



Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Marinas

**Distribución y abundancia de bacterias aisladas de sedimento
marino de la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S, México.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciada en Ciencias Ambientales

Presenta:

Andrea Yazmín Zamora Quintero

Directora de tesis:

Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Ensenada, B.C. México.

Agosto de 2019.



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas



T E S I S

**Distribución y abundancia de bacterias aisladas de sedimento marino
de la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S, México.**

Presentada por:

Andrea Yazmín Zamora Quintero

y aprobada por el siguiente comité:

Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Directora de tesis

Dra. Irasema Oroz Parra

Sinodal

Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras

Sinodal

Ensenada, B.C. México.

Agosto de 2019.

Agradecimientos

A mis padres, Miguel Zamora Magdaleno y Magaly Quintero Soto, por apoyarme en mis estudios, por quererme y cuidar de mí. Por creer en mí y secar mis malos ratos, por ser una motivación en mi vida, por formarme y guiarme en el camino; a mi hermano Miguel Andrés Zamora, por apoyarme, por su comprensión y cariño.

A mi directora de tesis, Dra. Natalie Millán Aguiñaga por sus valiosas enseñanzas, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo de este proyecto y llevarlo a cabo con éxito. Por su dedicación, por su apoyo incondicional y guía en mi formación, por su paciencia durante el proceso de elaboración de este trabajo y sobre todo, por haberme permitido adentrarme y adquirir nuevas habilidades en este tópico de la diversidad bacteriana.

A mis miembros del jurado, Dra. Irasema Oroz Parra y la Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras por tomarse el tiempo de leer el presente trabajo, por sus recomendaciones para el enriquecimiento del presente trabajo.

Al Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes por permitirme trabajar en el laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias Marinas, así como consejos para la obtención de resultados.

Al Dr. Jorge Manuel López Calderón por su apoyo para la obtención de muestras de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre.

Al Instituto de Oceanografía de Scripps, por permitirnos enviar las secuencias de las cepas a estudiar y obtener su taxonomía filogenética, en especial al Dr. Paul R. Jensen y M.C. Dulce Guillén Matus.

A mis apreciables amigos, gracias por tenerme paciencia, por ser parte de la conclusión de este camino y por haber estado presentes en mi mal rato: Alejandra Arriola Munguía, Alejandra Santana Duarte, Arlenee Cervantes Calvario, Federico Campos Martínez, Mariel Chávez Jiménez y Bedanny Yáñez Rojero.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al personal de la Facultad de Ciencias Marinas que labora en ella por su calidez y profesionalismo.

Y a todas aquellas personas, que de alguna u otra forma prestaron su colaboración y ayudaron para llevar esta investigación adelante y que compartieron conmigo esta increíble experiencia.

Resumen

La Laguna Ojo de Liebre, México es parte del Patrimonio de la Humanidad de la UNESCO de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno y representa un lugar único e inexplorado en cuanto a su diversidad de bacterias aisladas del sedimento. La identificación de nueva diversidad de bacterias de ambientes inexplorados es una fuente de nuevos compuestos bioactivos con potencial farmacológico. El objetivo de este trabajo es conocer la distribución y abundancia de bacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre. Se realizaron cuatro muestreos (septiembre 2017, noviembre 2017, febrero 2018 y junio 2018), colectando muestras de sedimento en 10 diferentes estaciones dentro de la Laguna por buceo libre. El sedimento marino se dejó secar por 48 horas en una campana de flujo laminar para posteriormente estampar el sedimento en siete diferentes medios de cultivo sólido. Las cajas de estampado de sedimento fueron monitoreadas cada semana por un periodo de tres meses para aislar y purificar bacterias. Las bacterias con coloración y morfología de interés fueron aisladas y crio-preservadas para su posterior identificación molecular. Se creó un cepario de 64 bacterias, donde la mayor cantidad de cepas (27%) fueron aisladas del medio de cultivo 10% A1 que contiene peptona, levadura, almidón, agar y agua de mar, a diferencia del medio de agua de mar que solo contiene agar como nutriente (3%). Se realizaron extracciones de ADN de 60 bacterias y se utilizó el gen ribosomal 16S rRNA para identificarlas molecularmente. Las cepas pertenecen a tres diferentes filos de bacterias: Actinobacteria (57%), Firmicutes (37%) y Proteobacteria (6%). Dentro del filo Actinobacteria se aislaron diez diferentes géneros, de los cuales tres (*Nocardiosis* sp. *Actinomadura* sp. y *Micromonospora* sp.) han sido explorados como nuevas fuentes de compuestos con actividad farmacológica. Por estas razones, el cepario creado en este proyecto es fundamental para el desarrollo de la investigación en nuevos productos naturales marinos de un ambiente como la Laguna Ojo de Liebre.

Palabras clave: *Laguna Ojo de Liebre, sedimento marino, bacterias, Actinobacterias*

Índice de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. ÁREA DE ESTUDIO	8
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	10
5.1 OBJETIVO GENERAL	10
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	10
6.1 RE-COLECTA DE SEDIMENTO MARINO	10
6.2 PROCESAMIENTO DE SEDIMENTO MARINO	11
6.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS	12
6.4 CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	13
6.5 EXTRACCIÓN DE ADN	13
6.6 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)	14
6.7 ELECTROFORESIS	15
6.8 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN 16S rRNA	16
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
7. RESULTADOS	18
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	44
10. REFERENCIAS	45

Índice de figuras

Figura 1. Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México.	9
Figura 2. Estampado de sedimento marino en medio de cultivo.	12
Figura 3. Estriado de bacteria marina pura en caja petri.	13
Figura 4. Morfología de las 64 cepas aisladas tomadas con un microscopio estereoscópico Labomed Microscope.	20
Figura 5. Abundancia del total de cepas aisladas por cada estación durante las 4 temporadas de muestreo.	21
Figura 6. Abundancia del total de cepas aisladas en relación al medio de cultivo utilizado.	22
Figura 7. Distribución y abundancia de las cepas aisladas por estación con base al medio de cultivo utilizado.	22
Figura 8. Distribución y abundancia de cepas identificadas por estación de muestreo.	26
Figura 9. Abundancia por filo de cepas aisladas.	27
Figura 10. Distribución y abundancia de filos de cepas bacterianas.	27
Figura 11. Abundancia de filos de cepas aisladas de acuerdo al medio de cultivo.	28
Figura 12. Mapa de distribución del total de bacterias aisladas en las 4 temporadas de muestreo.	30
Figura 13. Mapa de distribución de bacterias aisladas de la temporada de muestreo septiembre de 2017.	31
Figura 14. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo noviembre de 2017.	32
Figura 15. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo febrero de 2018.	33
Figura 16. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo junio de 2018.	34
Figura 17. Relación de cepas de acuerdo al filo Actinobacteria.	35
Figura 18. Distribución de Actinobacterias de acuerdo al medio de cultivo.	36
Figura 19. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada septiembre del 2017.	37
Figura 20. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada noviembre del 2017.	37
Figura 21. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada febrero del 2018.	37
Figura 22. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada junio del 2018.	38

Índice de tablas

Tabla I. Salinidad y temperatura de cada estación por cada temporada de muestreo.	11
Tabla II. Cantidad de reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	15
Tabla III. Ciclos y tiempos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
Tabla IV. Datos de aislamiento e identificación molecular de todas las cepas aisladas.	23

1. INTRODUCCIÓN

Los beneficios que la diversidad biológica provee al hombre son múltiples: la sociedad actual depende de las especies para fines alimenticios, energéticos, medicamentos y materiales básicos para la manufactura de compuestos industriales (Escobar, 2000). Así mismo, los organismos vivos son una parte importante de los procesos que regulan los ciclos atmosféricos, climáticos, hidrológicos y bioquímicos de la Tierra, y es en las últimas décadas que hemos logrado comprender más sobre el papel funcional de la diversidad biológica y la dinámica de los procesos en los cuales se beneficia o es afectada la humanidad (Escobar, 2000).

Los océanos constituyen un enorme reservorio natural que justifica el desarrollo de investigaciones relacionadas con el incremento del conocimiento de su diversidad biológica (Morales *et al.*, 2010). La biodiversidad marina es extremadamente alta como consecuencia directa de la variabilidad en el ecosistema marino. De acuerdo a Escobar (2000), es importante puntualizar que los ecosistemas marinos y terrestres difieren notablemente. La ocurrencia de especies y su expresión como biomasa en los mares es miles de veces más diluida que en el ambiente terrestre siendo así a interpretar que el ambiente terrestre es menos productivo.

La diversidad marina es un servicio ecosistémico que aporta grandes beneficios económicos a las comunidades costeras, de tal forma que el desarrollo sostenible de las mismas sea posible (Mann, 2000). Una forma de asegurar la integridad de la diversidad biológica es mediante la creación de categorías especiales de manejo. El papel de las áreas marinas protegidas en la conservación y uso sustentable de la diversidad biológica se ha incrementando desde mediados de la década de los 90

(Eichbaum *et al.*, 1996). La Laguna Ojo de Liebre forma parte de la Reserva de la Biósfera del Vizcaíno en Baja California Sur, una de las seis reservas del país. De una u otra forma, estas características de manejo deben de garantizar la protección de la diversidad biológica marina de la Laguna Ojo de Liebre.

Las lagunas costeras son cuerpos de agua someros y salobres, separados del ambiente costero por una barrera de arena. Ocupan el 14% de la zona costera del planeta y su característica más relevante es la conexión periódica con el océano. La productividad de las lagunas costeras es de las más altas registradas en la naturaleza. Albergan importantes poblaciones de aves y mamíferos, así como peces y crustáceos de relevancia comercial. Son además, sitios de atracción turística. En las lagunas costeras, el frágil equilibrio entre el dinámico medio físico y la biota es altamente vulnerable a la acción humana y a cambios naturales como inundaciones o intrusiones marinas. Esta compleja variabilidad natural y antrópica debe ser adecuadamente comprendida antes de manejar racionalmente sus recursos (Conde, *et al.*, 2003).

Los sedimentos marinos son considerados como un resumidero de una gran cantidad de sustancias y elementos químicos de origen natural o generados por diferentes actividades antrópicas (Giordanno *et al.*, 1992). De acuerdo a González y colaboradores (2004), el estudio de la composición y distribución vertical de los elementos permite conocer la actividad geoquímica e historia de los procesos sedimentarios de un sitio. Según Quintero y colaboradores (2010), el enriquecimiento en nutrientes causa una mayor productividad primaria de las algas en las capas superficiales, lecho marino y el sedimento marino, seguida de una mayor productividad secundaria de los animales marinos.

En sedimentos marinos, las bacterias juegan un rol ecológico dentro del ecosistema, ya que pueden degradar compuestos contaminantes de origen orgánico (Kieft *et al.*, 1997; Alexander, 1999; Boschker *et al.*, 2001). De acuerdo a Pucci y colaboradores (2009) la capacidad de las comunidades bacterianas para biodegradar compuestos en forma natural está limitada por factores ambientales como el oxígeno molecular y los nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos del nitrógeno).

En la actualidad la gran mayoría de los microorganismos marinos permanecen sin identificación (Alcolado, 2007). Los microorganismos son una componente integral de las tramas alimentarias y son por lo mismo, importantes en los ciclos biogeoquímicos al ser responsables del reciclamiento de la materia orgánica en los mares. La diversidad de estos consorcios es prácticamente desconocida. Los métodos convencionales de identificación incluyen cultivos que solamente han permitido identificar el 1% de los microorganismos en muestras (Escobar, 2000). Es necesario tener en cuenta el método de aislamiento, medio de cultivo, temperatura, tiempo de incubación, entre muchos otros factores que podrían garantizar una mayor diversidad de microorganismos.

Entre los aspectos que estudia la microbiología marina se encuentra el conocimiento de la distribución, abundancia y actividad metabólica de las bacterias. Además, se realiza la evaluación del potencial biotecnológico para ampliar el conocimiento sobre su diversidad química y farmacológica. Esto ha permitido la interacción y desarrollo de nuevos proyectos enfocados hacia el uso sostenible de los

recursos marinos en la obtención de bioproductos de interés para la industria y el medio ambiente (De la Cruz *et al.*, 1996).

Las bacterias son microorganismos procariontes no visibles a simple vista, que presentan una amplia variedad de características morfológicas, fisiológicas y genéticas lo cual les permite vivir en cualquier tipo de hábitat, incluso en aquellos que presentan condiciones extremas de temperatura, salinidad o pH (Miravet y Lugioyo, 2007). La diversidad microbiana es indispensable para el sostenimiento de la biosfera, no sólo por el papel tan importante que juegan los microorganismos como descomponedores de contaminantes y restos orgánicos, sino también, como productores y consumidores de gases relacionados con el clima del planeta. Las bacterias pueden utilizar fuentes alternativas de energía, sobrevivir sin oxígeno e incluso, usar diferentes fuentes de carbono orgánico e inorgánico, por lo que son extremadamente eficientes en la absorción y el reciclaje de carbono en el océano (Alcolado, 2007).

El estudio de la diversidad de los procariontes ha estado muy limitado por muchos años debido a las dificultades para caracterizar los microorganismos después de su aislamiento en cultivos puros y a la inhabilidad de aislar aquellos no cultivables. Se reconoce que solamente 5,000 especies de bacterias han sido descritas mediante de cultivos puros. A partir de la década de los ochentas, el empleo de las nuevas técnicas moleculares de amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S, han permitido describir nuevas especies de bacterias que no habían sido aisladas antes en cultivos puros (Botella-Grau, 2000).

2. ANTECEDENTES

De acuerdo a Robles y Guarner (2013), más del 90% de las formas del Dominio Bacteria pertenecen a las divisiones Bacteroidetes y Firmicutes. Así mismo, con abundancia destacable son Proteobacteria, Actinobacteria. Los filos de bacterias más abundantes en sedimentos marinos se encuentran Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

El filo Proteobacteria es conocido como uno de los principales filos de bacterias, considerados los más abundantes en los océanos y otros ambientes acuáticos (Gutiérrez, 2018). Constituyen el 79% de la biomasa bacteriana del fondo marino y en la superficie del mar un 64% (Battistuzzi & Hedges, 2008); siendo conocidas también por incluir una gran variedad de patógenos (*Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrios*, *Helicobacter*, *Neisseria gonorrhoeae*, la *Burkholderia glumae* y muchos otros) (Martín, 2010).

El filo Firmicutes incluye a muchos géneros de bacterias que tienen aplicaciones biotecnológicas como probióticos para humano y otros animales. Dichos beneficios incluyen como promotores de crecimiento en animales de granja, efectos benéficos en infecciones intestinales y actividad anticolesterolémica (Fuller, 1989; Gutiérrez, 2018).

