

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE LA  
COLUMNA DE AGUA EN LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

TESIS

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

**AILEEN AIDOLE PIMENTEL CABRERA**

Ensenada, Baja California, México  
Febrero 2025

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE LA COLUMNA  
DE AGUA EN LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

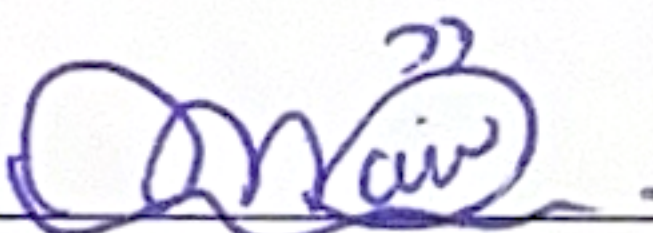
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

**AILEEN AIDOLE PIMENTEL CABRERA**

Aprobada por:



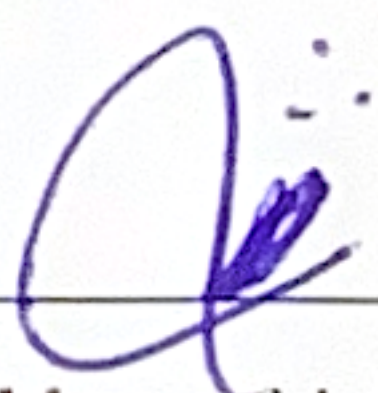
Dra. Mónica Torres Beltrán

Directora de tesis



Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Co-directora de tesis



Dr. Jorge Manuel López Calderón

Sinodal



Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras

Sinodal

***DEDICATORIA:***

*A todas las mujeres en la ciencia. Que este trabajo sea un  
reconocimiento a su esfuerzo y dedicación.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi familia, cuyo apoyo ha sido fundamental a lo largo de este proceso, y especialmente a mi madre, la Dra. Rebeca Cabrera Rivera por ser una fuente constante de inspiración.

A mi comité de sinodales, el Dr. Jorge Manuel López Calderón y la Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras, por su tiempo, conocimientos y valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo. A mi codirectora, la Dra. Natalie Millán Aguiñaga, por su orientación y por compartir sus conocimientos, siempre brindando una perspectiva valiosa para este estudio y a mi directora, la Dra. Mónica Torres Beltrán, por su paciencia, dedicación y guía durante este proceso. Su compromiso y acompañamiento fueron clave para la culminación de esta investigación.

A mis amigas, por su apoyo, su compañía en los momentos buenos y malos, y por los recuerdos inolvidables que hicieron este recorrido mucho más ameno.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada, que me permitió dedicarme a mis estudios. Asimismo, a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), que fueron mi hogar académico y me brindaron las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

A todos ustedes, mi gratitud infinita.

## RESUMEN

La Laguna Ojo de Liebre, ubicada en Baja California Sur, México, es un ecosistema hipersalino único de gran relevancia ecológica, económica y cultural, reconocido como Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO. Este entorno alberga una gran biodiversidad, incluyendo comunidades microbianas esenciales para los ciclos biogeoquímicos que sostienen su equilibrio ecológico. El objetivo de este estudio es determinar cómo las variaciones fisicoquímicas temporales y espaciales (salinidad, temperatura y profundidad) afectan la composición y estructura de la comunidad microbiana procariota en la columna de agua de la laguna. A través del análisis de secuencias de amplicones del gen 16S ARNr se identificaron taxones dominantes pertenecientes a los filos Bacteroidota, Pseudomonadota y Actinobacteriota, entre otros. Los resultados destacan una alta diversidad microbiana y variaciones en la composición de la comunidad espacio-temporales significativas relacionadas con gradientes de temperatura y salinidad, destacando en los meses de agosto y noviembre. Asimismo, se observó que la temperatura es la variable que tiene mayor influencia en la estructura de la comunidad. También, se observó una contribución notable de taxones raros a la diversidad total, lo que sugiere una alta complejidad ecológica. La inferencia metabólica mostró genes y rutas metabólicas relacionadas con ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrógeno y azufre), biosíntesis de aminoácidos, vitaminas y metabolitos secundarios, además de la degradación de contaminantes como hidrocarburos y xenobióticos. Estas funciones resaltan el potencial de estas comunidades para influir en los flujos de energía y nutrientes del ecosistema. Este proyecto es crucial para generar una línea base de conocimiento sobre las comunidades microbianas de la Laguna Ojo de Liebre, proporcionando información que servirá como punto de partida para futuras investigaciones y una comprensión más profunda de los procesos ecológicos que sostienen la función de este ecosistema.

Palabras clave: comunidades microbianas procariotas, análisis de amplicones, metabolismo microbiano, Laguna Ojo de Liebre.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<i>4.1 Objetivo General</i> .....	12
<i>4.2 Objetivos particulares</i> .....	12
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>13</b>
<i>5.1 Muestreo en campo</i> .....	13
<i>5.2 Análisis molecular</i> .....	13
<i>5.3 Análisis bioinformáticos de secuencias de amplicones de 16S ARNr</i> .....	14
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<i>6.1 Parámetros fisicoquímicos</i> .....	16
<i>6.2 Estructura de la comunidad procariota y su relación con variables ambientales</i> .....	16
<i>6.4 Variaciones espacio-temporales en la composición de la comunidad</i> .....	24
<i>6.5 Inferencia de metabolismo</i> .....	27
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>44</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estaciones de muestreo en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. ....	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Dendrograma de agrupación jerárquica utilizando la distancia de Manhattan.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras en diferentes meses.....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Composición taxonómica espacial de las AVSs identificadas en el muestreo 2021-2022.....	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Composición taxonómica temporal de las AVSs identificadas en los periodos 2021-2022.....	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Composición temporal de los taxones raros de las AVSs en los periodos 2021-2022.....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Gráfica de cajas y bigotes representando la diversidad temporal con el índice de Shannon.....	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Composición espacial y temporal de taxones microbianos abundantes en estaciones de muestreo.....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Composición de taxones microbianos “raros” en estaciones de muestreo durante dos épocas del año.....	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Clasificación de genes relacionados con categorías de metabolismo en la Laguna Ojo de Liebre.....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Clasificación de rutas metabólicas inferidas para la comunidad de la Laguna Ojo de Liebre.....	<b>29</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Valores de correlación y significancia en relación a los factores fisicoquímicos y las muestras del análisis de coordenadas principales (PCoA).....	<b>19</b>
---	-----------

## 1. INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas consisten en microorganismos que se relacionan y desempeñan una variedad de funciones en un espacio definido por factores físicos y químicos del entorno ambiental, donde encuentran las condiciones necesarias para su supervivencia (Begon et al. 2006; Callieri *et al.* 2018; Díaz y Wachter 2003). A diferencia de una población, que incluye sólo individuos de la misma especie que se encuentran metabólicamente relacionados, una comunidad no se define por la filogenia o los rasgos funcionales asociados a ésta sino por su hábitat. Por lo tanto, una comunidad microbiana puede definirse como un conjunto de especies microscópicas coexistentes y potencialmente interactuantes, presentes en un hábitat definido en el espacio y el tiempo (Callieri *et al.* 2018).

