interés y se incuba a 30°C (temperatura de incubación a la que crecieron y aislaron las cepas de este estudio), por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se añade al medio de cultivo una solución de rojo Congo 0.1% (p/v) suficiente que bañe el medio, se incuba a temperatura ambiente por 15 min. Se elimina el exceso y se adiciona una solución de NaCl 1 M, que igualmente cubra el medio. Se incuba nuevamente a temperatura ambiente durante 15 min. Si se desea estabilizar los halos de hidrólisis, se agrega HCl 1 M, así el color cambia de rojo a azul y se inhibe la actividad enzimática (Teather & Wood, 1982). La prueba es confirmativa al observar halos claros alrededor de la zona de crecimiento bacteriana.

NOTA: Dependiendo del grupo bacteriano, la generación de zonas de aclaramiento puede ser más rápido o tardar más tiempo en hacerse visibles. Se recomienda el vaciado con rojo Congo y NaCl de forma cuidadosa para no desprender las colonias del medio y no generar falsos positivos.

## QUITINASAS

### FUNDAMENTO

En muchos sistemas quitinólicos, la quitina es hidrolizada por quitin-despolimerasas. En medios sólidos, estas enzimas pueden propagarse, evidenciando su actividad mediante zonas de aclaramiento alrededor de las áreas de crecimiento bacteriano (Howard et al., 2003). Se han desarrollado métodos, donde se adicionan colorantes que interactúan con este biopolímero para lograr una mejor visualización de las zonas de aclaramiento (zonas con quitina despolimerizada) (Somers et al., 1987). Hay varios métodos propuestos para determinar

cualitativamente la actividad de quitinasas en medios sólidos. La base de la mayoría es la presencia de quitina en combinación con agar, y el cambio de color del medio en zonas donde la quitina haya sido despolimerizada (Howard et al., 2003).

## MATERIAL Y EQUIPO

- Asas bacteriológicas.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Cinta testigo.
- Incubadora.
- Matraz Erlenmeyer 2 L y probeta volumétrica.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Placas Petri.
- Plancha de calentamiento y agitación y agitadores.
- Torundas.
- Mortero y pistilo.

## MEDIO DE CULTIVO

- Agar EGC

Ingrediente	Cantidad
Quitina etilenglicol (EGC) Quitosanetilenglicol	0.4 %
Azul tripano	0.01 %
Agar	15 g/L

- Sales

Sal	Cantidad
Nitrato de amonio	15 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg/L
Sulfato de sodio	1 g/L
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	15 mg/L
NaCl	12 g/L
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	30 g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 g/L

NOTA: Se pueden usar medios comerciales como ChitinAzure (Sigma, C 3020), elaborados al unir covalentemente un colorante soluble a quitina coloidal. Cuando la quitina es despolimerizada, aparecen halos blancos alrededor de las colonias (Howard et al., 2003).

## MÉTODO

La EGC es una forma soluble de la quitina. Este compuesto debe ser macerado antes de disolverse en agua. Se debe moler con un mortero y pistilo para facilitar su suspensión en agua. Se mezcla el azul tripano con la EGC y se autoclava. Después se mezcla con agar (ya con las sales) estéril. Se vacía en cajas Petri y se incuba a 30°C

por el tiempo necesario para el crecimiento bacteriano. La prueba es confirmativa si halos claros aparecen alrededor del área de crecimiento bacteriano (Howard et al., 2003).

## CATALASAS

### FUNDAMENTO

Hay tres tipos principales de enzimas que intervienen en la degradación biológica del  $H_2O_2$  en microorganismos aerobios y aerotolerantes: SOD (1), que convierte el  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , además de catalasas (2) y peroxidasas (3) que catalizan el  $H_2O_2$  y liberan  $H_2O$  y  $O_2$ . Como subproducto de la actividad de estas enzimas se produce  $O_2$ . El  $O_2$  tiene forma gaseosa, por lo tanto, la formación de burbujas al realizar la prueba evidencia la presencia y acción de dichas enzimas (MacFaddin, 2003; Segal, 2011).