Gutiérrez (2018) menciona que el filo conocido por sus múltiples contribuciones ecológicas y en aplicaciones médicas y biotecnológicas son las Actinobacterias, aisladas principalmente de sedimentos. Bull y Stach (2007), exponen que la búsqueda

y descubrimiento de productos naturales en actinobacterias marinas ha sido reconocidas por producir distintos compuestos activos.

Se ha planteado que el filo Actinobacteria, al igual que sus contrapartes terrestres en los suelos, tienen funciones importantes en la descomposición de materia orgánica recalcitrante en el fondo marino (Weyland, 1969). Sin embargo, también son reconocidas como una fuente de nuevos antibióticos y agentes contra el cáncer (Faulkner, 2002). Por lo que Jensen y colaboradores (2005), proponen que este filo debe ser metabólicamente activo en el medio marino y esta actividad debe conducir a la producción de compuestos que no son observados en cepas terrestres.

El filo Actinobacteria ha sido explorado en diferentes partes de la península de Baja California con el fin de aislar nuevas cepas con potencial biotecnológico. Becerril (2011), colectó 133 muestras de sedimento marino de tres zonas: Bahía de Todos Santos, San Felipe y de distintos puntos del Golfo de California, logrando aislar 946 cepas de actinobacterias. Con base a su identificación molecular se lograron recuperar diferentes géneros de este filo como: *Micromonospora spp.*, *Salinispora spp.* y *Streptomyces spp.*, dichos géneros conocidos por su habilidad de producir metabolitos con actividad antibiótica y/o anticancerígena (Becerril, 2011; Jensen *et al*, 2015).

En 2012, Torres *et al*, evaluaron el potencial del Golfo de California como reservorio de actinobacterias bioactivas aislando 236 cepas de actinomicetos de 43 muestras de sedimento. En particular, se enfocaron en el género *Salinispora* y la actividad citotóxica de los extractos químicos de dichos cultivos; considerando el Golfo

de California como una fuente de cepas de actinobacterias con potencial biotecnológico. Castro (2014), también logró aislar 66 cepas de actinobacterias de muestras de sedimento marino colectadas del Golfo de California y Golfo de México, aislando géneros de actinomicetos poco estudiados como *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Saccharamonospora*, los cuales han mostrado altos niveles de actividad contra líneas celulares de cáncer de colon.

3. ÁREA DE ESTUDIO

La Laguna Ojo de Liebre es una laguna costera poco profunda (5-12m profundidad) con una extensión de 48 km de largo y 9 km de ancho; se localiza entre los 27°35' y 27°55'N y los 113°50' y 114°20'W (Fig. 1). Las variaciones de temperatura y salinidad se deben principalmente a las mareas, llegándose a registrar salinidades de 47 ppm en la parte interna (Contreras, 1985). Las áreas adyacentes a la Laguna Ojo de Liebre representan la principal fuente de explotación y procesamiento de sal en México, siendo además la salina por evaporación más grande del mundo, con una producción anual superior a los cinco millones de toneladas métricas por año (Secretaría de Desarrollo, 1992). Durante el invierno, estas áreas también se utilizan como zona de reproducción, crianza o refugio por la ballena gris *Eschrichtius robustus* y diversas especies de aves migratorias, como el ganso de collar *Branta bernicla nigricans*, el pato golondrino *Anas acuta* y el mergánsar *Mergus serrator*; otra especie relevante que se encuentra en la zona es el águila pescadora *Pandion haliaetus* (Galina et al., 1991).

Por lo tanto, la presente tesis de licenciatura pretende generar nuevo conocimiento sobre las bacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre, ya que este ecosistema representa una fuente inexplorada de bacterias, en particular de actinomicetos marinos, ya sus características oceanográficas la hacen un lugar idóneo para el aislamiento de estos microorganismos.

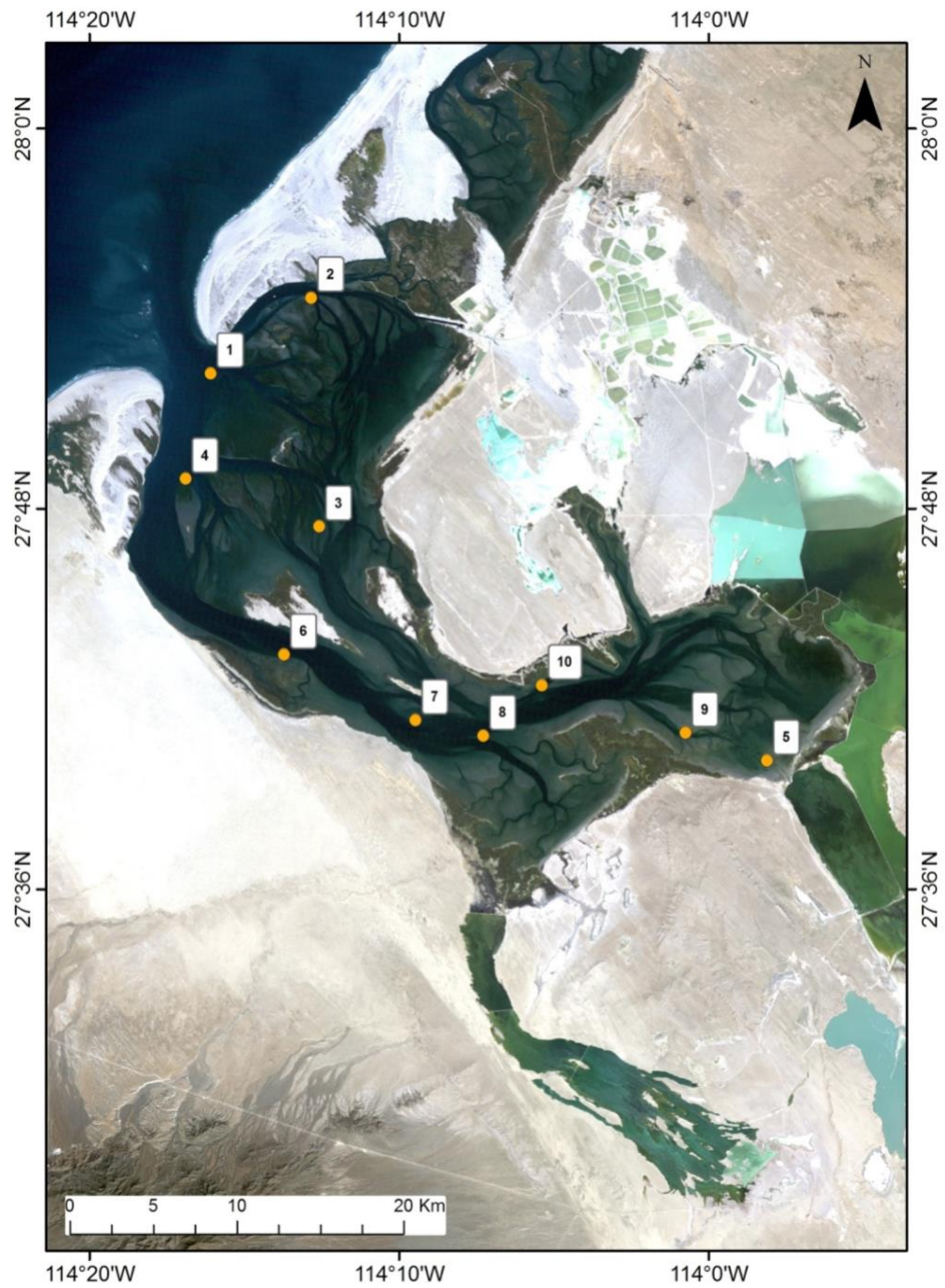


Figura 1. Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México. Los números representan la localización de cada estación de toma de muestras de sedimento marino. (Mapa cortesía de U.S. Geological Survey at <https://usgs.gov> y modificada con el programa ArcMap 10.1).

4. HIPÓTESIS

Los sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre son una fuente inexplorada de nueva diversidad de bacterias marinas. Debido a que es una Reserva de la Biósfera y tiene un grado alto de conservación, se espera encontrar una abundancia y distribución de nuevas bacterias marinas cultivables.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer la distribución y estimar la abundancia de bacterias aisladas del sedimento marino de la laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la distribución y abundancia de las bacterias marinas aisladas.
- Calcular la abundancia de bacterias marinas aisladas.
- Identificar molecularmente las cepas de bacterias aisladas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 RE-COLECTA DE SEDIMENTO MARINO

Se realizaron cuatro muestreos estacionales (septiembre, 2017, noviembre, 2017, febrero, 2018 y junio 2018) para coleccionar sedimento marino en 10 diferentes estaciones dentro de la laguna con profundidad máxima de 13 metros aproximadamente (Fig. 1). Se tomó lectura de la salinidad y temperatura de cada estación durante las cuatro temporadas (Tabla I). Dicha re-colección se llevó a cabo

por buceo libre, utilizando bolsas estériles y preservadas en hielo para su posterior análisis de regreso al laboratorio.

Tabla I. Salinidad y temperatura de cada estación por cada temporada de muestreo.

	Septiembre		Noviembre		Febrero		Junio	
	Temperatura	Salinidad	Temperatura	Salinidad	Temperatura	Salinidad	Temperatura	Salinidad
Estación 1	21.8	3.45	20.5	3.46	19.38	3.78	19.47	3.44
Estación 2	22.6	3.58	20.6	3.53	19.38	3.05	20.71	3.44
Estación 3	22.9	3	20.7	3.52	20.26	3.91	21.62	3.54
Estación 4	22.3	3.46	20.7	3.44	19.37	3.78	20.04	3.47
Estación 5	22.5	4	20.1	4	19.42	4.71	22.35	4.28
Estación 6	23.9	3.48	20.9	3.69	18.75	4.05	21.15	3.69
Estación 7	23.6	3.78	20.9	3.69	19.83	4.18	21.28	3.72
Estación 8	23.5	3.82	21	3.75	19.53	4.25	21.36	3.89
Estación 9	23.2	4	21	4	19.4	4.53	22.04	4.15
Estación 10	23.5	3.97	21.4	3.9	19.74	4.3	21.65	3.85

6.2 PROCESAMIENTO DE SEDIMENTO MARINO

El sedimento marino se dejó secar bajo la campana de flujo laminar por 48 horas para su posterior estampado en placa. Se utilizaron siete diferentes medios de cultivo:

1. Avena: 14 gr de avena comercial y 14 gramos de agar por litro de agua destilada.
2. 10% A1 35 gr: 1 gr de almidón, 0.4 gr de levadura, 0.2 gr de peptona, 14 gr de agar, 35 gr de sal marina con un pH de 10.15 por litro de agua destilada.
3. 10% A1: 1 gr de almidón, 0.4 gr de levadura, 0.2 gr de peptona, 14 gr de agar, 35 gr de sal marina por litro de agua destilada.
4. SW-LOL 35 gr: 14 gr de agar, 35 gr de sal de la laguna Ojo de Liebre, con un pH de 10.15 por litro de agua destilada.
5. SW: 14 gr de agar, 22 gr de sal marina, por litro de agua destilada.
6. SW-LOL: 14 gr de agar, 22 gr de sal de la laguna Ojo de Liebre por litro de agua destilada.

7. SW-35 gr: 14 gr de agar, 35 gr de sal marina, con un pH de 10.15 por litro de agua destilada.

El método de estampado se llevó a cabo de la siguiente manera: se estampó sedimento con un tapón de espuma estéril, inoculando en los siete medios antes descritos estampando cinco o seis veces en forma circular, dando un efecto de dilución en serie.

6.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS

Las cajas de estampado de sedimento fueron monitoreadas cada semana por un periodo de tres meses para observar el crecimiento de bacterias marinas (Fig. 2). Las bacterias con coloración y morfología de interés fueron pasadas a nuevas cajas de medio de cultivo A1 (10 g de almidón, 4 g de levadura, 2 g de peptona, 14 gr de agar, 22 g de ocean mix por litro de agua destilada) para su posterior purificación, inoculando por el método de estriado por lo menos tres veces en la caja petri (Fig. 3).

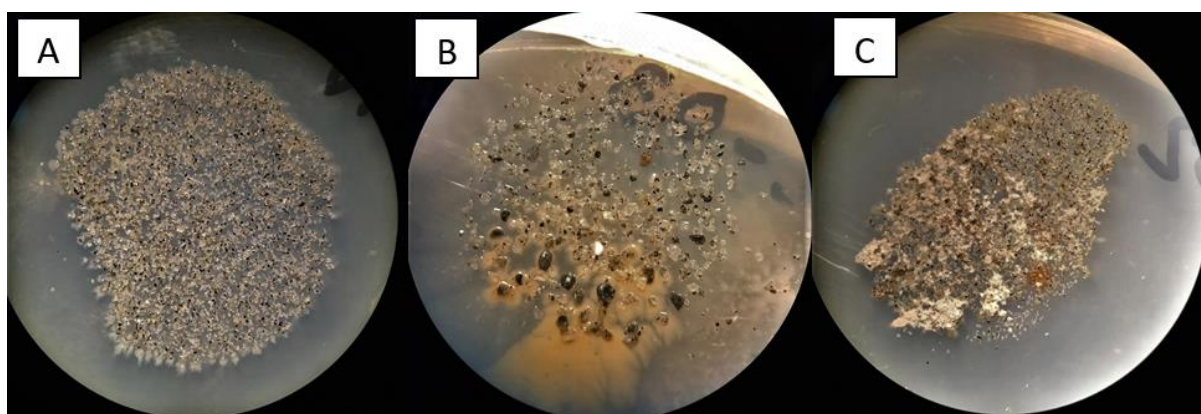


Figura 2. A) Estampado de sedimento marino en medio de cultivo. B) y C) Estampado de sedimento marino en medio de cultivo con crecimiento de colonias bacterianas.



Figura 3. Estriado de bacteria marina pura en caja petri.

6.4 CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias purificadas en medio de cultivo sólido se pasaron a medio líquido A1 en matraces de 25 ml. Se dejaron en agitación a 150 rpm por 7 días de incubación a temperatura ambiente para posteriormente verificar su pureza en medio sólido antes de la criopreservación. Para la criopreservación del cultivo celular se utilizó glicerol al 10% y se almacenó en un vial a -20°C.