Estas comunidades microbianas se caracterizan por estar compuestas de microorganismos que no son visibles a simple vista (convencionalmente, menos de 1 mm), incluyendo representantes de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya (Callieri *et al.* 2018). Para abordar el estudio de las comunidades microbianas de primera instancia se utilizan dos variables, principalmente: la composición y la estructura. La composición se refiere a la descripción del conjunto de especies que integran a la comunidad, permitiendo definir cuántas y cuáles especies están presentes. Por otro lado, la estructura se refiere a la distribución y abundancia de las especies, así como a los roles que desempeñan y las interacciones que existen entre ellas (Roy, 2017).

Para la evaluación de estas variables es necesario seguir una serie de pasos complementarios entre sí, comenzando con la identificación de especies. El concepto de especie para procariotas se ve obstaculizada por varios rasgos, incluida su morfología poco desarrollada y el hecho de que la gran mayoría de estos organismos permanecen sin cultivar y, por lo tanto, se sabe poco sobre su fisiología y comportamiento (Callieri *et al.* 2018). La principal fuente de información sobre la diversidad de bacterias y arqueas deriva de estudios ambientales de secuencias de ADN (Callieri *et al.* 2018). Las especies a menudo se definen a través de umbrales de similitud de secuencias marcadoras, como el 97% de similitud en el gen 16S ARNr o el 95-96% de similitud en el ANI (Average Nucleotide Identity). Las OTUs (Operational

Taxonomic Units) agrupan secuencias bacterianas con una similitud mayor al 97%, facilitando el análisis de la diversidad microbiana, aunque con resolución limitada. Las ASVs (Amplicon Sequence Variants), en cambio, identifican variantes exactas de secuencias sin agruparlas por similitud, ofreciendo una mayor precisión y reproducibilidad en los estudios de diversidad microbiana (Valenzuela-González *et al.*, 2015). Por lo que actualmente, la información que principalmente se genera sobre la diversidad de bacterias y arqueas, considerando la variación genética y genómica de una comunidad es representada en OTUs o ASVs. Como se mencionó anteriormente, para definir los taxones que constituyen una comunidad se utilizan secuencias marcadoras como el ARNr de subunidad pequeña (16S para procariontes), obtenidas mediante plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) (Smith & Brown, 2021). Estas secuencias se analizan con herramientas bioinformáticas para asegurar su calidad, ensamblarlas, agruparlas en secuencias representativas (i.e. ASVs), anotarlas y asignarles taxonomía utilizando bases de datos integradas por secuencias de referencia para el gen 16S ARNr, como SILVA o Greengenes (Callieri *et al.* 2018)). Posterior a la definición de la composición de la comunidad, las aproximaciones esenciales para la evaluación de la estructura comienzan con conocer la diversidad y la agrupación jerárquica que resulta de la diferencia en la composición microbiana a comparar. En cuanto a la evaluación de la estructura de la comunidad microbiana, una vez realizada la identificación taxonómica de los microorganismos se cuantifican y comparan los diferentes taxones presentes en un ambiente o gradiente, con el propósito de entender su relación entre sí y con el ambiente. Por ejemplo, el uso de métricas de diversidad nos permite evaluar la variación de especies en un mismo ambiente en escalas espacio temporales o bien entre ambientes distintos. Con respecto al análisis de diversidad, se puede considerar la diversidad alfa, que se refiere a la variedad de especies en un área específica y se mide considerando cuántas especies hay y cómo se distribuyen los individuos entre ellas. Este concepto se considera crucial en la ecología porque nos ayuda a entender cómo funcionan y se estructuran los ecosistemas. Para medir la diversidad alfa, se utilizan varios índices. La riqueza de especies (S) cuenta cuántas especies hay en un área (Chao *et al.*, 2014). El índice de Shannon (H') considera tanto el número de especies como la distribución de los individuos, ayudando a entender la diversidad y equitatividad en la comunidad (Jost, 2006). El índice de Simpson (D) mide la probabilidad de

que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie, con valores más bajos indicando mayor diversidad (Magurran & McGill, 2011). Por último, el índice de equitatividad de Pielou (J') mide cuán uniformemente están distribuidos los individuos entre las diferentes especies (Tuomisto, 2012). Estos índices nos permiten analizar la diversidad alfa en distintos contextos ecológicos, ayudando a comprender mejor la complejidad y dinámica de los ecosistemas.

Además, los análisis de agrupación jerárquica en combinación con métodos multivariantes como el análisis de principales coordenadas (PCoA) y los principios de disimilitud facilitan análisis más precisos y fáciles de interpretarse; para visualizar las diferencias entre comunidades, y poder hacer inferencias en contextos ecológicos para identificar patrones y diferencias en la composición microbiana. Por ejemplo, la disimilitud mide cuán diferentes son dos muestras usando métricas como la distancia de Bray-Curtis o la euclidiana, mientras que las agrupaciones jerárquicas organizan estos datos en un dendrograma, mostrando cómo se relacionan los grupos entre sí y el PcoA; por su parte, reduce la complejidad de los datos, proyectando las muestras en un espacio más simple donde las distancias entre puntos reflejan sus diferencias originales (Lozupone y Knight, 2005; McMurdie y Holmes, 2013; Weiss *et al.*, 2017). En combinación, el estudio de estas variables nos permite comprender la relación entre factores fisicoquímicos y los microorganismos, y por lo tanto el papel que juegan éstos en un medio ambiente.

A pesar del pequeño tamaño de estos organismos, los microorganismos son clave para la dinámica ecológica de la biosfera debido a la relación estrecha que ocurre entre la composición, estructura y metabolismo de las comunidades microbianas y los ciclos biogeoquímicos del planeta. Por ejemplo, la diversidad filogenética y genómica de las comunidades microbianas permiten que se lleven a cabo funciones metabólicas que resultan un componente crucial en la producción y el reciclaje continuos de materia orgánica y nutrientes que favorecen los flujos de energía entre distintos niveles tróficos y además median una variedad de transformaciones biogeoquímicas. Por ejemplo, en los ecosistemas acuáticos, la comunidad microbiana procariota desempeña un papel fundamental en el flujo de energía a través del "bucle microbiano", al conectar los ciclos del carbono y los nutrientes con los niveles

superiores de la red trófica (Buchan *et al.*, 2014). Esto se debe a que una parte de la comunidad procariota (bacterias heterotróficas) utiliza el carbono orgánico disuelto, principalmente generado por los productores primarios y sus depredadores en forma de exudados y productos de excreción (Pernthaler y Azam, 2005) convirtiéndola en biomasa bacteriana que es a su vez consumida por protozoos y microzooplancton, promoviendo así la transferencia de energía y nutrientes a lo largo de la cadena alimentaria. Posteriormente, estos consumidores también son depredados, y de esta manera el carbono orgánico se reincorpora a la columna de agua como fracción particulada (Azam *et al.*, 1983; Pomeroy, 1974). Además, bacterias autotróficas y quimiolitotróficas, participan en la nitrificación, transformando amoníaco en nitrito y nitrato, esenciales para el crecimiento del fitoplancton (Kirchman, 2008). Estos procesos también regulan el ciclo del carbono y del nitrógeno, influenciando la concentración de gases de efecto invernadero como dióxido de carbono y metano (Azam & Malfatti, 2007). Estas interacciones destacan el papel fundamental que tienen estos microorganismos en dos roles ecológicos principales, la remineralización de la materia orgánica disuelta y la incorporación de la materia orgánica como biomasa disponible (producción procariota). De esta manera, comprender la variación en la composición y estructura de las comunidades microbianas por efecto de la variación de factores fisicoquímicos nos permite predecir los metabolismos que contribuyen al flujo de energía en un ecosistema desde la base de la cadena trófica, y por lo tanto comprender la capacidad de un sistema para sustentar la vida.