### MATERIALES Y EQUIPO

- Frasco ámbar para almacenamiento de  $H_2O_2$  al 30% de 250 mL.
- Vaso de precipitados de 250 mL.
- Asas bacteriológicas de cromo-níquel.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Cinta testigo.
- Incubadora.
- Matraz Erlenmeyer 2 L y probeta volumétrica.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Placas Petri.
- Plancha de calentamiento y agitación y agitadores.
- Torundas.

### REACTIVOS

- $H_2O_2$  al 30% (no exponer a la luz, mantener en frasco oscuro y a 4°C).

Medios de cultivo usados para esta prueba (las colonias desarrolladas en estos medios se pueden usar también en el ensayo de oxidasas y lipasas).

- Medio marino

Ingrediente	Cantidad
Agar marino	Indicación del fabricante

- Medio LB

Ingrediente	Cantidad
Caldo LB	Indicación del fabricante
Agua marina artificial	Indicación del fabricante
Agar bacteriano	Indicación del fabricante
Nitrato de amonio	15 mg/L
$K_2HPO_4$	50 mg/L

Sulfato de sodio	1 g/L
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	15 mg/L
NaCl	12 g/L
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	30 g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 g/L

- Medio nutritivo

Ingrediente	Cantidad
Agar nutritivo	Indicación del fabricante
Agua marina artificial	Indicación del fabricante
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g/0.8 L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg/ 0.8 L
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	15 mg/0.8 L

## MÉTODO

Preparar los medios de cultivo, inocular con las colonias a realizar el ensayo e incubar por 30°C durante 18-24 h. Con un asa bacteriológica tomar una buena cantidad de un cultivo y colocar sobre un portaobjetos limpio. Agregar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% con una pipeta Pasteur. La prueba se considera positiva si se observa un burbujeo inmediato, el cual corresponde al O<sub>2</sub> producido por las enzimas. La prueba se puede realizar directamente sobre las colonias en el agar (MacFaddin, 2003).

El inóculo para realizar la prueba debe ser denso. No invertir el orden del procedimiento, agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al inóculo, y no al revés. El metal del asa de siembra si no es de cromo-níquel puede dar un falso positivo. Para evitar falsos positivos se debe agitar suavemente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> justo antes de su uso. Para evitar falsos negativos se debe hacer una prueba de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre agar sangre para asegurar que no esté degradado. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es altamente corrosivo, en caso necesario este reactivo se neutraliza con etanol al 70%. (MacFaddin, 2003).

## OXIDASAS

### FUNDAMENTO

Los citocromos son hemoproteínas que participan en la cadena transportadora de electrones (Prescott, 2003). Se conocen cuatro pigmentos bacterianos con actividad de citocromo oxidasa: citocromo *a1*, citocromo *a2*, citocromo *a3* y citocromo *o*. Estos pigmentos tienen átomos de hierro, que varían en sus valencias entre Fe<sup>3+</sup> y Fe<sup>2+</sup> durante la oxidación y la reducción, y átomos de Cu<sup>2+</sup> asociados a la actividad del citocromo oxidasa y la reacción de electrones con el O<sub>2</sub> (MacFaddin, 2003).

Las bacterias en presencia de O<sub>2</sub>, citocromo *c* y un reactivo para oxidasa, oxidan el reactivo a un compuesto coloreado. Los electrones provenientes del citocromo *c* son captados por el citocromo oxidasa, que los transfiere a una molécula de O<sub>2</sub>. La *p*-fenilendiamina y el indofenol son colorantes que actúan como aceptores y dadores de electrones en la cadena respiratoria. Estos sustratos artificiales pueden ser sustituidos por los aceptores naturales de electrones en cualquier parte dentro de la cadena de transporte de electrones donde se reduce el sistema citocromo oxidasa. Por lo tanto, la prueba determina la presencia de citocromo *c* en microorganismos que lo tienen como parte de su cadena respiratoria, dando un producto final coloreado (MacFaddin, 2003).