6.5 EXTRACCIÓN DE ADN

Para obtener el ADN de las bacterias, se procedió a tener el cultivo de éstas para posteriormente centrifugar 1 ml de cultivo celular por 10 minutos a 10,000 rpm para obtener el pellet de la bacteria. Se removió el sobrenadante y se procedió a la extracción de ADN. Al pellet obtenido se le agregó 200 µl de Buffer Tris-EDTA (Buffer TE- 10 mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), se agitó vigorosamente cada muestra en Vortex para resuspender el pellet. Se procedió a macerar el pellet con pistilo para homogeneizar la muestra. Se agregó a cada muestra 10 µl de Lisozima. Se incubaron a 37°C por 30 minutos. El material se transfirió a un tubo de 2 ml con esferas de vidrio de 0.5 mm. Se agregó a cada muestra 10 µl del reactivo Antifoam. Se agregaron 100

μl de Buffer DLB. Teniendo ambos Buffer en cada muestra, se agitaron continuamente (Vortex) por 10 segundos. Se incubaron las muestras toda una noche a 55°C.

Posteriormente, se agregó a cada muestra 5 μl de solución RNasa. Se invirtieron los tubos varias veces para mezclar la solución. Se incubaron a temperatura ambiente por cinco minutos. Después, se centrifugaron las muestras a 10,000 RPM por 2 minutos para precipitar cualquier material que no se digirió. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml. Se agregaron 220 μl de Buffer BB para después agitar continuamente (Vortex). Se incubaron las muestras por 10 minutos a 65°C. Se añadió 220 μl de 100% Etanol frío y se mezcló vigorosamente (Vortex) durante 20 segundos. Se transfirieron las muestras completas a la columna, incluyendo cualquier precipitado que se formó para después centrifugar a 10,000 RPM durante 1 minuto. Se descartó lo que quedó en el tubo de colecta. Se agregaron 500 μl de Buffer CBH. Se centrifugaron las muestras a 10,000 RPM por 1 minuto. Se descartó lo que quedó en el tubo. Se añadieron 700 μl de Buffer DW. Se centrifugaron las muestras por 1 minuto a 10,000 RPM y se descartó lo restante del tubo para posteriormente repetir el procedimiento de agregar los 700 μl de Buffer DW y centrifugar las muestras por 1 minuto a 10,000 RPM y descartar lo que haya quedado en el tubo. Posteriormente, se centrifugaron vacíos para que quedaran sin Etanol a 10,000 RPM por 2 minutos. Se pasó la columna a un tubo nuevo. Se añadió 30 μl de Buffer EB para luego incubar las muestras a 65°C por 5 minutos. Al finalizar, se centrifugaron las muestras por 1 minuto a 10,000 RPM.

6.6 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Para amplificar el gen 16S rRNA de las muestras de ADN de las cepas bacterianas, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los

cebadores universales: FC27 y RC1492 (Tabla II). El ciclo de PCR se diseñó para 35 ciclos y con una temperatura de alineamiento de 63°C (Tabla III).

Tabla II. Cantidad de reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los reactivos F y R son los cebadores universales: FC27 y RC1492.

Reactivos	25 μ l
ddH ₂ O	15.5
dNTPS	1
F	0.5
R	0.5
10xPCR	2.5
MgCl ₂	2.5
DMSO	1.25
ADN	1
Taq. Polimerasa	0.25

Tabla III. Ciclos y tiempos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ciclo 1 (1x)	94° C x 10 minutos
Ciclo 2 (35x)	94° C x 1 minuto
	63° C x 1 minuto
	72° C x 1 minuto
Ciclo 3 (1x)	72° C x 1 minuto
	16° C x ∞

6.7 ELECTROFORESIS

Para preparar el gel para la electroforesis se añadió 1 gr de agarosa por cada 100 ml de Buffer TAE. Se calentó aproximadamente por 2 minutos utilizando un horno de microondas. Posteriormente se vertió al porta gel, colocando dos peines y se dejó reposar por 30 minutos.

Se utilizó el buffer TAE 1X para cubrir la cámara de electroforesis para posteriormente cargar las muestras en los pozos del gel. La preparación de las

muestras se basó en agregar 5 µl de muestra de ADN de las bacterias, 1 µl de sample Loading Buffer 5x y 1 µl de Buffer SYBR Safe ADN. Se utilizó una escalera de 1000 pb como control, además de una muestra de ADN conocida como control positivo y agua como control negativo. Se corrió el gel por 30 minutos a 110 volts. Posteriormente se visualizó el gel en una cámara de UV capturando la imagen. Las muestras en donde se observó una banda esperada de aproximadamente 1400 pb se mandaron a secuenciar a la empresa ETON Bioscience Inc. de San Diego, California.

6.8 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN 16S rRNA

Los resultados de la secuenciación fueron visualizados y limpiados utilizando el programa Geneious 9.1.5. para su posterior análisis de similitud utilizando la base de datos EZTAXON (<https://www.ezbiocloud.net/>). Para la identificación de las 60 cepas de bacterias en esta base de datos, se ingresó a la aplicación ID basado en el gen 16S rARN para posteriormente identificar una nueva secuencia; se eligió un nombre para identificar la secuencia y se colocó la secuencia de la cepa para después correr el programa para obtener la secuencia identificada con la información del procarionte. EZTAXON obtiene un código de la cepa utilizado para esta base de datos, la semejanza entre las dos secuencias (la limpia y la de la base de datos), su integridad y su hit taxonómico, así como el nombre de la especie con mayor porcentaje de similitud.

6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

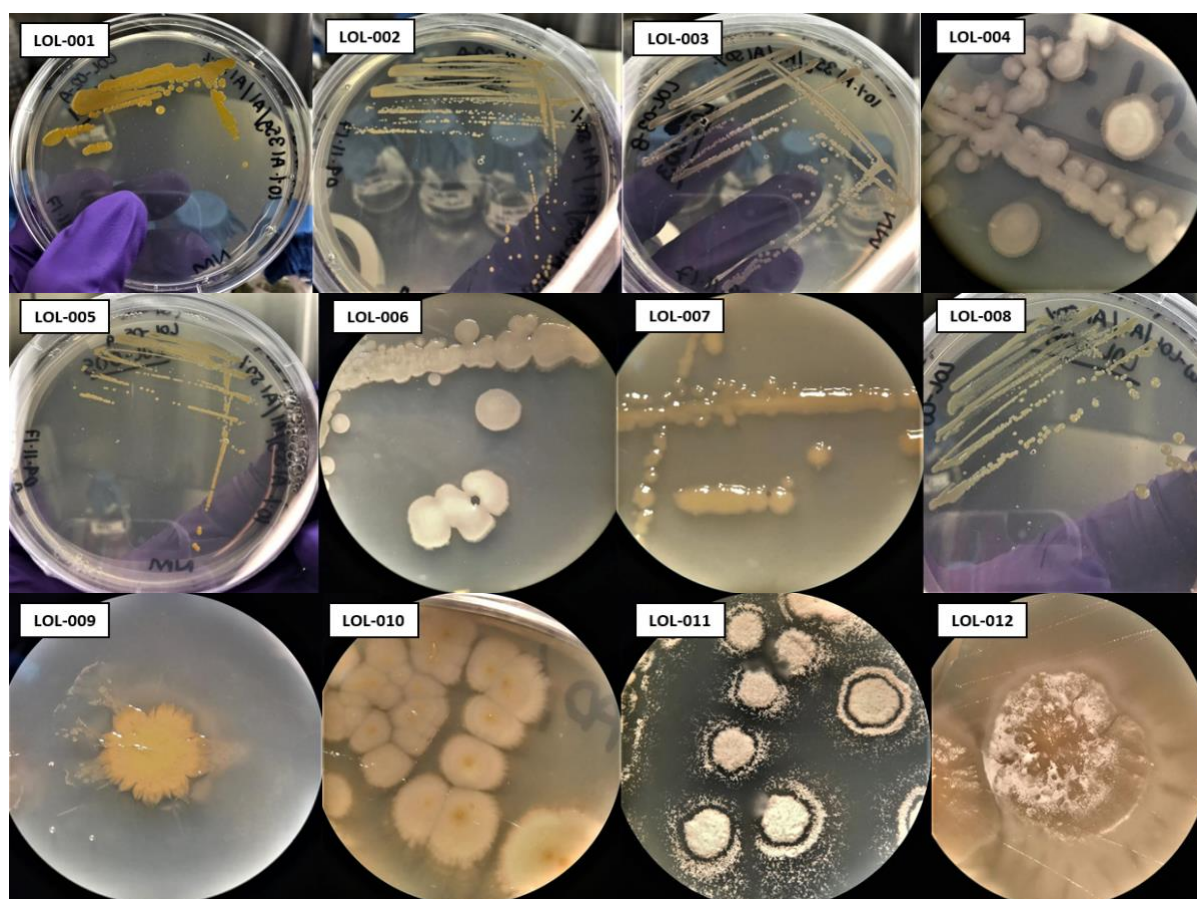
Se generaron tablas con promedios de cada cepa aislada en distinto medio, cepas de cada estación de acuerdo al medio, cepas de acuerdo a la especie identificada, cepas por cada mes de muestreo. Para contrastar los resultados, se elaboró una gráfica de columnas apiladas de todas las estaciones de los cuatro meses

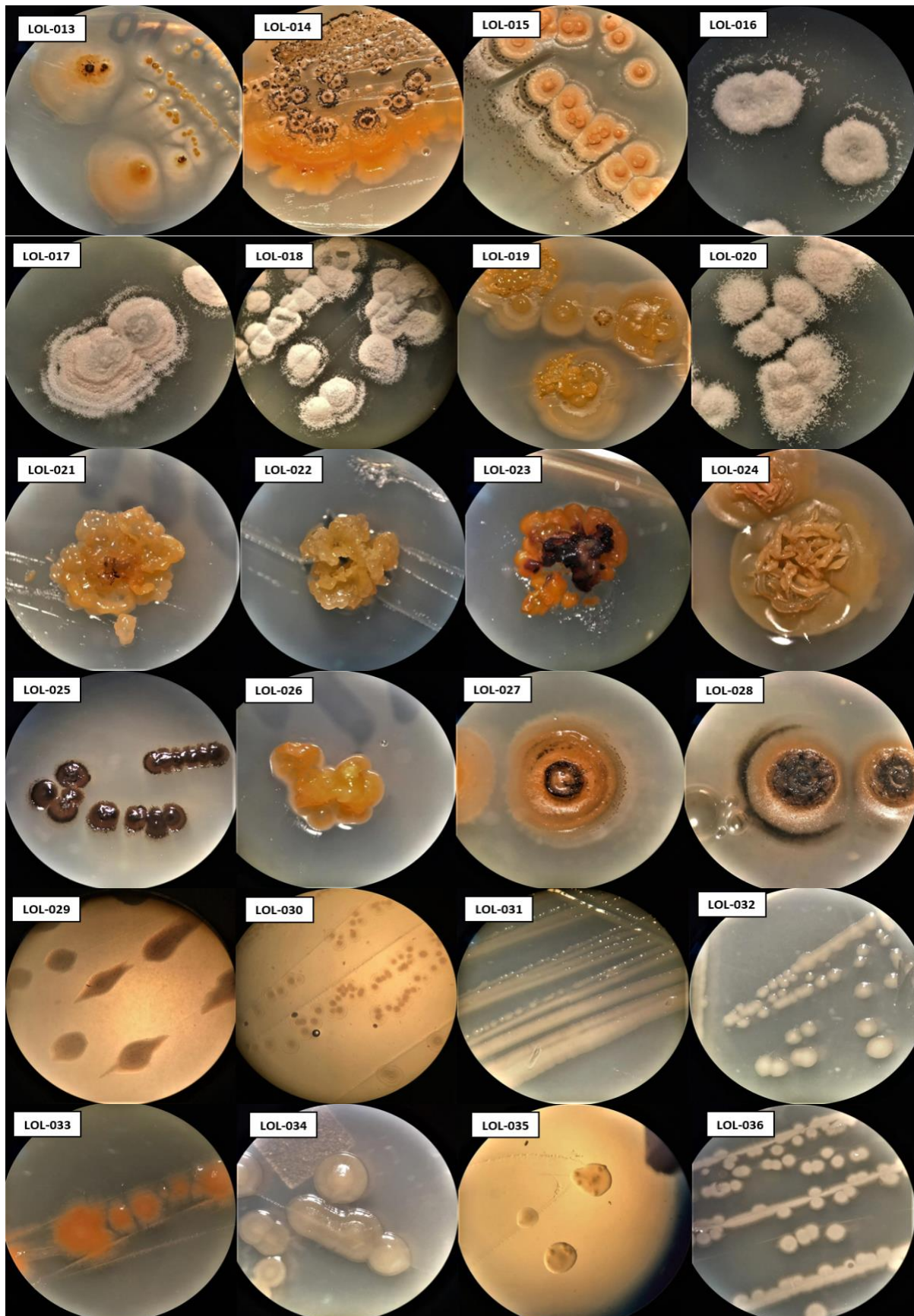
de muestreo (septiembre 2017, noviembre 2017, febrero 2018 y junio 2018) en relación a la cantidad de bacterias aisladas en los distintos medios de cultivo. Así mismo, se elaboraron gráficas de pastel con los porcentajes de las cepas aisladas en cada estación de los cuatro muestreos y otra con el porcentaje de los distintos medios de cultivo utilizados. Las tablas y gráficas realizadas se generaron utilizando el programa Microsoft Excel.