La versatilidad metabólica de los microorganismos procariotas les ha permitido adaptarse a prácticamente cualquier ecosistema, incluyendo aquellos ambientes marinos en donde las condiciones fisicoquímicas sobrepasan la media de salinidad, temperatura y presión, y que por lo tanto son considerados ambientes extremos (Cruz-Leyva *et al.* 2010). Los cuerpos hipersalinos son ambientes acuáticos caracterizados por una concentración de sal significativamente superior a la del agua de mar promedio (35 gramos por litro (g/L), o 3.5%. (Karleskint, Turner, & Small, 2010). Desde una perspectiva ambiental y ecológica, los cuerpos hipersalinos albergan una biodiversidad especializada de microorganismos. conocidos como halófilos. Microorganismos como arqueas y bacterias halófilas, pueden descomponer materia orgánica en condiciones extremas donde otros organismos no pueden sobrevivir, manteniendo

así la funcionalidad del ecosistema (Oren, 2002, 2010). Debido a su sensibilidad a perturbaciones ambientales, los cuerpos hipersalinos y los microorganismos que los habitan pueden servir como indicadores de alteraciones ambientales, climáticas y antropogénicas, reflejando cambios en su composición y estructura con un efecto en su metabolismo que trasciende a impactos en la función del ecosistema (Ventosa *et al.*, 2015).

Muchos cuerpos hipersalinos, como las salinas costeras, se utilizan para la producción de sal, proporcionando empleo y recursos económicos significativos a las comunidades locales. Lagos hipersalinos como el Mar Muerto son destinos turísticos importantes debido a sus propiedades únicas (Arahal *et al.*, 2007). Además, los organismos halófilos de los cuerpos hipersalinos son de interés biotecnológico debido a sus enzimas y compuestos únicos que pueden ser aplicados en industrias como la farmacéutica, la cosmética y la biotecnología. Estas enzimas son especialmente valiosas debido a su estabilidad y funcionalidad en condiciones extremas (Margesin & Schinner, 2001).

Cultural e históricamente, los ecosistemas hipersalinos representan patrimonios naturales únicos que requieren conservación y protección, para mantener su biodiversidad y los servicios ecosistémicos que proporcionan (Arahal *et al.*, 2007 Ventosa *et al.*, 2015). De tal manera, que los cuerpos hipersalinos en sistemas acuáticos y marinos son ecosistemas de alta relevancia ambiental, ecológica, social y económica. La conservación y estudio de estos cuerpos de agua son esenciales para entender mejor sus funciones ecológicas y maximizar sus beneficios para la sociedad, comenzando por conocer la comunidad microbiana procariota que sostiene las funciones del ecosistema. La comunidad microbiana procariota en ambientes hipersalinos tiene características particulares en su composición y estructura, como la predominancia de microorganismos halófilos i.e. arqueas del filo Euryarchaeota (como Halobacterium y Haloarcula) y bacterias (Halomonas y Salinibacter), adaptados a condiciones extremas de salinidad (Madigan *et al.*, 2018). Una de las adaptaciones más importantes es la capacidad de manejar la presión osmótica alta mediante la acumulación de solutos compatibles como glicina betaína, ectoína y trehalosa, que ayudan a mantener la homeostasis celular frente a la deshidratación y la pérdida de agua (Oren, 2002). Además, muchos de estos microorganismos están equipados con enzimas y proteínas estructurales que funcionan eficazmente en

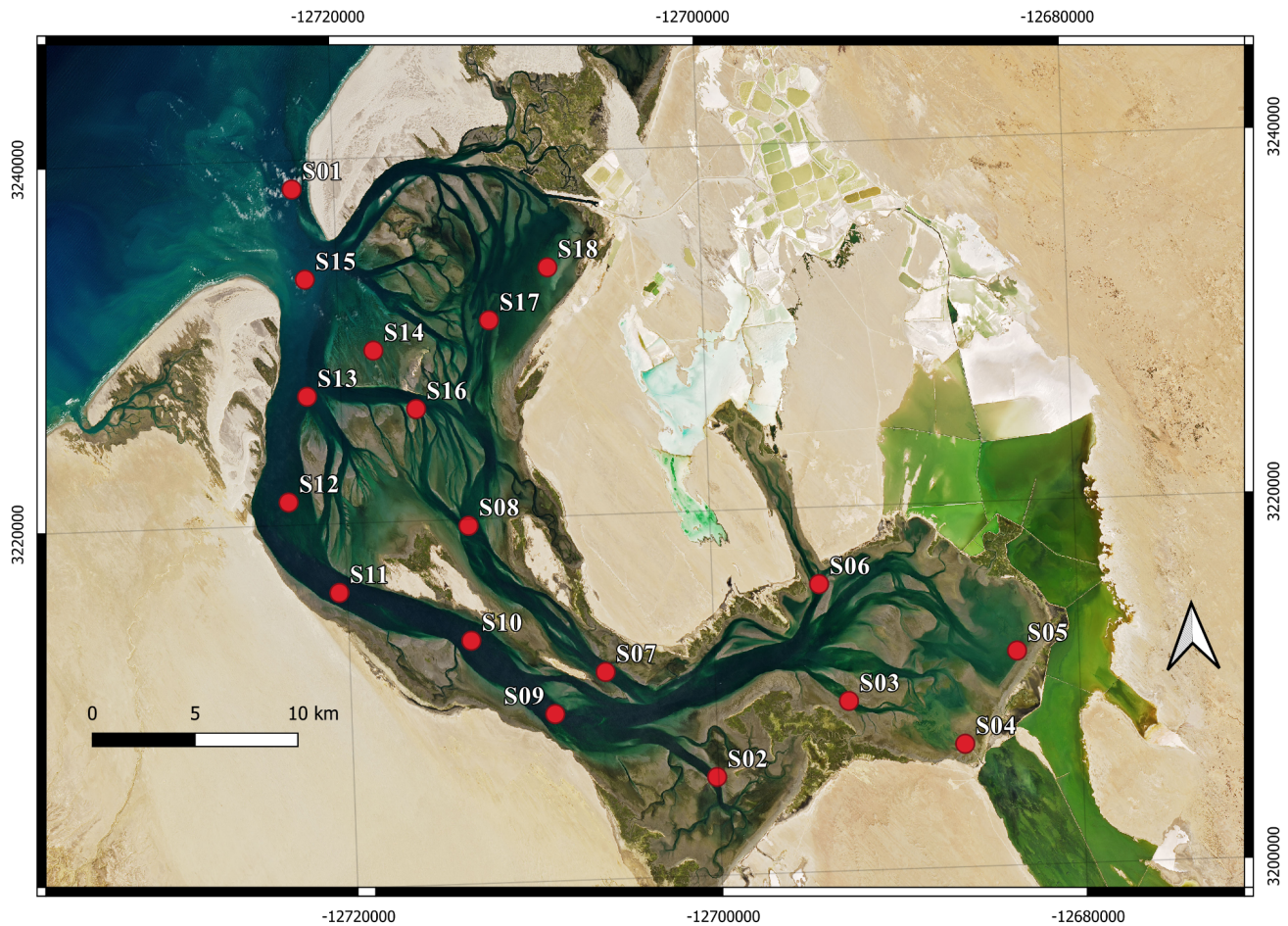
ambientes de alta salinidad, lo que les permite mantener actividades metabólicas esenciales como la síntesis de proteínas y la replicación del ADN, además estos microorganismos exhiben estrategias metabólicas especializadas, como la fotosíntesis bacteriorrodopsina-dependiente en arqueas y la quimiosíntesis en ausencia de luz, así como adaptaciones para la osmoregulación mediante la acumulación de solutos compatibles y la producción de exopolisacáridos (Oren, 2008). La composición diversa de en estos ambientes permite a los microorganismos colonizar nichos específicos dentro del ecosistema salino, donde las variaciones en la salinidad, temperatura y disponibilidad de nutrientes juegan un papel crucial (Antón *et al.*, 2000).