### MATERIALES Y EQUIPO

- Frascos ámbar para almacenamiento de reactivos
- Vasos de precipitados de 250 mL.
- Asas bacteriológicas de platino (No usar material de cromo-níquel).
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Cinta testigo.
- Incubadora.
- Probeta volumétrica.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Placas Petri.
- Plancha de calentamiento y agitación y agitadores.

## REACTIVOS

Se presentan varios métodos para determinar la actividad de oxidasa. Todos se basan en una reacción de óxido-reducción que genera un cambio de color en presencia del citocromo oxidasa.

### 1) Reactivo de Kovacs (Kovacs, 1956).

Toxicidad baja, mayor sensibilidad que compuesto de dimetil. Colonias positivas de color lavanda, que se torna púrpura oscuro. Tiñe el medio circundante.

Ingrediente	Cantidad
Diclorhidrato de tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina (TPD) (diclorhidrato de <i>N,N,N,N</i> -tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina)	1% o 0.5% (p/v) (solución incolora)

### 2) Reactivos de Gaby y Hadley (Gaby & Hadley, 1928), modificación de Ewing y Johnson (Ewing & Johnson, 1960). También se le denomina como reactivo de indofenol oxidasa. “Nadi” = Naftol y diamina.

Ingrediente	Cantidad
$\alpha$ -naftol	1 % (en etanol al 95%)
Monoclorhidrato de <i>p</i> -aminodimetilanilna (oxalato) / oxalato de dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina)	1 % (en agua)

### 3) Reactivo de Carpenter, Suhrland y Morrison (CM, Suhrland, & Morrison, 1947).

Altamente estable. Menos soluble pero el calentamiento suave lo solubiliza. No forma precipitados oscuros.

Ingrediente	Cantidad
Oxalato de <i>p</i> -aminodimetilanilina	1 % (p/v)

### 4) Reactivo de Gordon y McLeod (Gordon & McLeod, 1928; Steel, 1961).

Compuesto de mayor estabilidad que el compuesto de tetrametil.

Ingrediente	Cantidad
Clorhidrato de dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina/ monoclorhidrato (HCl) de <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -	1-1.5% (p/v)

fenilendiamina/ monoclóhidrato de <i>p</i> -aminodimetilanilina	
---	--

Nota: Para su conservación, almacenar a 4°C y entibiar los reactivos antes de su uso. Se recomienda congelarlos a -20°C en alícuotas de 1 y 2 mL y descongelar 3-4 h antes de su uso. Todos los reactivos deben ser preparados justo antes de su uso ya que en solución pierden reactividad. No usar medios con glucosa, ya que la fermentación inhibe la actividad de oxidasa.

## MÉTODO

Para no sembrar más cajas con medio de cultivo, se pueden usar las colonias crecidas en los medios de la prueba de catalasas.

Preparación de reactivos:

1. Disolver 1 g del reactivo deseado en menos de 100 mL de agua destilada (a excepción del *a*-naftol, disolver en menos de 100 mL de etanol al 95 %).
2. Calentar la solución lentamente.
3. Transferir a un matraz o frasco volumétrico y aforar a 100 mL con el disolvente que corresponda.
4. Incubar por 15 min a temperatura ambiente antes de usar.
5. Almacenar en un frasco oscuro con tapa. No exponer a la luz y etiquetar correctamente.

Uso en:

- a) Pico de flauta. Indofenol Reactivos de Gaby y Hadley (Gaby & Hadley, 1928).
  - i) Inocular las colonias de interés en agar nutritivo en pico de flauta por 18-24 horas (no incubar por más tiempo).
  - ii) Agregar 2-3 gotas de cada reactivo al pico de flauta. Mezclar inclinando el tubo, cubriendo el crecimiento bacteriano.
  - iii) Se observa un cambio de color azul a los dos minutos.
- b) Placa. Demás reactivos.
  - i) Agregar 2-3 gotas del reactivo directo a colonias de interés.
  - ii) No inundar totalmente la placa con el reactivo. Debe haber exposición a O<sub>2</sub>.
  - iii) Tiempo de cambio de color:
    - (1) Kovacs (Kovacs, 1956): 10-15 s de reacción.
      - (a) Alternativamente se puede usar este reactivo sobre papel filtro del no. 1 (Whatman) de 6 cm<sup>2</sup> en una placa Petri. Se agregan 2 o 3 gotas del reactivo en el centro del papel y con una aguja de inoculación de platino se toma una asada de colonia y se hace una línea sobre el papel de 3-6 cm de longitud. Reacción positiva ocurre de 5 a 10 s.
      - (b) El método anterior puede realizarse también con el reactivo de Gaby y Hadley (1928): Oxalato de dimetil-*p*-fenilendiamina al 1%.
    - (2) Gordon y McLeod (Gordon & McLeod, 1928): 10-30 min de reacción.