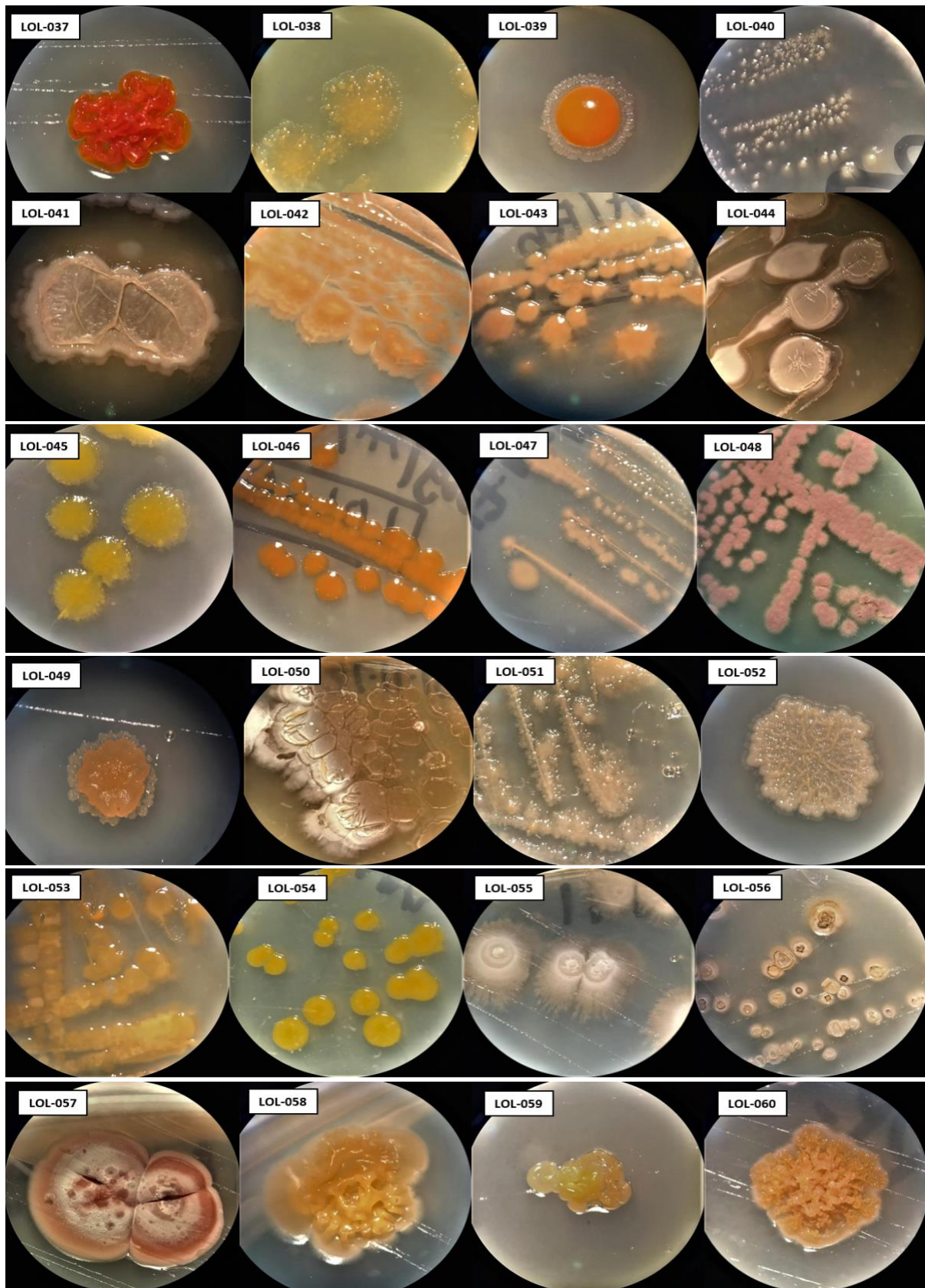
7. RESULTADOS

Se colectaron un total de 40 muestras de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre, 10 muestras de sedimento por cada mes de muestreo (septiembre 2017, noviembre 2017, febrero 2018 y junio 2018) para investigar la diversidad de bacterias utilizando métodos dependientes de cultivo.

Utilizando un aislamiento selectivo de morfología de interés se aislaron 64 bacterias (Fig. 4), las cuales forman parte del cepario de bacterias de la Facultad de Ciencias Marinas.







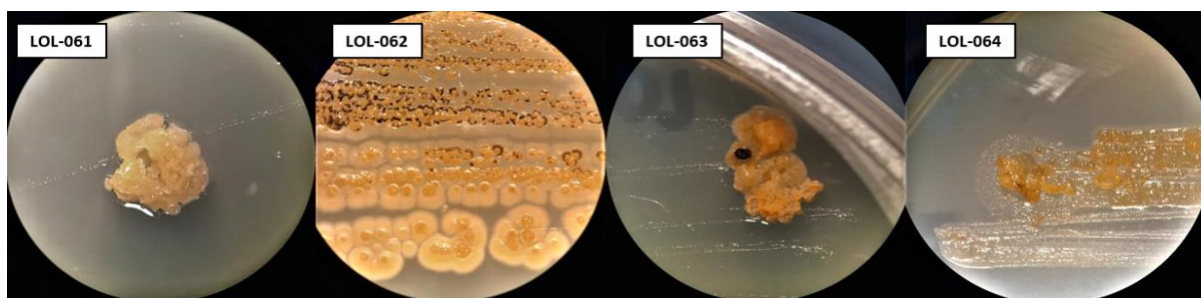


Figura 4. Morfología de las 64 cepas aisladas tomadas con un microscopio estereoscópico Labomed Microscope.

Del total de bacterias aisladas, se observó una mayor abundancia en las estaciones de muestreo LOL-02 y LOL-03 con un 17% respectivamente y una menor abundancia en las estaciones LOL-08 y LOL-010 con un 5% de las cepas aisladas (Fig. 5). Respecto al medio de cultivo utilizado, se observó una mayor abundancia de cepas con el medio 10% A1 con un 27% y una menor abundancia utilizando el medio de cultivo SW-LOL-35 gr con solamente un 3% de las cepas aisladas (Fig.6).

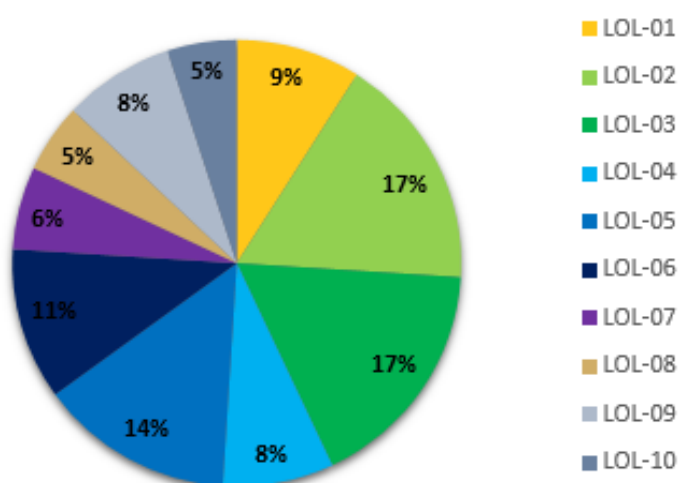


Figura 5. Abundancia del total de cepas aisladas por cada estación durante las 4 temporadas de muestreo.

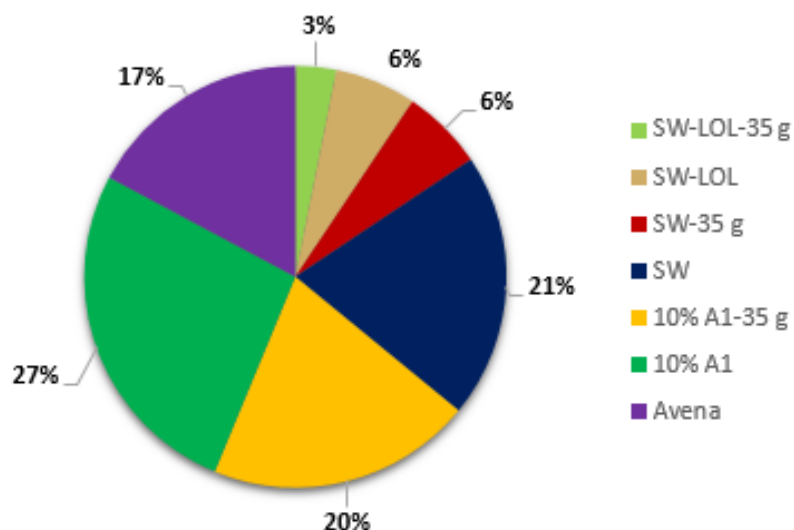


Figura 6. Abundancia del total de cepas aisladas en relación al medio de cultivo utilizado.

La cantidad de cepas aisladas por cada medio de cultivo fue variable. En las estaciones LOL-02 y LOL-03 se observa que la mayor cantidad de cepas aisladas se obtuvieron de 5 diferentes medios de cultivo. En las estaciones con menor abundancia de cepas aisladas (LOL-08 y LOL-010) solamente se aislaron de 2 medios de cultivo (Fig. 7).

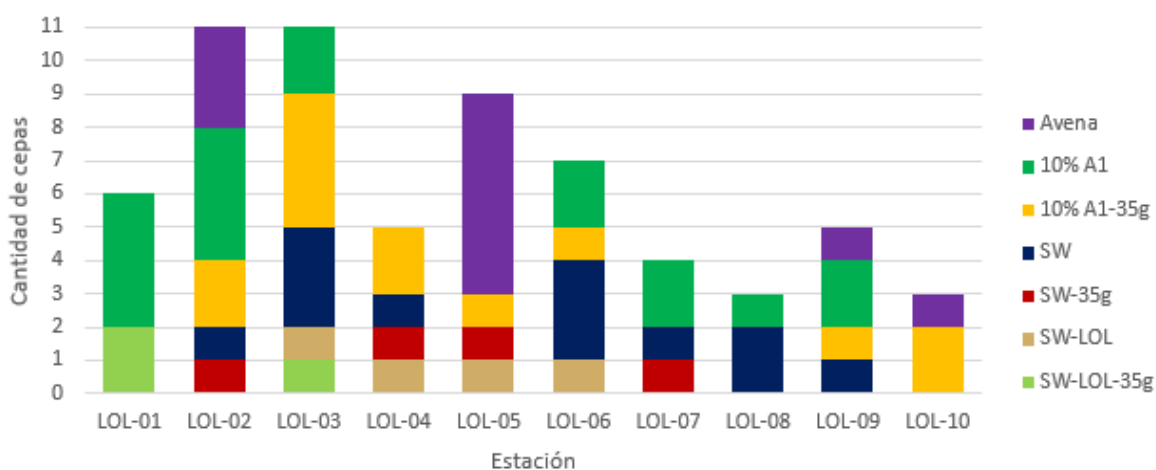


Figura 7. Distribución y abundancia de las cepas aisladas por estación con base al medio de cultivo utilizado.

De las 64 cepas aisladas solamente 60 cepas se pudieron identificar taxonómicamente utilizando el gen ribosomal 16S rRNA (Tabla IV).

Tabla IV. Datos de aislamiento e identificación molecular de todas las cepas aisladas.
NI=No Identificada.

LOL #	Estación de muestreo	Temporada	Medio de cultivo	Nombre de especie
LOL-001	LOL-02	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Halobacillus trueperi</i>
LOL-002	LOL-03	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>
LOL-003	LOL-03	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Bacillus infantis</i>
LOL-004	LOL-04	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>
LOL-005	LOL-05	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>
LOL-006	LOL-09	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Bacillus safensis</i>
LOL-007	LOL-04	Sep_2017	SW-LOL	<i>Jiella aquimaris</i>
LOL-008	LOL-05	Sep_2017	SW-LOL	<i>Bacillus endolithicus</i>
LOL-009	LOL-03	Sep_2017	SW	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>
LOL-010	LOL-06	Sep_2017	SW	<i>Nocardiopsis fildesensis</i>
LOL-011	LOL-03	Sep_2017	SW	<i>Actinomadura cremea</i>
LOL-012	LOL-06	Sep_2017	SW	<i>Nocardiopsis fildesensis</i>
LOL-013	LOL-08	Sep_2017	SW	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-014	LOL-09	Sep_2017	SW	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-015	LOL-02	Sep_2017	SW	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-016	LOL-03	Sep_2017	SW	<i>Actinomadura cremea</i>
LOL-017	LOL-03	Sep_2017	SW-LOL 35 g	<i>Actinomadura cremea</i>
LOL-018	LOL-03	Sep_2017	SW-LOL	<i>Actinomadura cremea</i>
LOL-019	LOL-03	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-020	LOL-03	Sep_2017	10% A1 35 g	<i>Actinomadura cremea</i>
LOL-021	LOL-01	Sep_2017	SW-LOL 35 g	<i>Micromonospora spongicola</i>

LOL-022	LOL-07	Sep_2017	SW	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-023	LOL-06	Sep_2017	SW-LOL	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-024	LOL-04	Nov_2017	SW 35 gr	<i>Xiangella phaseoli</i>
LOL-025	LOL-03	Nov_2017	10%A1	<i>Micromonospora citrea</i>
LOL-026	LOL-02	Nov_2017	Avena	<i>Plantactinospora endophytica</i>
LOL-027	LOL-06	Feb_2018	SW	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-028	LOL-07	Feb_2018	10% A1	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-029	LOL-01	Nov_2017	10% A1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
LOL-030	LOL-01	Nov_2017	10% A1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LOL-031	LOL-02	Nov_2017	10% A1	<i>Psychrobacter celer</i>
LOL-032	LOL-02	Nov_2017	10% A1	<i>Psychrobacter piscatorii</i>
LOL-033	LOL-05	Nov_2017	Avena	<i>Bacillus luteolus</i>
LOL-034	LOL-05	Nov_2017	Avena	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>
LOL-035	LOL-07	Nov_2017	10% A1	<i>Halobacillus mangrovi</i>
LOL-036	LOL-10	Nov_2017	10% A1 35 gr	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
LOL-037	LOL-09	Feb_2018	10%A1	<i>Plantactinospora mayteni</i>
LOL-038	LOL-09	Feb_2018	10%A1	<i>Halobacillus trueperi</i>
LOL-039	LOL-09	Feb_2018	Avena	<i>Pseudokineococcus marinus</i>
LOL-040	LOL-06	Feb_2018	10%A1	<i>Plantactinospora endophytica</i>
LOL-041	LOL-06	Feb_2018	10%A1 35 gr	<i>Bacillus vallismortis</i>
LOL-042	LOL-05	Feb_2018	Avena	<i>ABCF_s (Bacillus)</i>
LOL-043	LOL-05	Feb_2018	Avena	<i>Bacillus luteolus</i>
LOL-044	LOL-02	Feb_2018	10% A1	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>

LOL-045	LOL-02	Feb_2018	Avena	<i>Arthrobacter parietis</i>
LOL-046	LOL-02	Feb_2018	10% A1	<i>Arthrobacter parietis</i>
LOL-047	LOL-01	Jun_2018	10% A1	<i>Sporosarcina aquimarina</i>
LOL-048	LOL-01	Jun_2018	SW	NI
LOL-049	LOL-02	Jun_2018	10% A1 35 gr	<i>Blastococcus massiliensis</i>
LOL-050	LOL-05	Jun_2018	Avena	<i>Streptomyces chumphonensis</i>
LOL-051	LOL-05	Jun_2018	SW 35 gr	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>
LOL-052	LOL-06	Jun_2018	10% A1	<i>Rhodococcus nanhaiensis</i>
LOL-053	LOL-07	Jun_2018	SW 35 gr	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>
LOL-054	LOL-08	Jun_2018	SW	<i>Erythrobacter citreus</i>
LOL-055	LOL-02	Feb_2018	Avena	<i>Actinomadura livida</i>
LOL-056	LOL-02	Jun_2018	SW 35 gr	<i>Plantactinospora endophytica</i>
LOL-057	LOL-03	Jun_2018	10% A1	NI
LOL-058	LOL-04	Jun_2018	10% A1 35 gr	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-059	LOL-04	Jun_2018	SW	NI
LOL-060	LOL-05	Jun_2018	Avena	<i>Micromonospora spongicola</i>
LOL-061	LOL-08	Jun_2018	10% A1	<i>Plantactinospora endophytica</i>
LOL-062	LOL-10	Jun_2018	Avena	<i>Plantactinospora endophytica</i>
LOL-063	LOL-01	Jun_2018	10%A1	NI
LOL-064	LOL-10	Feb_2018	10%A1 35 gr	<i>Micromonospora spongicola</i>

Se lograron identificar 17 diferentes géneros de bacterias. Se observó una mayor diversidad y abundancia en la estación LOL-02 con 8 diferentes géneros de 11 cepas identificadas. La menor diversidad y abundancia fue observada en las estaciones LOL-08 y LOL-010 con 3 géneros respectivamente (Fig. 8). Se observó una diversidad de 5 géneros tanto en la estación LOL-06 y LOL-09 con 8 y 5 cepas respectivamente. Además, se observa que el género *Bacillus sp.* es el que tiene una mayor distribución en 8 estaciones de muestreo (Fig. 8).