La Laguna Ojo de Liebre (LOL) ubicada en el municipio de Mulegé, B.C.S, México, es una laguna costera somera (5-12 mts profundidad) localizada entre 27°35' y 27°55'N y los 113°50' y 114°20'W caracterizada por su hipersalinidad (Villa-Guerrero, 2019). La combinación de altas temperaturas y vientos acelera el proceso de evaporación. Además, la escasez de lluvias durante la mayor parte del año resulta en la falta de aporte de agua dulce. Estos factores en conjunto generan un gradiente en la concentración de salinidad, con valores que aumentan hacia la cabeza de la laguna, donde se han registrado valores de salinidad de hasta 47 (Contreras, 1985).

Esta laguna hipersalina, forma parte de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno (REBIVI) y es reconocida como Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO debido a su importancia en términos de interacciones ecológicas y actividades socioeconómicas. Es un refugio para la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) durante su migración, y también de diversas especies de aves. Además, es el hábitat de especies en peligro de extinción, como la tortuga marina *Chelonia mydas* (Bocanegra-Castillo, 1998). La laguna no solo es valiosa desde el punto de vista ecológico, sino que también sustenta una serie de actividades económicas para las comunidades locales. La pesca sostenible de especies como la escama, la extracción de callo de hacha (*Atrina maura*) y la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) son actividades económicamente importantes en la región (Crespo-Guerrero y Jiménez Pelcastre, 2016). El turismo también impulsa la economía local, especialmente durante la migración anual de las ballenas grises desde el Ártico hacia aguas más cálidas para reproducirse y dar a luz a sus

crías. Durante su estancia en la laguna, las ballenas grises tienen interacciones sociales que atraen a visitantes de todo el mundo (Ponce-López, 2002; Bermúdez-Almada, 2003). Además, la presencia de la salina solar más grande del mundo, con sus extensos 75,000 acres de estanques de sal, también es una fuente crucial de ingresos, aunque también existe una preocupación significativa acerca de los derrames de salmuera y su potencial para alterar la composición físicoquímica del agua (Ponce-López, 2002).

De acuerdo a lo anterior, el papel de las comunidades microbianas procariotas en la columna de agua es fundamental para el funcionamiento y la salud de un ecosistema, como lo es la Laguna Ojo de Liebre, ya que regulan el flujo de energía, los ciclos biogeoquímicos y la remineralización de la materia orgánica que permite que ocurran diversas interacciones ecológicas y socioeconómicas. Sin embargo, aún no se tiene conocimiento previo sobre la composición y estructura de la comunidad microbiana procariota en la columna de agua de este ecosistema. Por lo que este proyecto de tesis generará información novedosa referente a la composición, estructura y cambios espacio temporales de la comunidad microbiana procariota que contribuya a la generación de una línea base de conocimiento, que permita evaluar desde la base trófica aspectos de la biogeoquímica de la laguna que sostienen sus interacciones ecológicas y socioeconómicas.



**Figura 1.- Estaciones de muestreo en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.** Las estaciones de muestreo de este estudio se muestran señaladas con puntos color rojo y numeradas (S01-S18).

## 2. ANTECEDENTES

En ambientes hipersalinos la comunidad microbiana procariota se caracteriza por estar compuesta de grupos taxonómicos que han mostrado ser resistentes a amplios rangos de salinidad. Dentro de los estudios realizados de la comunidad microbiana procariota en ambientes hipersalinos se eligieron dos áreas de estudio como sistemas modelos, considerando que los rangos de salinidad son similares a los encontrados en la Laguna Ojo de Liebre y que estos estudios se realizaron evaluando la composición y estructura con base en el análisis del gen 16S ARNr. El primer estudio fue realizado en la Laguna de Araruama en

Río de Janeiro, Brasil, que se encuentra entre las lagunas costeras hipersalinas más grandes del mundo. Esta laguna está conectada al Océano Atlántico a través de Cabo Frío presentando salinidades de 36 en la boca, mientras que la parte interna puede alcanzar hasta 52 (Clementino *et al.*, 2018; Cury *et al.*, 2011). Clementino *et al.*, (2018) llevaron a cabo dos muestreos en los extremos de la Laguna Araruama durante agosto 2004 con el objetivo de investigar la composición de la comunidad mediante el análisis del gen 16S ARNr con relación al gradiente de salinidad. Los resultados revelaron que, en la boca de la laguna, predominaban las  $\gamma$ -proteobacteria (*Marinobacter* sp.), así como Bacteroidetes (*Flavobacteria* sp.) y los grupos Methanomicrobia y Methanothermococcus del filo Euryarchaeota. Por otro lado, en la parte interna de la laguna, los grupos más representativos eran  $\gamma$ -Proteobacteria (*Pseudomonas* sp.), Bacteroidetes (*Salinibacter ruber*) y Haloarcula de filo Halobacteriota y Haloarchaea del filo Euryarchaeota del dominio arquea. El estudio demostró una clara variabilidad en la dominancia relacionada a la distribución espacial en el gradiente de salinidad.

Otro ambiente hipersalino donde se han realizado estudios de la comunidad microbiana procarionta es la laguna de Thau ubicada en la región de Occitania, en el sur de Francia. La salinidad de la laguna generalmente varía entre 30 y 40, lo que la convierte en una laguna hipersalina en ciertos momentos, especialmente en periodos de alta evaporación y baja entrada de agua dulce. En su estudio, Trombetta *et al.* 2022) se enfocaron en identificar la diversidad de la comunidad microbiana durante invierno (10 °C) a primavera (20 °C) en 2015 y 2016. En sus observaciones encontraron para el dominio Bacteria, dominaron los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia, con respectivos cambios estacionales en su abundancia en ambas temporadas, Además, dentro del dominio Arquea, los filos observados fueron Euryarchaeota y Thaumarchaeota, los cuales fueron bajos en abundancia relativa en comparación a los bacterianos (Trombetta *et al.*, 2022). Este estudio concluyó que la variación significativa en la composición y estructura de la comunidad microbiana está influenciada por múltiples factores ambientales, de los cuales los gradientes de salinidad y temperatura pueden ser los más significativos.