Interpretación de resultados:

El cambio de color es de rosa a rojo oscuro y por último el púrpura oscuro denota un resultado positivo. Cuando se usa azul de indofenol un resultado positivo se denota por un color azul en 1 a 2 min. Cuando la prueba es negativa no hay cambios de color en las colonias o máximo se percibe un color rosa pálido debido al reactivo. A veces puede ocurrir un cambio de coloración al negro en el medio circundante. Con el reactivo de Kovacs un resultado positivo se denota por un color púrpura oscuro en 10 s. Si el cambio de color ocurre a los 60 s se toma como negativo según Steel (MacFaddin, 2003; Steel, 1961).

Notas: Usar material de platino, porque las aleaciones cromo-níquel pueden oxidar el reactivo de fenildiamina, generando un falso positivo. El cambio de color negro en un falso negativo ocurre alrededor de las colonias, no sobre ellas. Se puede agregar ácido ascórbico al 0.1 % a los reactivos para evitar la oxidación del mismo y aumentar su vida útil. Si se forma algún precipitado se recomienda desechar el reactivo. No exponer a la luz. El reactivo de Kovacs debe ser incoloro. Respetar los tiempos de cambio de color, exceder los mismos puede generar falsos positivos a causa de la oxidación del reactivo. Al usar indofenol ignorar reacciones de color después de los 2 min para evitar falsos positivos. Las colonias deben estar expuestas a O<sub>2</sub> si no, no habrá oxidación (MacFaddin, 2003).

## **LIPASAS Y ESTERASAS**

### **FUNDAMENTO**

Los “tween” son ésteres pesados solubles en agua derivados de un polioxialquileo de sorbitano, y difieren entre sí por el ácido graso que lo constituye. El tween 20 (éster de ácido láurico), tween 40 (éster de ácido palmítico), tween 60 (éster de ácido esteárico) y tween 80 (éster de ácido oléico) son ácidos grasos que se usan para detectar la actividad de esterasas, los cuales son mono-ésteres de ácidos grasos. Para detectar la actividad de lipasas los sustratos generalmente usados son trioleína, tributirina y tween 85 (triéster sintético de ácido oléico) (Bruni, Maugeri, & Alonzo, 1982; Lo Giudice et al., 2006; Sierra, 1956; Tindall, Sikorski, Smibert, & Krieg, 2007).

Con este método se detecta primariamente la hidrólisis de cadenas largas de ácidos grasos unidas con enlaces del tipo éster, y en segundo plano se detecta si esos ácidos grasos catalizados son metabolizados. Cuando un halo opaco aparece alrededor del área de crecimiento colonial se forman cristales de sales de calcio de ácidos grasos debido a la actividad de estas enzimas. Si esos ácidos grasos son metabolizados, las sales de calcio pueden desaparecer o formar un halo por debajo del área de crecimiento bacteriano (Tindall et al., 2007). Microscópicamente los cristales producidos difieren en forma dependiendo el ácido graso que lo constituye (Sierra, 1956).

### **MATERIALES Y EQUIPO**

- Asas bacteriológicas de platino (no usar material de cromo-níquel).
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Cinta testigo.
- Incubadora.

- Probeta volumétrica.
- Mechero.
- Papel aluminio.
- Placas Petri.
- Plancha de calentamiento y agitación y agitadores.

## REACTIVOS

Medio basal (Sierra, 1956).