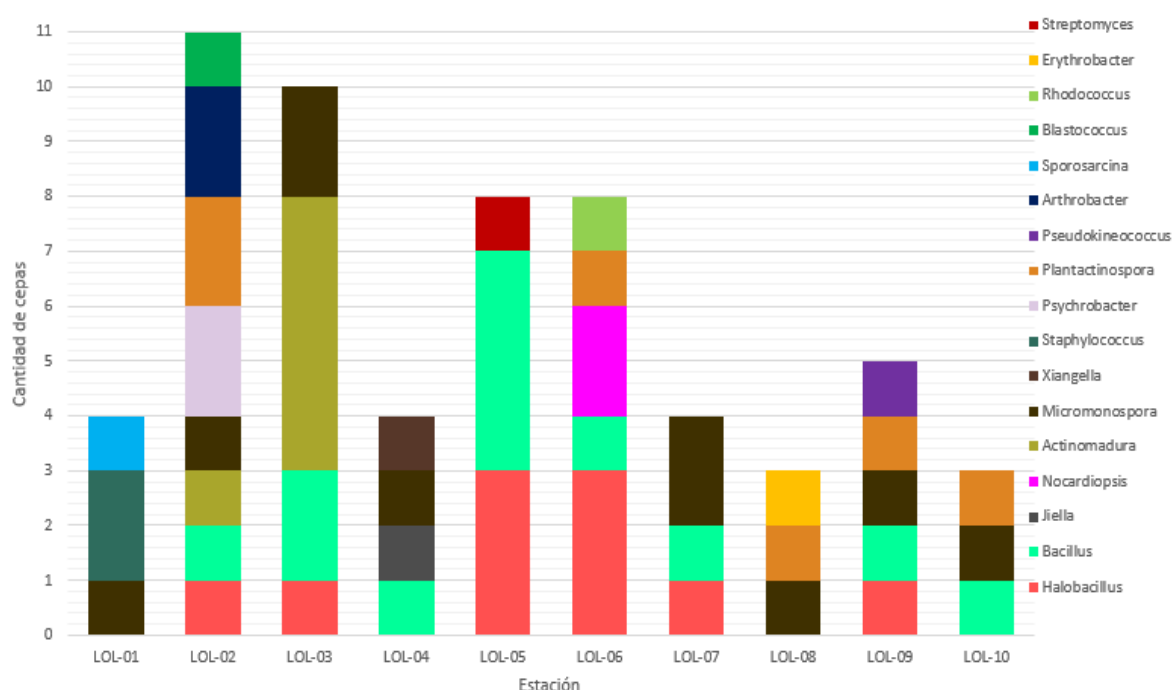


Figura 8. Distribución y abundancia de cepas identificadas por estación de muestreo.

Las 60 cepas identificadas pertenecen a tres diferentes filos de bacterias: Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. El filo más abundante de cepas (57%) pertenece al filo Actinobacteria, mientras la menor abundancia pertenece al filo Proteobacteria (7%) (Fig. 9). El filo Actinobacteria es el que presenta una mayor distribución y abundancia, teniendo 34 cepas distribuidas en todas las estaciones de muestreo (Fig. 10). A diferencia, el filo Proteobacteria sólo se aisló en las estaciones LOL-02, LOL-04 y LOL-08, con cuatro cepas aisladas. Se observa que el filo Firmicutes, en la estación 5, presenta una mayor abundancia con 7 cepas a diferencia

del filo Actinobacteria con 2 cepas aisladas (Fig. 10). En el medio de cultivo 10% A1 se lograron aislar 15 cepas pertenecientes a los 3 filos identificados. Se obtuvo una mayor abundancia de Actinobacterias utilizando el medio SW con 9 cepas aisladas; en cambio, el medio de cultivo SW-LOL-35 gr solo se aislaron dos cepas (Fig. 11).

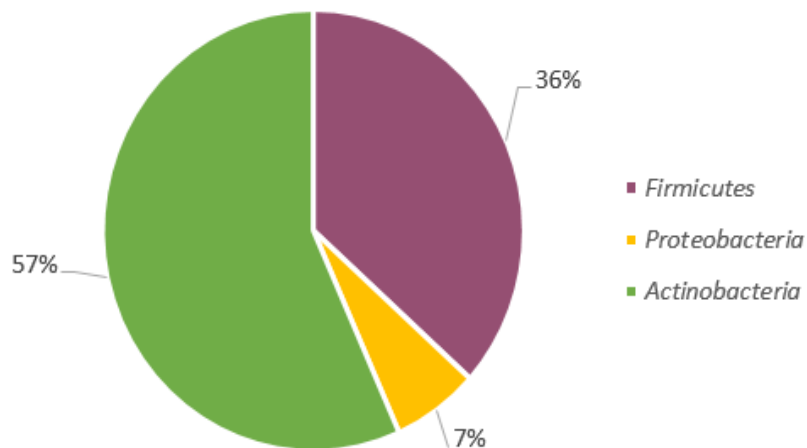


Figura 9. Abundancia por filo de cepas aisladas.

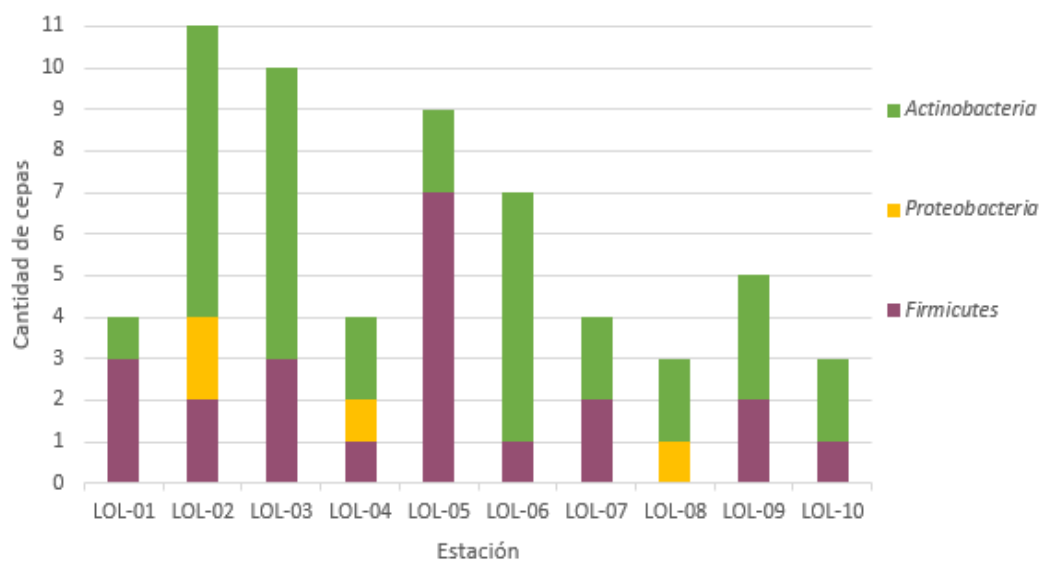


Figura 10. Distribución y abundancia de filos de cepas bacterianas.

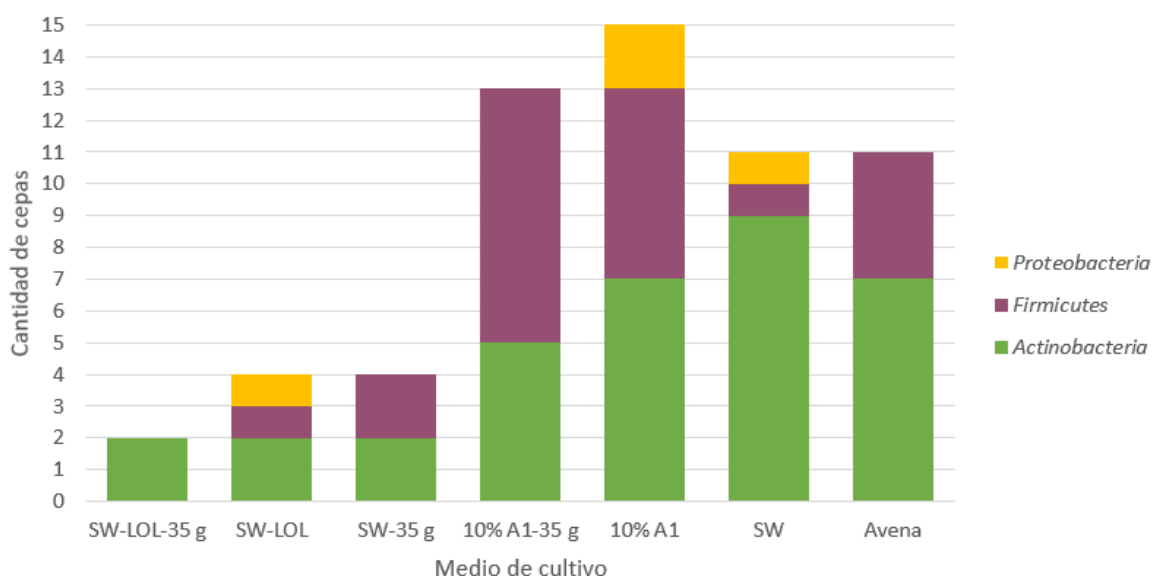


Figura 11. Abundancia de filos de cepas aisladas de acuerdo al medio de cultivo.

Del total de cepas aisladas durante las cuatro temporadas de muestreo se observa la representación de los 3 filos en solo dos estaciones de muestreo (LOL-02 y LOL-04). Se observó que las Actinobacterias estuvieron presentes en todas las estaciones, por lo que tienen una mayor distribución en la Laguna. El filo Firmicutes se observó en 9 de las estaciones de muestreo excepto por la estación LOL-08 (Fig. 12).

En septiembre de 2017 se lograron aislar bacterias de 9 estaciones, representantes de los 3 filos; siendo el filo Actinobacteria el de mayor distribución en 7 estaciones de muestreo (Fig. 13). En la estación LOL-01 (boca de la laguna) solo se aislaron cepas del filo Actinobacteria; a diferencia de la estación LOL-05 (cabeza de la laguna) que solamente se aislaron Firmicutes (Fig. 13).

En noviembre 2017 solamente se aislaron bacterias de 7 estaciones de muestreo con una mayor distribución de Firmicutes. El filo Actinobacteria estuvo

representado en 3 estaciones (LOL-02, LOL-03 y LOL-04). En esta temporada tanto en la boca como la cabeza de la laguna solamente se lograron aislar bacterias del filo Firmicutes (Fig. 14).

En febrero de 2018 se aislaron bacterias de 6 estaciones de muestreo, siendo el filo Actinobacteria el de mayor distribución en 5 estaciones (Fig. 15). En esta temporada no se lograron aislar Proteobacterias en ninguna estación de muestreo. En cuanto a la distribución de bacterias en la boca de la laguna, en esta temporada solo se observaron cepas de Firmicutes en la cabeza de la laguna (Fig. 15).

En la última temporada de muestreo, junio de 2018, se lograron aislar bacterias de 8 estaciones; de las cuales en 6 estaciones tenemos representantes del filo Actinobacteria. En esta temporada se observa la presencia de Proteobacterias en una estación de muestreo (Fig. 16). Tanto en la boca como en la cabeza de la laguna se observa la presencia de Firmicutes. En esta temporada se lograron aislar actinobacterias en la cabeza de la laguna (Fig. 16).

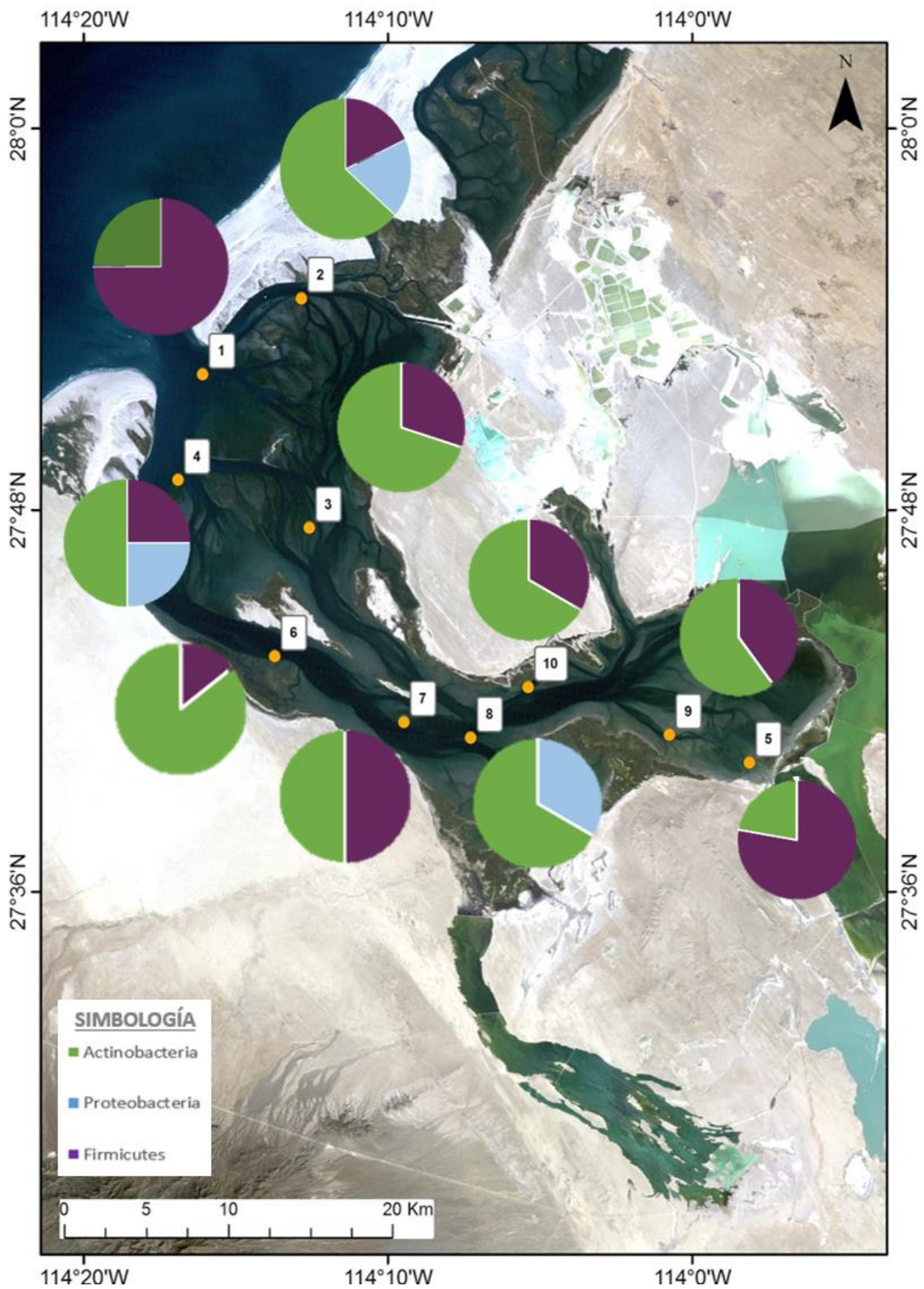


Figura 12. Mapa de distribución del total de bacterias aisladas en las 4 temporadas de muestreo.