Además, también se encuentra el Great Salt Lake ubicado en Utah, EE. UU, este lago presenta variaciones significativas en la salinidad según la ubicación específica y las condiciones

ambientales. Se distinguen tres áreas principales con diferentes niveles de salinidad ya que recibe más aportes de agua dulce de los ríos que desembocan en el lago y Gunnison Bay, y debido a barreras físicas que restringen el flujo de agua entre diferentes partes del lago. Dyll-Smith (1991) y Baxter *et al.* (2005), exploraron las diferentes formas de vida microbiana que se han desarrollado en este ambiente. Ambos estudios mencionan que el Great Salt Lake presenta variaciones en la salinidad a lo largo de su extensión que crean gradientes salinos que influyen la composición y la diversidad de las comunidades microbianas, así como en las adaptaciones metabólicas específicas que presentan. Dentro del estudio en las zonas menos salinas del Great Salt Lake (South Arm ~50) se encontró la presencia de especies como Actinobacteria y Firmicutes que prefieren ambientes con menor salinidad y su presencia fue asociada a la descomposición de materia orgánica proveniente de los afluentes. Mientras que en el área de mayor salinidad (North Arm > 150) se encontró la presencia de especies de arqueas halófilas como *Halobacterium*, *Haloferax* y *Halococcus*, que son extremadamente halotolerantes y están adaptadas a concentraciones de sal muy altas (hasta el 300), y bacterias halófilas como *Salinibacter ruber* y *Salinicoccus*. Estos estudios concluyeron que se observó una variación significativa en la comunidad microbiana influenciada principalmente por los gradientes de salinidad en este ambiente.

Con respecto al ecosistema hipersalino de la Laguna Ojo de Liebre, se tienen relativamente pocos estudios respecto a las comunidades microbianas. Los estudios más recientes se encuentran enfocados principalmente en la comunidad fitoplanctónica, la comunidad de los tapetes microbianos, y la comunidad bacteriana cultivable de sedimentos con un enfoque biotecnológico. Recientemente, Sanchez Cobarrubias (2019; 2021), realizó un par de estudios para evaluar e la comunidad fitoplanctónica en la Laguna Ojo de Liebre en los que se identificaron un 47% de los géneros reportados por Millán-Núñez en 1987 (*Chaetoceros* sp., *Coscinodiscus* sp., *Diploneis* sp., *Navicula* sp., *Nitzschia* sp.), demostrando que esta comunidad muestra una estructura relativamente consistente a lo largo del tiempo. Además, mediante microscopía óptica, quimiotaxonomía y sensores remotos observó una dominancia de diatomeas y dinoflagelados, además destacó la contribución significativa de los nano y

picofitoplanctónicos, que en conjunto contribuyen mayoritariamente a la variabilidad estacional de la productividad en términos de clorofila (Chla).

Respecto a estudios de la comunidad microbiana, Roberson *et al.*, (2008) realizaron un estudio centrado en la diversidad y estratificación de arqueas en los tapetes microbianos hipersalinos de la laguna. Los análisis moleculares indicaron que las arqueas constituyen alrededor del 9% de los genes de 16S ARNr en estos tapetes, sugiriendo una función metabólica significativa. La investigación identificó diversos filotipos arqueanos que incluyen principalmente Euryarchaeota en las capas superficiales, con Methanosarcina y Halococcus entre ellos, y Crenarchaeota en las capas profundas, destacando Thermoplasma y Archaeoglobus. En este estudio sugieren que las posibles diferencias metabólicas, influenciadas por los gradientes químicos específicos de cada estrato, determinan la distribución de estos microorganismos. Este estudio resalta la importancia de las arqueas en la funcionalidad de estos ecosistemas y ofrece un modelo valioso para entender las interacciones microbianas, considerando que los tapetes microbianos representan una de las formas de vida más antiguas registradas.

Con respecto a la comunidad microbiana de los sedimentos, Zamora-Quintero *et al.* (2022) realizaron un estudio enfocado en aislar Actinobacterias, recuperando la fracción cultivable de la comunidad bacteriana. Mediante el análisis del gen 16S ARNr, se identificaron tres filos bacterianos principales: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. La distribución de estos filos varió a lo largo de las estaciones y temporadas de muestreo, influenciada por las condiciones de temperatura y salinidad del agua. Estos resultados sugieren una respuesta espacio-temporal de la comunidad bacteriana a las propiedades fisicoquímicas de la laguna. En otro estudio realizado por Zamora-Quintero (2022), se comparó el metabolismo primario y secundario de cuatro cepas de actinobacterias, dos de *Actinomadura* y dos de *Micromonospora*, aisladas del sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre. Se identificaron 62 rutas metabólicas primarias, destacando la degradación de taurina en *Actinomadura* y de quitina en *Micromonospora*. En cuanto al metabolismo secundario, se encontraron clusters de genes biosintéticos (BGCs) únicos, como el de ectoína en *Actinomadura* y el de desferrioxamina E en *Micromonospora*, con solo el 10% de similitud con rutas conocidas, indicando un alto potencial para nuevos compuestos bioactivos. Este estudio subraya la

importancia de explorar genomas bacterianos en ambientes poco estudiados para descubrir nuevas rutas metabólicas y compuestos con aplicaciones biotecnológicas y farmacológicas.

Aun cuando estos estudios evidencian en general la importancia de las comunidades microbianas, hasta el momento no existe información sobre las comunidades microbianas procariotas de la columna de agua de la Laguna Ojo de Liebre, que son fundamentales para el funcionamiento y la salud de los ecosistemas, ya que regulan el flujo de energía, los ciclos biogeoquímicos y la remineralización de la materia orgánica.

### **3. HIPÓTESIS**

Las variaciones fisicoquímicas temporales y espaciales que ocurren en la Laguna Ojo de Liebre tienen un efecto en la composición y estructura taxonómica de la comunidad microbiana procariota de la columna de agua.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Evaluar los cambios en la composición y estructura de la comunidad microbiana procariota de la columna de agua en la Laguna Ojo de Liebre B.C.S. México.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- (1) Determinar la composición y estructura taxonómica de la comunidad procariota de la columna de agua, mediante el análisis de secuencias de amplicones del gen 16S ARNr.
- (2) Evaluar los cambios espacio-temporales en la composición y estructura de la comunidad procariota de la columna de agua, en relación con las variables fisicoquímicas.
- (3) Utilizar la composición taxonómica procariota para inferir el potencial metabólico en la columna de agua.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Muestreo en campo

Se llevaron a cabo 4 muestreos en la Laguna Ojo de Liebre durante los meses de agosto y noviembre del 2021, así como en marzo y junio del 2022. En cada muestreo se recolectaron muestras de agua (4L) en 18 estaciones distribuidas a lo largo de la laguna (Fig. 1). Las muestras de agua fueron tomadas utilizando una botella Niskin (5L) a una profundidad máxima de 2 m en la columna de agua. Posteriormente, el agua se transfirió a botellas oscuras Nalgene (5L) utilizando un embudo recubierto con malla de nylon de 200 $\mu$ m. Las botellas fueron almacenadas en hielo hasta el momento de ser filtradas y procesadas. Además, se registraron datos de las variables fisicoquímicas, como salinidad, temperatura, densidad y profundidad, utilizando un CTD YSI CastAway®.

Se estableció una estación de filtrado en la localidad de alojamiento para garantizar el procesamiento expedito de las muestras de agua de mar. La concentración de biomasa destinada al análisis de la comunidad microbiana se realizó filtrando hasta 2L de agua previamente prefiltrada a 0.8  $\mu$ m, utilizando filtros de membrana Track-end (Nucleopore) de 0.2  $\mu$ m. Los filtros se conservaron a -20°C hasta su posterior extracción de ADN en el laboratorio.