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Bacto peptona	10.0 g ó 1% (p/v)
NaCl	5.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.1 g ó 0.01% (p/v)
Bacto agar	20 g ó 2% (p/v)
Tween 20,40, 60 y 80	10 g ó 1% (p/v)
Tributirin (1,2,3-Tributyrylglycerol, Glycerol tributryate, Glyceryl tributryate)	2.5 g ó 0.25% (p/v)
Triolein (Octadecenoic acid 1,2,3-propanetriyl ester, 1,2,3-Tri( <i>cis</i> -9-octadecenoyl)glycerol, Glycerol trioleate, Glycerol triolein, Glyceryl trioleate, Oleic acid triglyceride, Oleic triglyceride)	2.0 g ó 0.2% (p/v)
Tween 85	2.0 g ó 0.2% (p/v)

El método propuesto por Sierra, (1956) ha sido modificado para determinar la actividad lipolítica en bacterias marinas al agregar sales, usar agua marina artificial y/o natural (Lo Giudice et al., 2006).

Sales y medios usados:

- Medio marino

Ingrediente	Cantidad
Agar marino	Indicación del fabricante

Nota: Este medio ya tiene agar, evitar agregar el agar correspondiente al medio basal de Sierra.

- Medio LB

Ingrediente	Cantidad
Caldo LB	Indicación del fabricante
Agua marina artificial	Indicación del fabricante
Nitrato de amonio	15 mg/ L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mg/L
Sulfato de sodio	1 g/L
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	15 mg/L
NaCl	12 g/L
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	30 g/L
CaCl <sub>2</sub>	2 g/L

- Medio nutritivo

Ingrediente	Cantidad
Agar nutritivo	Indicación del fabricante
Agua marina artificial	Indicación del fabricante
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g/0.8 L

$K_2HPO_4$	50 mg/ 0.8 L
$FeSO_4(7H_2O)$	15 mg/0.8 L

## MÉTODO

Para detectar la presencia de lipasas y estererasas se va a seguir el método de Sierra (Sierra, 1956) con las modificaciones de Giudice y Bruni (Bruni et al., 1982; Lo Giudice et al., 2006).

Se debe preparar el medio basal, agregar el medio y las sales correspondientes al medio en el cual las bacterias fueron aisladas, y esterilizar a 121°C por 20 min. Aparte se debe esterilizar individualmente cada uno de los tweens (hacer cálculos para obtener una concentración final de 1% o 0.2 %, dependiendo del ácido graso). En una campana de flujo laminar, cuando el medio sea manipulable y no queme al tacto, se debe mezclar con cada uno de los ácidos grasos. Agitar el medio hasta que los ácidos grasos estén completamente integrados. Vaciar en cajas Petri y rotular. Inocular pinchando el medio con una aguja de platino. Usar cultivos de 18-20 h. Incubar las cajas a 30°C y 17 °C (temperatura en la que se desarrollan mejor los halos de crecimiento), y monitorear cada 1, 3, 5, 7, 10 y 14 días. El ensayo se considera positivo si un halo opaco/claro se forma alrededor de las colonias. De acuerdo a Lo Curto (Lo Curto, 1966). el diámetro total menos el diámetro de la colonia se considera proporcional a la actividad lipolítica bacteriana presente. Realizar el ensayo por duplicado (Bruni et al., 1982; Lo Giudice et al., 2006; Sierra, 1956; Tindall et al., 2007).

**ANEXO IV:**  
TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla S1.** Variables ambientales medidas para cada estación. En las filas se encuentran las estaciones con sus tres profundidades relativas para cada muestra: 5 m (1), máximo de clorofila (2) y final de la oxiclina (3).