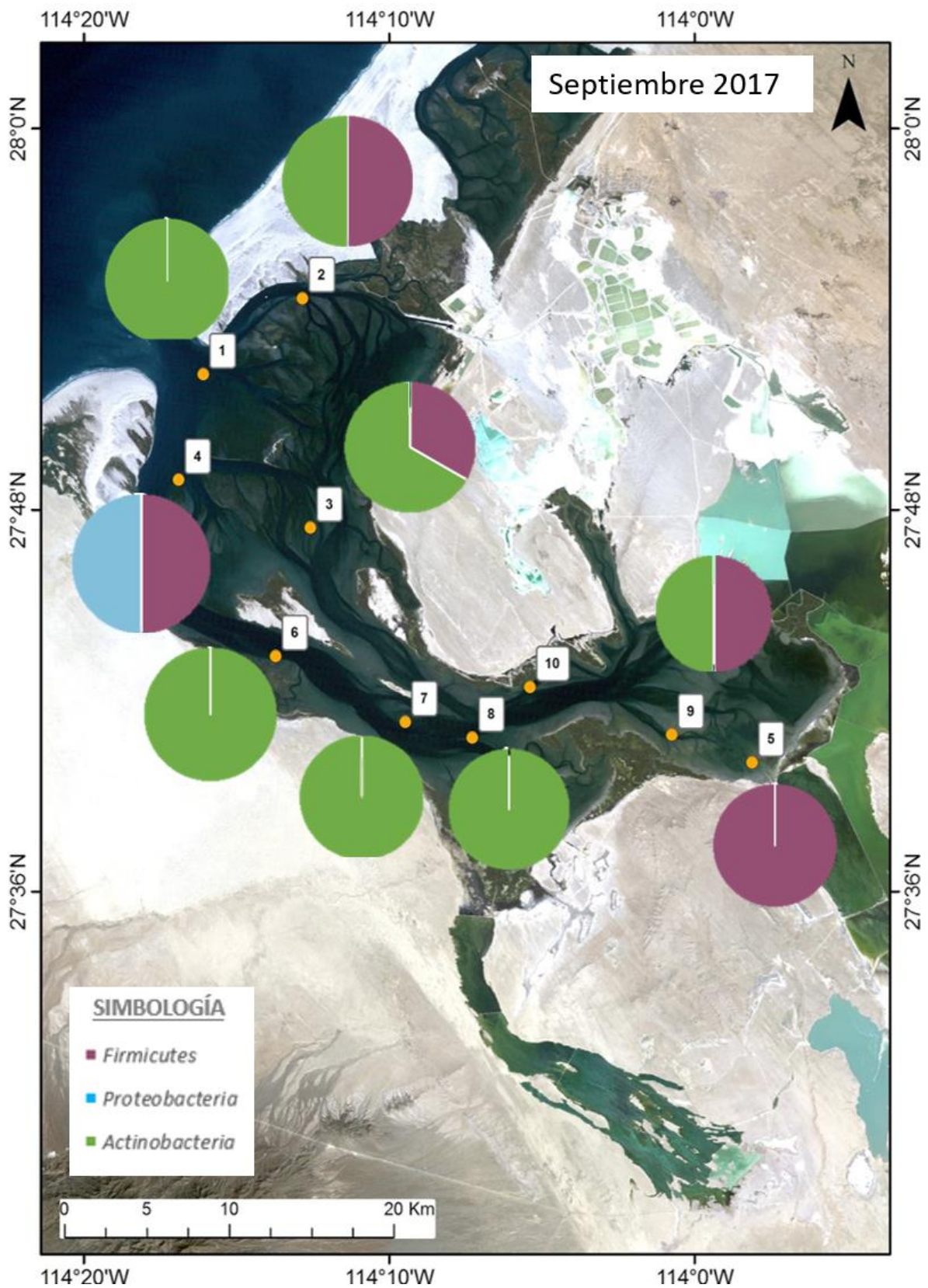


Figura 13. Mapa de distribución de bacterias aisladas de la temporada de muestreo septiembre de 2017.

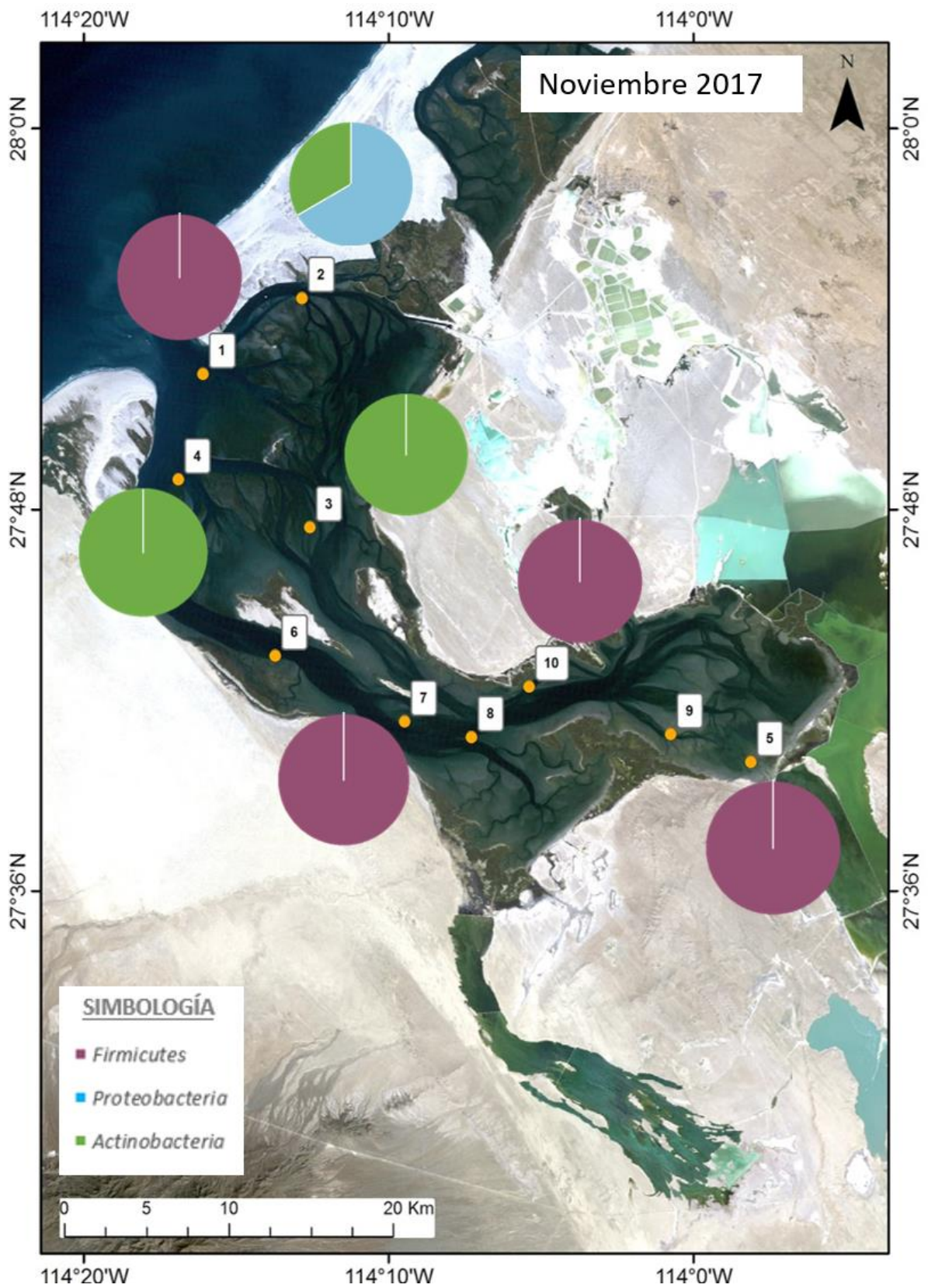


Figura 14. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo noviembre de 2017.

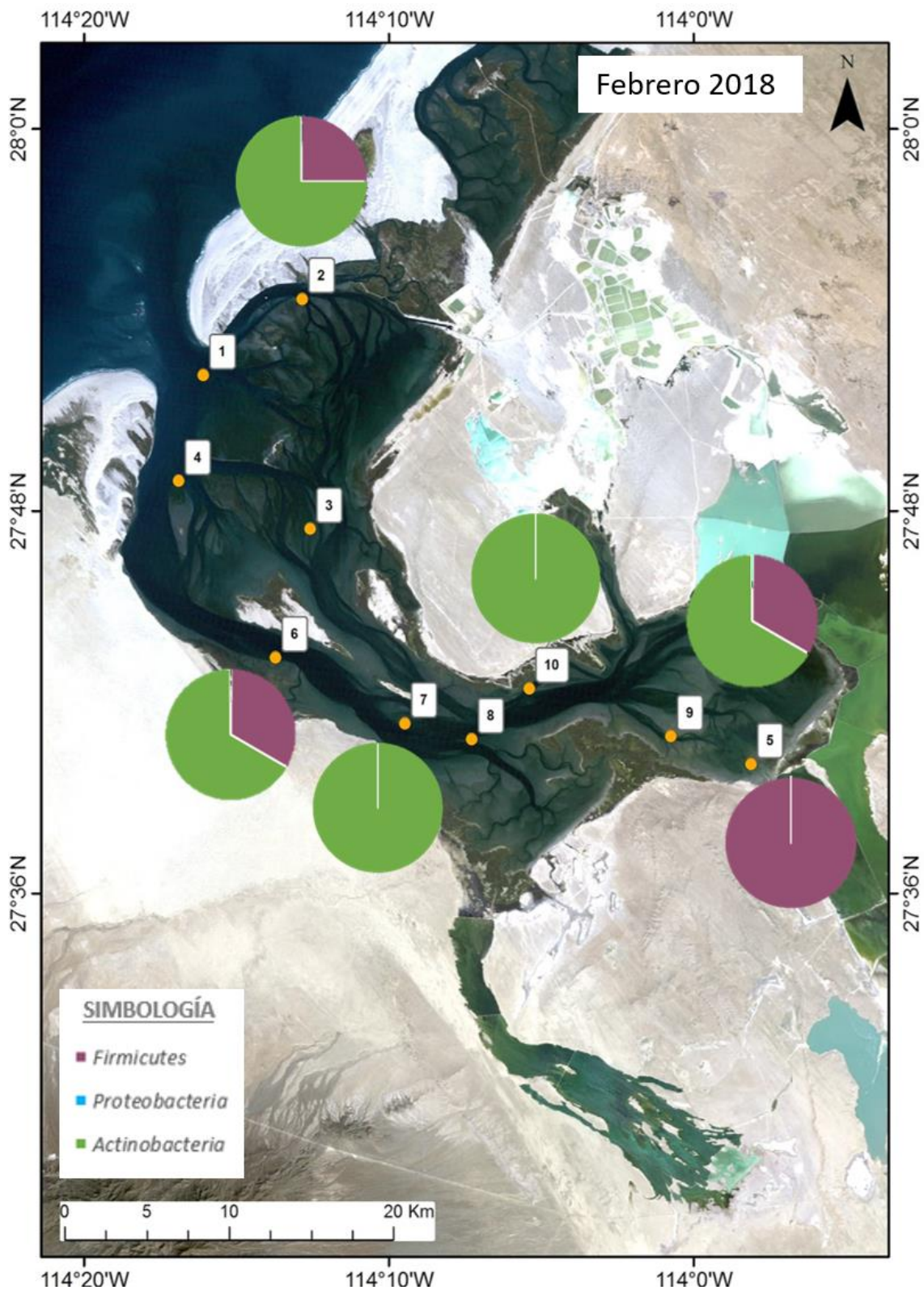


Figura 15. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo febrero de 2018.