### 5.2 Análisis molecular

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy PowerWater (Qiagen) siguiendo el protocolo Quick-Start del kit, con la modificación de un paso adicional de incubación a 65°C durante 60 minutos después de la adición del buffer de lisis y previo al paso de lisis mecánica. Posteriormente, el ADN total extraído fue cuantificado utilizando un NanoDrop, para posteriormente ser enviado para la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr. Se consideraron las muestras con concentración mayores o iguales a 1ng/  $\mu$ l y un valor mínimo 260/280 igual a 1.8. La secuenciación de amplicones se centró en la región V4-V5, utilizando los primer universales 515FB = GTGYCAGCMGCCGCGGTAA y 926R = CCGYCAATYMTTTRAGTTT del gen 16S ARNr (Parada *et al.*, 2015; Walters, 2015). Este proceso fue realizado en el centro de secuenciación de Integrated Microbiome Resource (IMR) de la Universidad Dalhousie, Halifax, Canadá, empleando la tecnología Illumina MiSeq.

### 5.3 Análisis bioinformáticos de secuencias de amplicones de 16S ARNr

Para evaluar la composición y estructura de la comunidad microbiana procariota se realizó el análisis de amplicones del gen 16S ARNr utilizando la plataforma Qiime2 (Bolyen *et al.*, 2019), siguiendo el protocolo sugerido por IMR para amplicones ([https://github.com/LangilleLab/microbiome\\_helper/wiki/Amplicon-SOP-v2-\(qiime2-2022.11\)](https://github.com/LangilleLab/microbiome_helper/wiki/Amplicon-SOP-v2-(qiime2-2022.11))).

En términos generales, tras la importación de las secuencias, se realizó el recorte de los primers (cebadores) mediante el comando cutadapt, seguido del proceso de “demultiplex”, que consiste en asignar las secuencias para cada muestra de acuerdo a su identificador, generando archivos fastq para el análisis posterior. La eliminación de ruido en las secuencias para agruparlas en variantes de secuencias de amplicones (ASVs por sus siglas en inglés) se llevó a cabo utilizando los comandos de la paquetería "deblur" en el ambiente de Qiime2. Este procedimiento consistió en la unión de pares de secuencias utilizando VSEARCH, filtrado de secuencias de baja calidad, establecimiento de longitud específica y finalmente la obtención de ASVs, sin excluir las secuencias únicas o "singletons". Como resultado, se generó una tabla de ASVs. La asignación taxonómica de los ASVs obtenidos se realizó utilizando la base de datos Silva138 (Yarza *et al.*, 2014).

Para visualizar las diferencias en la composición taxonómica de la comunidad, con los datos obtenidos, se generaron gráficas de barras con las abundancias relativas promedio de los taxones, comparando las muestras según la temporada y estación de muestreo. Posteriormente, se evaluó la estructura de la comunidad y la relación de ésta con los parámetros fisicoquímicos, a través de análisis estadísticos incluyendo un dendrograma de agrupación jerárquica utilizando la distancia Manhattan con 1000 réplicas; además de un análisis de Componentes Principales (PCoA) utilizando una matriz de disimilitud Bray-Curtis con 1000 réplicas. Además, se realizaron análisis de correlación y significancia de la composición de la comunidad con los parámetros de salinidad, temperatura y densidad, las correlaciones se representaron como vectores sobre el PCoA. Los análisis estadísticos y la visualización de esta comparación se realizaron utilizando la librería *vegan*, *ggplot2* (Wickham, 2016) en el ambiente de RStudio (RStudio Team, 2020).

Para inferir el metabolismo microbiano en la columna de agua, se utilizó la tabla resultante del proceso de unificación de asignación taxonómica de las ASVs y su frecuencia en las muestras analizadas con la herramienta PiCrust (Langille *et al.*, 2013). Este proceso de la metodología de predicción del metabolismo implementada en PiCrust se basa en varios pasos importantes. En primer lugar, se realiza una adecuación y reducción de los árboles filogenéticos para garantizar su alineación con los métodos de reconstrucción del “estado” ancestral. Luego, se lleva a cabo la reconstrucción del “estado” ancestral utilizando algoritmos especializados, lo que permite estimar el contenido genético de organismos ancestrales y vivos, considerando la evolución de los genes a lo largo del tiempo. Posteriormente, se procede a la predicción de rasgos, donde se estima el contenido genético de organismos desconocidos analizando los genes de organismos secuenciados y/o ancestrales según su distancia filogenética, con opciones para generar intervalos de confianza que reflejan la incertidumbre en estas predicciones. Además, se realiza la predicción del número de copias del gen 16S ARNr y se aplica una normalización para considerar las variaciones en el número de copias. Finalmente, se lleva a cabo la predicción del metagenoma, calculando la abundancia relativa de cada familia de genes en un metagenoma mediante la multiplicación del número de copias de genes por la abundancia relativa de las ASVs correspondientes en las muestras. Finalmente, se obtiene una matriz en donde se muestran las rutas metabólicas inferidas con base en la presencia y frecuencias de grupos taxonómicos representativos de distintas clases de metabolismo. El algoritmo de PiCrust hace la asignación al nombre de las posibles rutas metabólicas de acuerdo a la base de datos de grupos ortólogos de genes (KEGG) y MetaCyc (Caspi *et al.*, 2014). Finalmente, se realizó una comparación temporal de los genes y las rutas metabólicas resultantes de acuerdo con un análisis de abundancia diferencial con la paquetería *ggpicrust* (Chen Yang *et al.*, 2023), y la visualización de esta comparación se realizó utilizando la librería *ggplot2* (Wickham, 2016) en el ambiente de RStudio (RStudio Team, 2020).

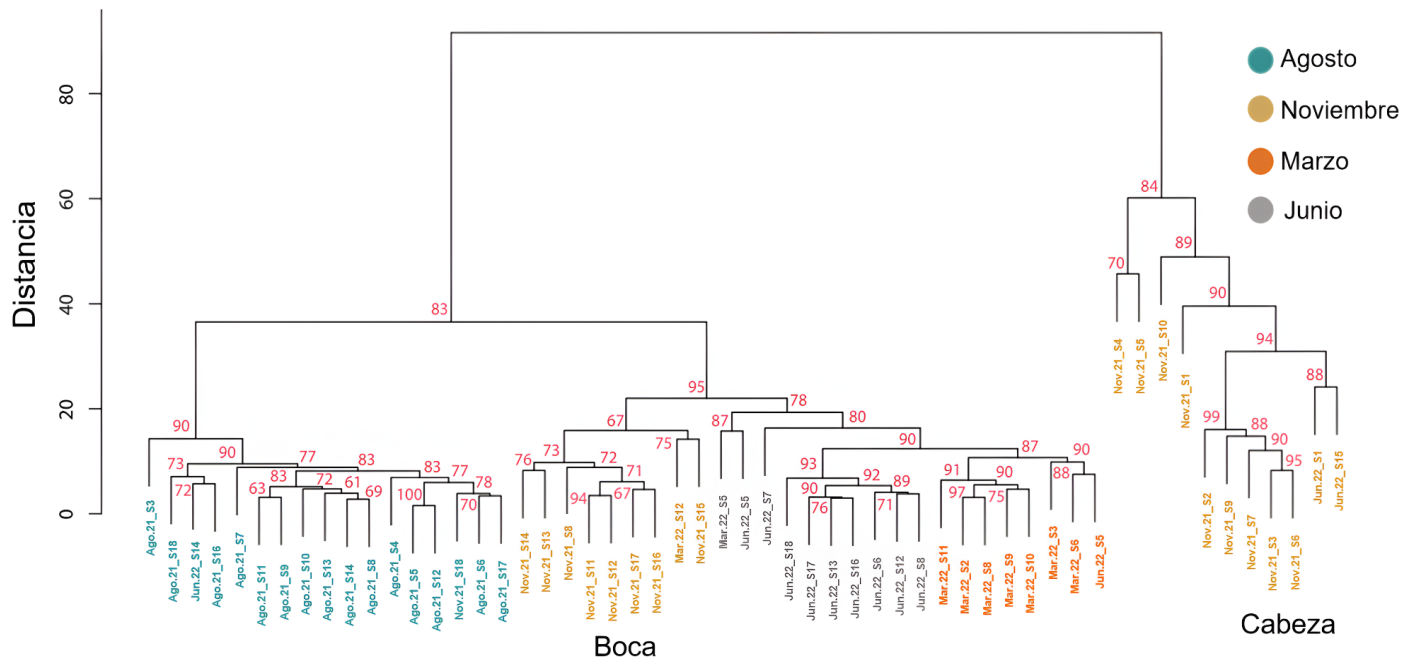
## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Parámetros fisicoquímicos**