Estación	Oxígeno [μmol/kg]	Temperatura (°C)	Fluorescencia [mg/m <sup>3</sup> ]	Salinidad [PSU]	Presión [psi]	Densidad [kg/m <sup>3</sup> ]
E5-1	100.80	19.61	1.65	34.71	7.30	24.64
E5-2	99.24	19.61	1.78	34.71	14.59	24.64
E5-3	22.64	17.04	0.00	34.82	43.78	25.37
E6-1	200.51	25.93	0.01	34.51	5.52	22.68
E6-2	37.96	18.06	0.18	34.72	40.71	25.05
E6-3	13.78	16.56	0.05	34.67	60.80	25.37
E7-1	202.30	25.55	0.00	34.57	5.53	22.85
E7-2	183.60	22.52	0.03	34.58	35.65	23.76
E7-3	75.83	18.97	0.04	34.56	60.84	24.69
E9-1	201.5	25.31	0.00	34.52	5.57	22.88
E9-2	191.85	22.79	0.06	34.49	50.80	23.61
E9-3	56.53	18.69	0.03	34.55	81.06	24.75
E20-1	198.37	25.85	0.00	34.39	5.23	22.62
E20-2	174.19	22.78	0.36	34.52	28.47	23.63
E20-3	20.59	18.35	0.05	34.64	50.83	24.91
E20a-1	199.48	25.98	0.00	34.40	5.23	22.59
E20a-2	126.45	21.82	0.69	34.60	26.64	23.96
E20a-3	25.69	18.51	0.07	34.60	40.66	24.84
E21-1	199.99	25.65	0.57	34.38	5.56	22.67
E21-2	148.61	22.21	0.62	34.47	25.34	23.75
E21-3	12.81	17.23	0.56	34.69	50.52	25.22
E22-1	207.82	25.30	0.06	34.43	5.56	22.82
E22-2	181.02	23.94	0.3	34.48	17.60	23.26
E22-3	7.12	17.17	0.01	34.69	43.82	25.24
E28a-1	196.72	26.12	0.00	34.34	5.53	22.50
E28a-2	190.06	23.46	0.16	34.47	49.85	23.40
E28a-3	41.15	19.43	0.04	34.53	75.84	24.55
E29-1	199.40	25.73	0.000	34.52	5.27	22.75
E29-2	174.50	23.14	0.17	34.50	40.91	23.51
E29-3	2.26	16.27	0.01	34.68	75.97	25.44
E30-1	209.99	25.48	0.03	34.42	5.52	22.75
E30-2	114.95	23.15	0.15	34.42	26.64	23.45
E30-3	35.65	20.43	0.03	34.49	40.56	24.26

**Tabla S2.** Índices calculados para determinar la diversidad bacteriana cultivable en los sitios de muestreo. S es la cantidad de morfo-especies y N es la cantidad de individuos.

Estación	S obs	N	Chao1	Shannon (H')	Simpson ( $\lambda$ )
E5-1	14	24	26	2.45	0.06
E5-2	11	25	14.33	2.21	0.09
E5-3	11	43	13	2.04	0.14
E6-1	10	14	38	2.17	0.06
E6-2	11	29	32	1.95	0.17
E6-3	10	15	24	2.08	0.10
E7-1	9	21	16.50	1.73	0.23
E7-2	8	9	18.5	2.04	0.02
E7-3	10	34	13.33	1.77	0.23
E9-1	3	11	3	0.92	0.38
E9-2	5	5	15	1.61	0.00
E9-3	9	13	14	2.10	0.06
E20-1	16	23	38	2.63	0.04
E20-2	11	95	18	0.99	0.57
E20-3	13	25	58	2.22	0.11
E20a-1	17	51	28.25	2.22	0.16
E20a-2	11	68	14	1.92	0.17
E20a-3	16	54	17.5	2.56	0.07
E21-1	13	61	18.25	1.40	0.45
E21-2	21	140	43	1.78	0.28
E21-3	15	71	16.2	2.22	0.15
E22-1	9	276	9.5	1.44	0.32
E22-2	13	220	13.5	1.95	0.19
E22-3	23	249	39.5	1.90	0.23
E28a-1	24	42	39	2.95	0.04
E28a-2	17	118	26.33	1.96	0.21
E28a-3	20	70	33.2	1.92	0.31
E29-1	24	80	39.6	2.65	0.09
E29-2	11	95	11	1.95	0.17
E29-3	17	188	24.5	2.06	0.17
E30-1	18	46	31.75	2.46	0.10
E30-2	12	37	22.5	1.92	0.21
E30-3	20	81	25	2.69	0.07