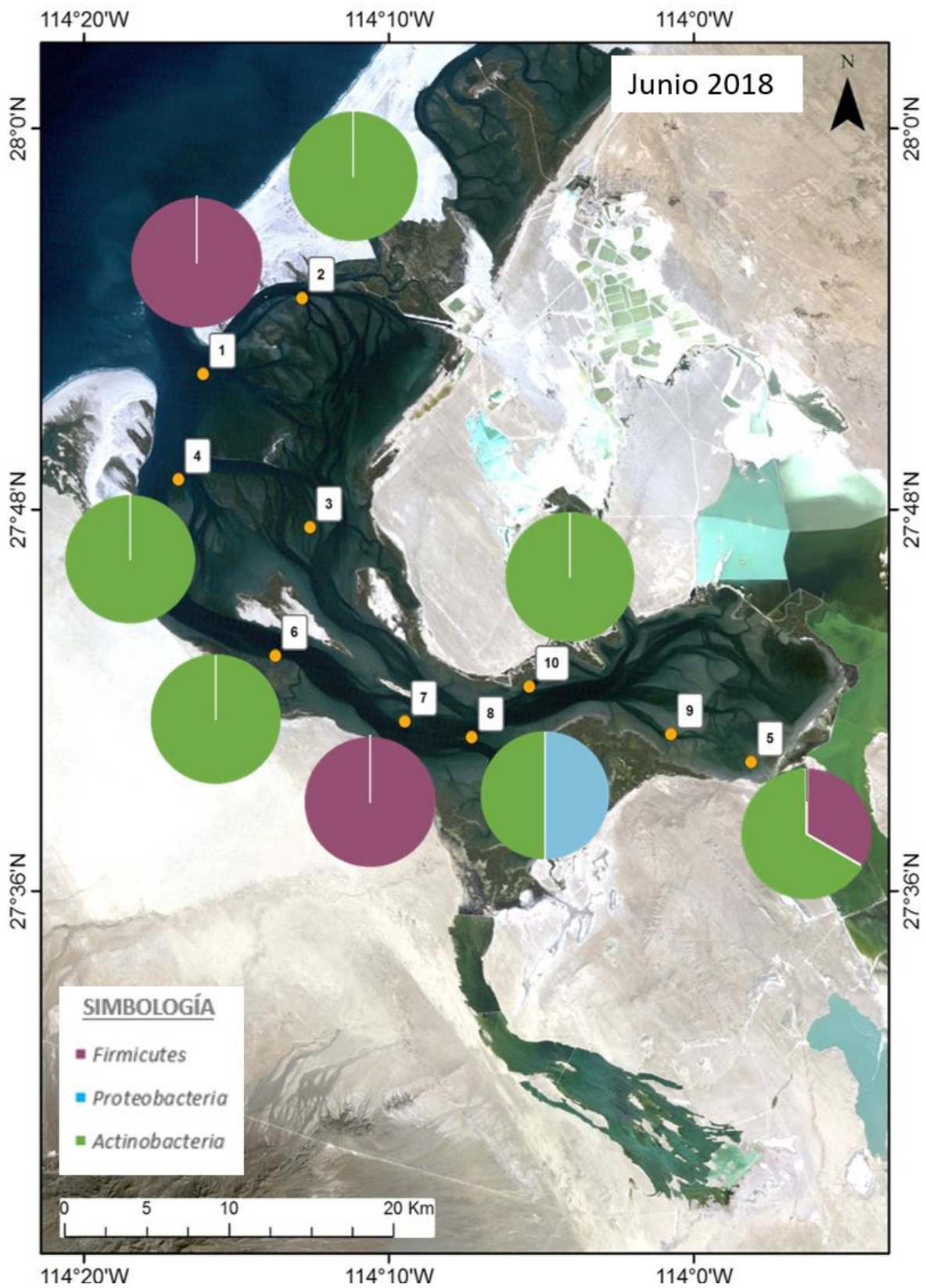


Figura 16. Mapa de distribución de cepas de bacterias aisladas de la temporada de muestreo junio de 2018.

De las 34 cepas que pertenecen al filo Actinobacteria, se identificaron 10 géneros: *Blastococcus*, *Pseudokineococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Xiangella*, *Arthrobacter*, *Nocardiopsis*, *Plantactinospora*, *Actinomadura* y *Micromonospora* (Fig. 17). El género con mayor abundancia fue *Micromonospora* con 14 cepas aisladas. Cinco géneros de actinobacterias cuentan con sólo una cepa aislada: *Blastococcus*, *Pseudokineococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Xiangella* (Fig. 17).

Respecto a los distintos medios de cultivo utilizados, donde se aisló la mayor abundancia de cepas (9 cepas) fue con el medio SW (Fig. 18). Sin embargo, dicho medio de cultivo no logró obtener la mayor diversidad, ya que sólo se identificaron tres distintos géneros de Actinobacterias. El medio de avena logró obtener la mayor diversidad con 6 diferentes géneros de Actinobacterias. En cambio, el género *Micromonospora* se aisló en la mayoría de los medios de cultivo, con excepción del medio de cultivo SW-35 gr (Fig. 18).

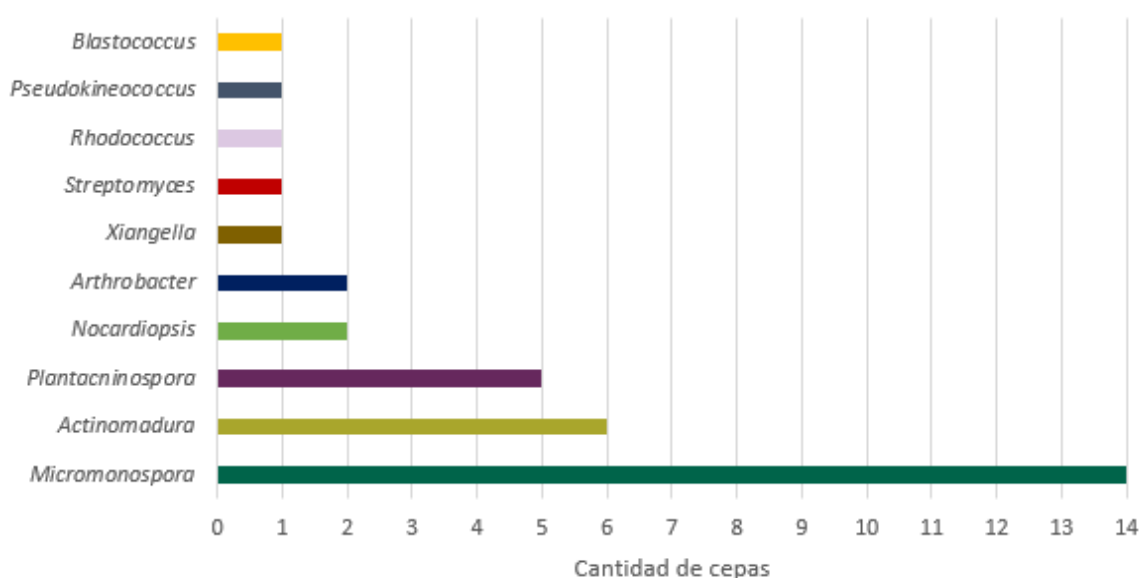


Figura 17. Relación de cepas de acuerdo al filo Actinobacteria.

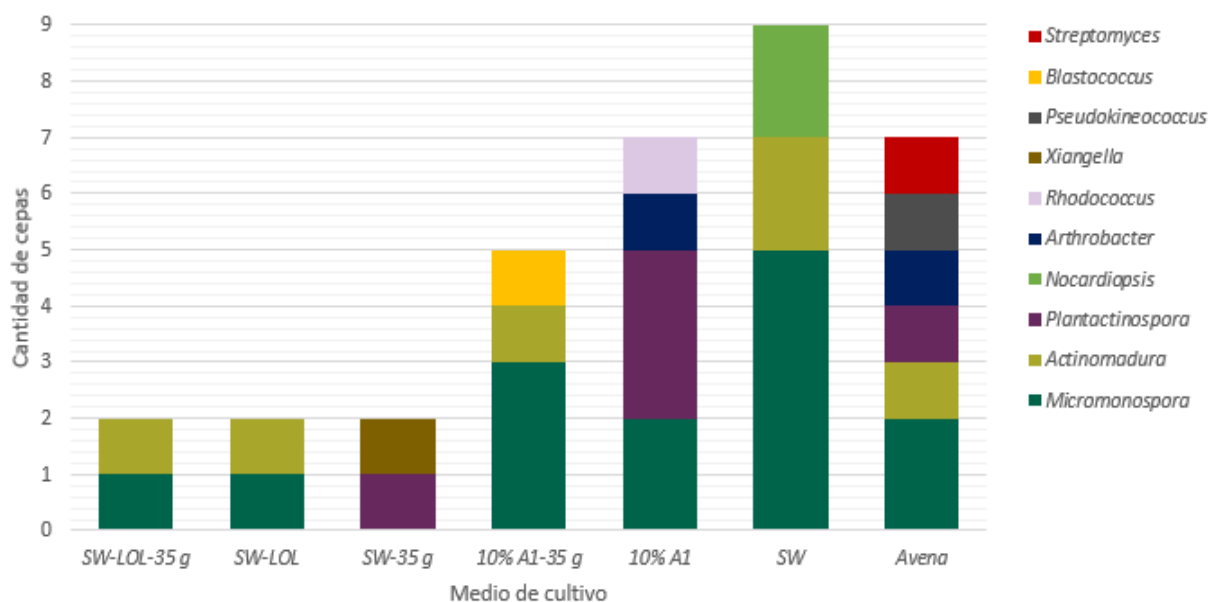


Figura 18. Distribución de Actinobacterias de acuerdo al medio de cultivo.

La distribución y abundancia de Actinomicetos por temporada fue variable. Se observó la presencia de *Micromonospora* en todas las estaciones durante las cuatro temporadas de muestreo. La estación con mayor diversidad y abundancia fue LOL-02, con 7 cepas representadas en cinco distintos géneros de actinomicetos: *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Plantactinospora* y *Blastococcus*. En contraste, la estación con menor abundancia fue LOL-01, con sólo una cepa de *Micromonospora* aislada (Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21 y Fig. 22).

La temporada de septiembre fue la más abundante con 14 cepas aisladas (Fig. 19); a diferencia de la temporada de noviembre con sólo 3 cepas (Fig. 20). En la temporada de febrero y junio de 2018 se observó la mayor diversidad con 5 géneros aislados (Fig. 21, Fig. 22).

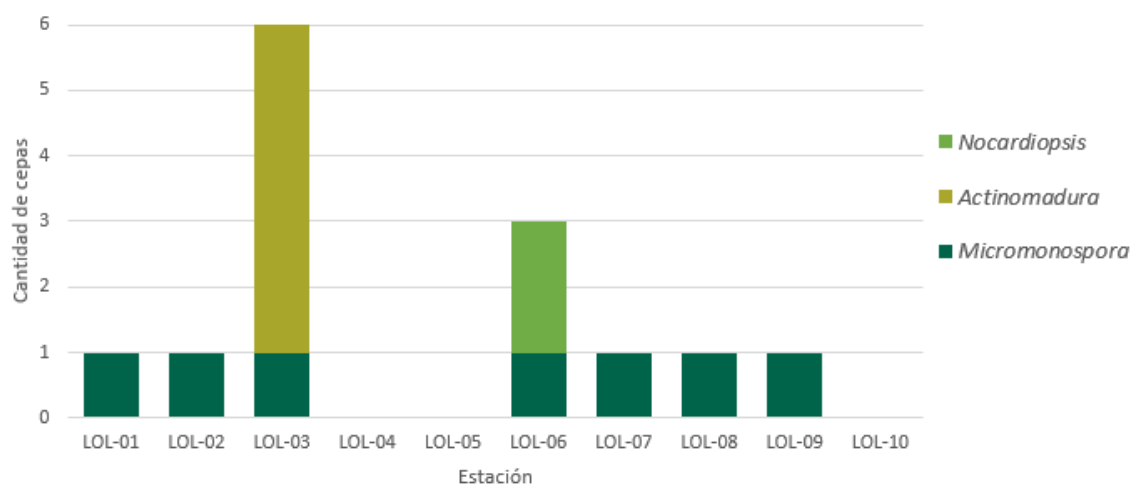


Figura 19. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada septiembre del 2017.



Figura 20. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada noviembre del 2017.

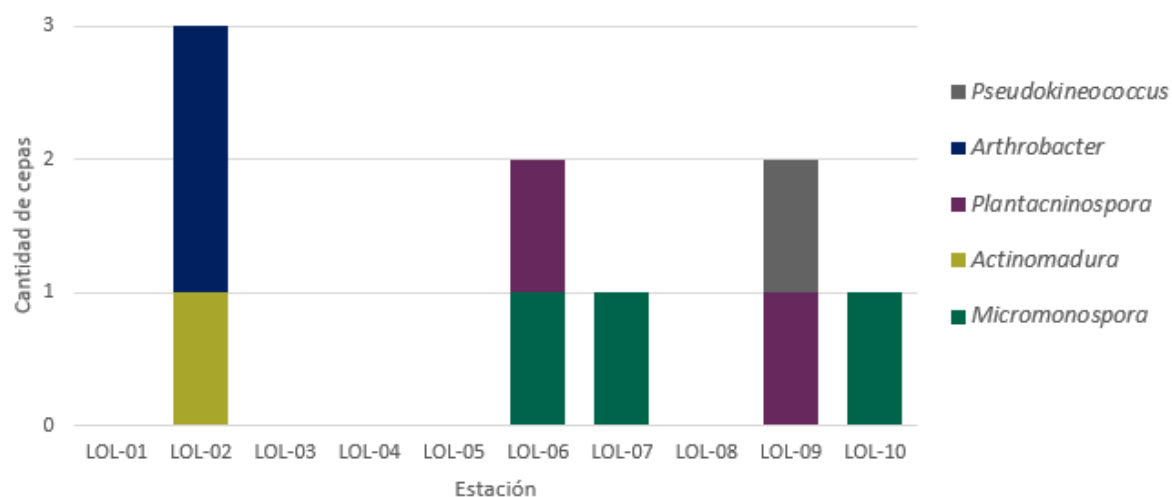


Figura 21. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada febrero del 2018.

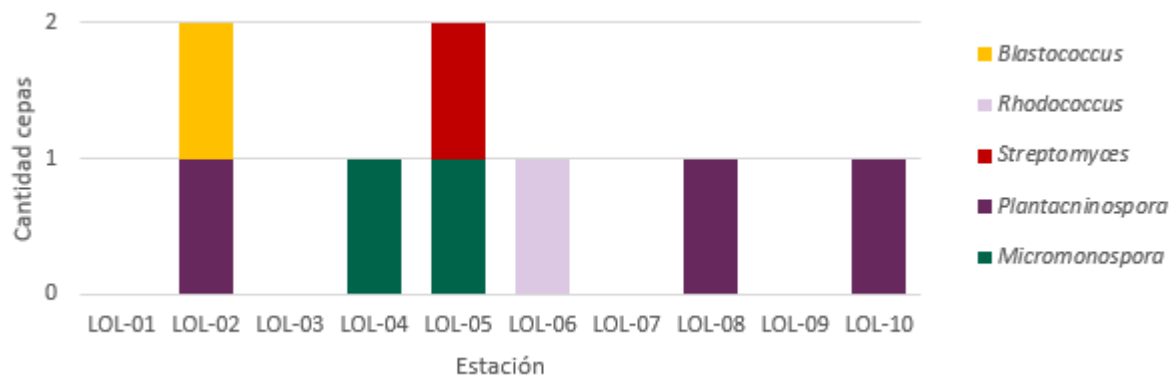


Figura 22. Distribución y abundancia de Actinobacterias en la temporada junio del 2018.

8. DISCUSIÓN

El aislamiento de bacterias de sedimentos de la Laguna de Ojo de Liebre (Fig. 1) nos dio la oportunidad de explorar una gran diversidad morfológica de las cepas aisladas, su distribución y abundancia en las diferentes temporadas de muestreo.