Para evaluar el efecto de los factores fisicoquímicos ambientales en la comunidad microbiana, se midieron los parámetros de temperatura, salinidad y densidad en las 18 estaciones de muestreo (Fig.1). En general, se observó un gradiente ascendente de salinidad, temperatura y densidad desde la boca hacia la cabeza de la laguna. En particular, el valor máximo promedio de la temperatura se observó en agosto con un promedio de  $25.66 \pm 0.48^{\circ}\text{C}$ , mientras que el mínimo promedio se registró en marzo, con  $16.75 \pm 0.34^{\circ}\text{C}$ . En cuanto la salinidad, el valor máximo promedio fue de  $35 \pm 45$  en agosto mientras el mínimo promedio fue en marzo  $33.50 \pm 41$ . Las densidades presentes registraron rangos de 1023 a 1030  $\text{kg/m}^3$ , a lo largo de la laguna. El mes que presentó mayores rangos de densidad fue el mes de marzo ( $\sim 1024$  a 1029) y agosto presentó los valores menores ( $\sim 1023$  a 1024) (Anexo 3).

### **6.2 Estructura de la comunidad procariota y su relación con variables ambientales**

Se consideraron dos aproximaciones para definir la estructura de la comunidad destacando su distribución espacio-temporal. En primer lugar, se realizó un análisis de agrupación jerárquica para identificar patrones temporales en función a la disimilitud de la composición de la comunidad a lo largo de la laguna y durante los cuatro meses de muestreo. Los resultados mostraron que las muestras se agruparon principalmente en relación a la temporada de muestreo (Fig. 2). Por ejemplo, se observó un grupo que corresponde principalmente a las estaciones de muestreo del mes de agosto, el cual se caracterizó por las temperaturas ( $25-27^{\circ}\text{C}$ ) y salinidades ( $\sim 34-45$ ) más altas. En comparación, el segundo grupo extremo corresponde a las estaciones de muestreo durante el mes de noviembre, que se caracterizó por temperaturas ( $19-21^{\circ}\text{C}$ ) y salinidades ( $\sim 34-42$ ) bajas. Además, se observó un grupo intermedio que corresponde a las estaciones de muestreo de los meses de marzo y junio, con rangos amplios de temperatura ( $16-24^{\circ}\text{C}$ ) y salinidad ( $\sim 34-41$ ). En cuanto a los patrones espaciales, fue particularmente evidente para el mes de noviembre la división entre las estaciones de la cabeza y boca de la laguna, mostrando mayor distancia con aquellas que se ubican en la cabeza (Fig. 2).

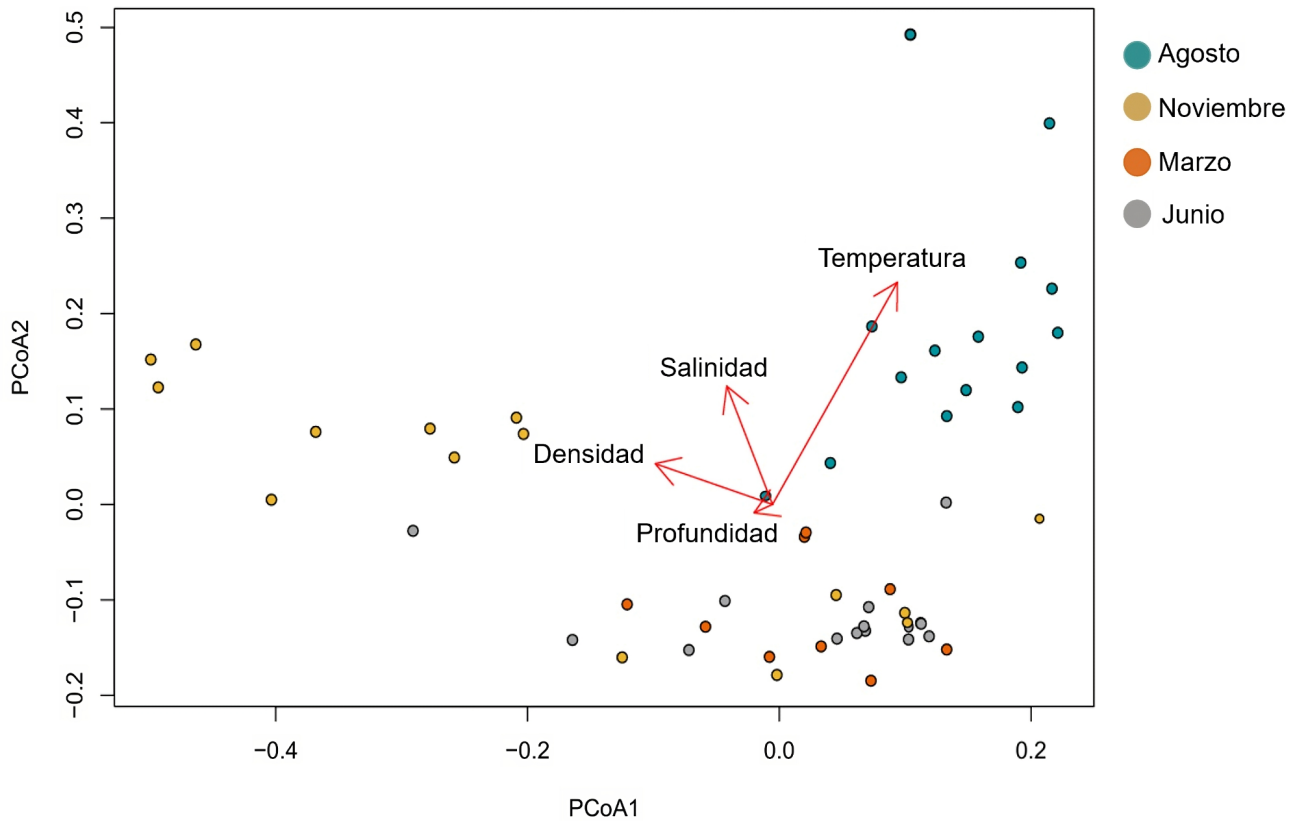


**Figura 2.- Dendrograma de agrupación jerárquica, utilizando la distancia de Manhattan.**

El dendrograma de agrupación jerárquica representa las características que se encuentran consistentemente en diferentes grupos, en función de las similitudes o distancias entre los datos. La distancia Manhattan es la distancia mínima entre dos puntos siguiendo un trazado viario. En estudios de remuestreo, un alto valor de AU (Approximately Unbiased) indica que el método proporciona estimaciones menos sesgadas.