En este estudio, se aislaron 64 cepas de bacterias con morfología de interés (Fig. 4). De las 64 cepas aisladas sólo se pudieron identificar molecularmente 60 cepas. Las cuatro cepas no identificadas (LOL-048, LOL-057, LOL-059 y LOL-063) (Fig. 4; Tabla IV) se podrían considerar como miembros del filo Actinobacteria debido a su morfología, ya que presentan textura rugosa y, en particular, las cepas LOL-057 y LOL-063 con la presencia de esporas blancas y negras, respectivamente (Fig. 4).

Las 60 cepas fueron identificadas molecularmente perteneciendo a tres filos del dominio bacteria: Proteobacteria (7%), Firmicutes (36%) y Actinobacteria (57%) (Fig. 9). La distribución de dichos filos en la laguna fue variable a lo largo de las estaciones, así como las condiciones de temperatura y salinidad también variaron en las diferentes temporadas (Tabla I).

La boca de la Laguna Ojo de Liebre tiene mayor interacción con las corrientes marinas a comparación con la cabeza de laguna. Si analizamos la distribución de nuestras estaciones, podemos observar que las estaciones LOL-01, LOL-02 y LOL-04 podrían considerarse como parte de la boca de la laguna, a diferencia de las estaciones LOL-05 y LOL-09 como parte de la cabeza de la laguna (Fig. 2). Si comparamos las dos estaciones más representativas tanto de la boca como la cabeza de la laguna, la estación LOL-01 (boca de la laguna) tiene temperaturas promedio de

20.26°C con una salinidad promedio de 3.44%. En dicha estación se aislaron bacterias del filo Firmicutes (3 cepas) y Actinobacterias (1 cepa) (Fig. 13-16). En cambio, la estación LOL-05 con promedio de temperatura de 21.09°C y salinidad promedio de 4.24% ppm se aislaron bacterias del filo Firmicutes (7 cepas) y Actinobacterias (2 cepas); lo que hace de gran interés este tipo de bacterias aisladas en la estación con mayor concentración de salinidad de la laguna.

Los ambientes hipersalinos, son en general medios inhóspitos para los seres vivos, por lo que la diversidad de microorganismos halófilos ha sido poco estudiada (Meseguer, 2004). De acuerdo a Meseguer (2004), los microorganismos más abundantes en estos ambientes se encuentran las fototróficas (*Cianobacterias*), fototróficas anaerobias, bacterias gram negativas anaerobias y bacterias gram positivas (*Halobacillus*, *Bacillus* y algunos actinomicetos). En este estudio, se lograron aislar bacterias del género *Hallobacillus* (12% de las cepas aisladas) y *Bacillus* (20% de las cepas aisladas), siendo los dos géneros más abundantes en la Laguna Ojo de Liebre (Fig. 8). El 63% de las cepas pertenecientes al género *Bacillus* y el 37% de las cepas de *Halobacillus* se aislaron del medio 10% A1-35 gr. Cabe señalar que dicho medio tiene una alta concentración de sal marina (35 gr); además dichas cepas fueron aisladas de la estación LOL-05 que pertenece a la cabeza de la laguna con altas salinidades (Tabla I).

La temporada de la ballena gris en la Laguna Ojo de Liebre empieza en diciembre y termina a mediados de abril. En su estadía, las ballenas grises se alimentan de invertebrados que se encuentran en el sedimento marino, provocando una remoción del mismo (Swartz, 2018). Dicho proceso puede provocar una mezcla

entre las comunidades de microorganismos de la columna de agua con los que habitan en el sedimento marino. Los actinomicetos son un grupo de bacterias que habitan los sedimentos marinos, observamos que la mayor cantidad de géneros aislados fue durante y después de la temporada de ballena (febrero y junio) con 5 géneros respectivamente (Fig.19 - Fig. 21).

La distribución de Actinobacterias en septiembre del 2017 (Fig. 13), se distingue que en la boca de la Laguna (LOL-01) se aisló el 100% de actinobacterias; mientras que, en noviembre del 2017, febrero y junio del 2018 no se aislaron cepas pertenecientes a este filo en dicha zona (Fig. 14-16); mientras que en la cabeza de la Laguna (LOL-05) se aislaron cepas de actinomicetos hasta la temporada de junio del 2018 (Fig. 16).

En este estudio se lograron aislar 34 cepas de actinobacterias utilizando 7 medios de cultivo (Fig. 18) y representado 10 géneros (*Blastococcus*, *Pseudokineococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Xiangella*, *Arthrobacter*, *Nocardiopsis*, *Plantactinospora*, *Actinomadura* y *Micromonospora*). Torres *et al.* en 2012 utilizando 6 medios de cultivo logró aislar 235 cepas de actinobacterias de sedimentos marinos de Bahía de los Ángeles y Bahía Concepción. A pesar de que fue una mayor cantidad de cepas aisladas, solamente representan 3 distintos géneros (*Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*). En particular, el género *Streptomyces* fue el que tuvo una mayor abundancia con el 71% de las cepas (Torres *et al.*, 2012), a diferencia de nuestro estudio en el que solo se pudo aislar una sola cepa de *Streptomyces*, representando el 3% (Fig. 17). El género *Streptomyces* es uno de los géneros más comunes en los sedimentos marinos (Berdy, 2005), por lo cual sorprende

esta baja abundancia en nuestro estudio. Además de ser un género abundante en sedimentos, también son conocidos como los productores de la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana y/o animal, con más del 50 % de los compuestos bioactivos microbianos que se han descubierto en los últimos 50 años (Berdy, 2012). El haber aislado una sola cepa de *Streptomyces* en la estación con la mayor concentración de sal podría significar un potencial de producción de compuestos con actividad biológica.

Becerril en 2011, identificó un total de 139 cepas de actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de la Bahía Todos Santos, utilizando seis medios de cultivo y representando 9 géneros del filo Actinobacteria, lo que representa un género menos de los obtenidos en este estudio. *Salinispora* y *Streptomyces* fueron los géneros más abundantes encontrados por Becerril (2011) con un 43% y 31% respectivamente. Por lo cual se sigue observando una alta abundancia del género *Streptomyces* en estas muestras de sedimento a diferencia de lo encontrado en este estudio. El género de actinomiceto más abundante en la Laguna Ojo de Liebre fue *Micromonospora* con un 41%, seguido del género *Actinomadura* con un 18%. (Fig. 17). Castro (2014), aisló un total de 82 cepas de actinobacterias de muestras de sedimento marino del Pacífico Mexicano, Golfo de California y México, utilizando 6 medios de cultivo. Similarmente, logró aislar un 39% de cepas del género *Micromonospora* y un 5% del género *Actinomadura*.

Se denominan actinomicetos “raros” aquellos que no pertenecen al género *Streptomyces* y que han sido poco estudiados (Berdy, 2005). Schorn *et al*, (2016), evaluó el potencial de actinomicetos raros y observó que géneros como *Nocardiopsis*,

Pseudonocardia y *Actinomadura* presentan una alta diversidad de rutas metabólicas con potencial de producir compuestos con actividad biológica. Este trabajo aporta un gran potencial biotecnológico debido a que la mayoría de las cepas aisladas (97%) son consideradas como raras.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo el primer cepario de bacterias de la Laguna Ojo de Liebre del laboratorio de Nanobiotecnología marina ubicado en la Facultad de Ciencias Marinas, con un total de 60 cepas identificadas; pertenecientes a los 3 filos de bacterias más abundantes en sedimento marino: *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

El medio de cultivo 10% A1 fue el que mostró una mayor abundancia de cepas aisladas, siendo la estación LOL-02 la cual presentó la mayor abundancia de bacterias.

El mayor porcentaje de bacterias aisladas pertenece al filo Actinobacteria (57%) representadas con 10 géneros. El género más abundante fue *Micromonospora* con un 41% de las cepas identificadas. Solamente fue posible aislar una sola cepa del género *Streptomyces* en la estación LOL-05 que presenta la mayor salinidad.

En general, los actinomicetos fueron más diversos durante y después de la temporada de ballena gris, esto debido al movimiento generado por la resuspensión de sedimento marino por parte del proceso de alimentación de las ballenas.

Debido a que el mayor porcentaje de actinobacterias que se aislaron pertenecen a géneros de actinomicetos raros (97%) esto ayudará a futuros proyectos a investigar con tecnología de secuenciación los genomas de dichas cepas, que nos podrán ayudar a conocer su potencial de rutas metabólicas dedicadas a la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica.

10. REFERENCIAS

Alcolado, P. M. (2007). La biodiversidad marina de Cuba “Los Metazoos – Reino animal. Esponjas- Filo Porifera” Sitio web: Researchgate, Capítulo III, pp: 87-93.

Alexander, M. (1999). Environmental effects. En: Alexander M (ed). Biodegradation and bioremediation 13: 226-247. Academic Press, San Diego.

Battistuzzi, F.U. & S.B. Hedges. (2008). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. Molecular biology and evolution, 26: 335-343.

Becerril Espinosa Amayali. (2011). Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa . Universidad Autónoma de Baja California: Facultad de Ciencias Marinas, Doctorado en ciencias de oceanografía costera.

Berdy J., (2005), Bioactive Microbial Metabolites, The Journal of Antibiotics, 58(1): 1–26.

Berdy J., (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J. Antibiot (Tokyo), 65, 385–395.

Boschker, H.T.S., W.D. Graaf., M. Köster., L.A. Meyer-Reil and T.E. Cappenberg. (2001). Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. Microbiology Ecology 35: 97-103.

Botella-Grau, M. S. (2000). Detección y caracterización molecular de *Campylobacter* y *Arcobacter* en aguas y alimentos. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia. 227 pp.

Bull, A.T. & J.E. Stach. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in microbiology*, 15: 491-499.

Castro Ochoa Fátima Yadira. (2014). Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios. Universidad Autónoma de Baja California: Facultad de Ciencias Marinas, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Posgrado en Oceanografía Costera.

Conde, D., Rodríguez-Gallego, L., and Rodríguez-Graña, L. (2003). Análisis conceptual de las Interacciones abióticas y biológicas entre el océano y las lagunas de la costa atlántica de Uruguay. Reporte final FrePlata, Secc. Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República: 76pp.

Contreras, F. (1985). Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo, Secretaría de Pesca, México DF, 265 pp.

De La Cruz-Agüero, J., Arellano-Martínez, M., Cota-Gómez, V. M. (1996). Lista sistemática de los peces marinos de las lagunas ojo de liebre y Guerrero negro, B.C.S y B.C, México. *Ciencias Marinas* 22(1): 11-128.

Eichbaum, W., Crosby, M., Agardy, M. and Laskin, S. (1996). The role of marine and coastal protected areas in the conservation and sustainable use of the biological diversity. *Oceanography* 9: 60-70.

Escobar, E. (2000) Diversidad biológica del mar profundo, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Sistemas Oceanográficos y Costeros, Laboratorio de Biodiversidad y Macroecología, A.P. 70-305 Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F.

Faulkner, D.J. (2002). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19:1-48

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66: 365-378.

Galina, P., Cárdenas, A.S., Romero, A.G. y Gallina, S. (1991). Aspectos generales sobre la fauna de vertebrados. En: A. Ortega. *Ciencias Marinas*: 22:1. y L. Arriaga (eds.), *La Reserva de la Biosfera El Vizcaíno en la Península de Baja California*, pp. 177-191.

Giordano, P., Musmeci, L., Ciaralli, L., Vernillo, S., Chirico, S., Piccioni, S., Constantini, S. (1992). *Marine Pollution Bulletin*. 24:350.

González, E., Ahumada, R., Medina, V., Neira, J., y González, U. (2004). Espectrofotometría de absorción atómica con tubo en la llama: aplicación en la

determinación total de cadmio, plomo y zinc en aguas frescas, agua de mar y sedimentos marinos. Quim. Nova, 27(6), 873-877.

Gutiérrez Almada Karla María. (2018). Bacterias asociadas a sistemas hidrotermales someros marinos en Baja California sur con capacidad para producir compuestos inhibidores de biopelículas. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Maestría en Ciencias de Recursos Marinos.

Jensen, P.R., E. Gontang, C. Mafnas, T.J. Mincer & W. Fenical. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environmental microbiology, 7: 1039-1048.

Jensen, P. R., Moore, B. S., & Fenical, W. (2015). The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural product reports*, 32(5), 738-751.

Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B., y D.C. White. (1997). Survival and phospholipids fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. Applied and Environmental Microbiology 63: 1531-1542.

Mann, K. H. (2000). Ecology of coastal waters with implications for management. Blackwell Science.

Martín Sánchez Inés. (2010). Proteobacterias-Diversidad microbiana y taxonómica Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada Sitioweb:

https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=145&Itemid=105

Meseguer Soria Inmaculada. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigación. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM, VII (2), I.S.S.N. 1561-0861.

Miravet Regalada María Elena, Lugioyo Gallardo Gladys M., (2007). La biodiversidad marina de Cuba “Bacterias- Dominios Bacteria y Arquea”. Sitio web: Researchgate, Capítulo III, pp: 63-68.

Morales, M., Ortiz, E., Caballero, V., Núñez, R. (2010). El funcionamiento de la colección de bacterias marinas, Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente. No.19. ISSN-1683-8904.

Pucci, G. N., Acuña, A. J., Llanes, M. L., Tiedemann, M. C., y Pucci, O. H. (2009). Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. Revista de biología marina y oceanografía, 44(1), 49-58.

Quintero Rendón, L. A., Agudelo, E. A., Quintana Hernández, Y. A., Cardona Gallo, S. A., y Osorio Arias, A. F. (2010). Determinación de indicadores para la calidad de agua, sedimentos y suelos, marinos y costeros en puertos colombianos. Gestión y Ambiente, 13(3).

Robles-Alonso Virginia, Guarner Francisco, (2013), Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana, Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Barcelona. España., *Nutrición Hospitalaria*, ISSN 0212-1611; 28(3):553-557.

Swartz, S. L. (2018). Gray Whale: *Eschrichtius robustus*. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 422-428). Academic Press.

Schorn Michelle A., Alanjary Mohammad, Aguinaldo Kristen, Korobeynikov Anton, Podell Sheila, Patin Nastassia, Lincecum Tommie, Jensen Paul R., Ziemert Nadine, Moore Bradley S., (2016), Sequencing rare marine actinomycete genomes reveals high density of unique natural product biosynthetic gene clusters, *Microbiology*; DOI 10.1099/mic.0.000386; 162, 2075-2086.

Secretaría de Desarrollo (1992). Datos básicos 1992: Baja California Sur. Secretaría de Desarrollo, Gobierno del Estado de Baja California Sur, La Paz, BCS, 339 pp.

Torres-Beltrán M, Cardoso-Martínez F, Millán-Aguiñaga N, Becerril-Espinosa A, Soria-Mercado IE. (2012). Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Ciencias Marinas*, 38(4), 609–624.

Weyland, H. (1969). Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments. *Nature*, 223: 858-858.