Con base en esta agrupación jerárquica fue posible distinguir cambios en la abundancia relativa de ciertos taxones que resultan características temporal y espacialmente. Debido a la distancia observada en el análisis de agrupación jerárquica entre los meses de agosto y noviembre, éstos se tomaron como puntos de comparación para evaluar diferencias puntuales en distintas estaciones ubicadas en la región de la boca (S12 y S13), medio (región de las islas; S9 y S10) y cabeza (S4 y S5) de la laguna. Estas diferencias sugieren que la

composición microbiana en cada estación de muestreo varía considerablemente espacio y temporalmente durante agosto y noviembre. Con el objetivo de identificar la relación de las variables ambientales de temperatura, salinidad y densidad con la composición y estructura de la comunidad, se realizó un análisis de componente principales (PCoA) en donde se integraron vectores cuya magnitud es proporcional al valor de correlación de la variable fisicoquímica con la estructura de la comunidad (Fig. 3). Similar a lo observado en el análisis de agrupación jerárquica, en el análisis de PCoA se identificaron tres grupos principales: el primero correspondiente al mes de agosto, el segundo compuesto por los meses de marzo y junio, y el tercero correspondiente al mes de noviembre. En general, se obtuvo que la temperatura y la salinidad fueron las variables más significativas para explicar la composición y estructura de la comunidad procariota, mostrando valores de correlación y significancia de  $r^2 = 0.77$ ,  $p = 0.001$  para la temperatura, y  $r^2 = 0.39$ ,  $p = 0.014$  para la salinidad (Tabla I). En particular, para el mes de agosto se encontró que la temperatura fue la variable con mayor efecto, mientras que la salinidad tiene un efecto directo para los meses de agosto y noviembre, e indirecto para los meses de marzo y junio, y la densidad fue la variable con mayor efecto (aun cuando no resultó significativo) para el mes de noviembre (Fig. 3).



**Figura 3.- Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras durante los meses de septiembre y noviembre del 2021, y marzo y junio del 2022.** La ubicación de las muestras, en lugar de representar su simple ubicación geográfica, refleja la similitud de sus comunidades biológicas. Los puntos cercanos tienen comunidades muy similares, las muestras que están muy separadas tienen pocas especies en común o la misma especie en niveles de abundancia muy diferentes. La dirección y magnitud del vector representa la correlación (similitud) entre las variables y las estaciones, de tal manera que la dirección contraria del vector representa la incorrelación (disimilitud) de la variable con las estaciones.

**Tabla 1.- Valores de correlación y significancia en relación a los factores fisicoquímicos y las muestras del análisis de coordenadas principales (PCoA).**  $r^2$  representa los valores de correlación y Pval la significancia.

	<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Pval</b>
<b>Profundidad</b>	-0.86	-0.52	0.05	0.93
<b>Temperatura</b>	0.39	0.92	0.77	0.001
<b>Salinidad</b>	-0.28	0.96	0.39	0.014
<b>Densidad</b>	-0.91	0.42	0.31	0.088

### 6.3 Composición taxonómica de la comunidad procariota

Para determinar la composición y estructura taxonómica de la comunidad procariota en la columna de agua, se realizó un análisis de las secuencias del gen 16S ARNr. Se analizaron un total de 58 muestras, generando un total de 3,528,490 secuencias, de las cuales posterior a su procesamiento se identificaron un total de 1,700 ASVs. La asignación taxonómica de las ASVs permitió identificar 2 dominios, 207 phyla, 198 clases, y 181 órdenes. Como primera aproximación para la evaluación de la composición de la comunidad procariota fue identificar los taxones considerados como el “núcleo”, con base en un valor de abundancia relativa  $\geq 1\%$  (Smith & Johnson, 2018) y considerando que estuvieron presentes en todas las estaciones y meses de muestreo. Además, se identificaron los grupos denominados “raros”, con base en una abundancia relativa  $< 1\%$  (Smith & Johnson, 2018) independientemente de las estaciones en las cuales se encontraron presentes a lo largo de la laguna (Fig. 4).

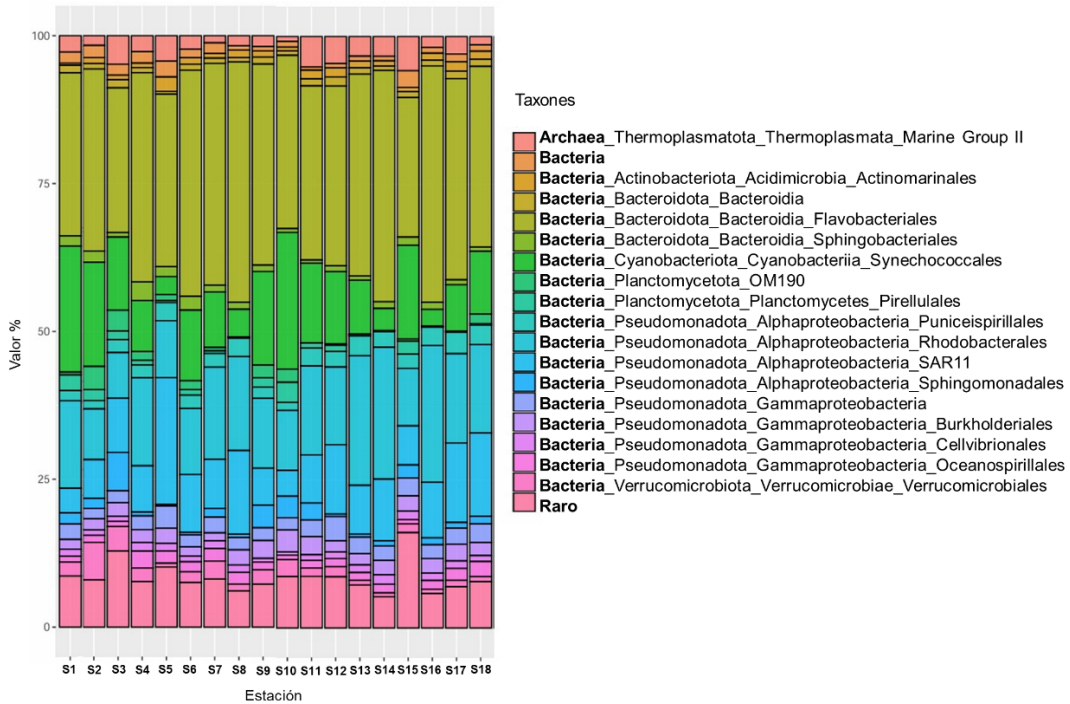
La composición del núcleo de la comunidad se definió al comparar el promedio de la abundancia relativa de todos los taxones identificados en los diferentes meses y estaciones de muestreo (Fig. 5). Los filos que destacan dentro del dominio Bacteria corresponden a Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteriota, Pseudomonadota, Planctomycetota y Verrucomicrobiota. Con respecto a la caracterización espacial del núcleo de la comunidad procariota, se observó con mayor resolución la composición taxonómica identificando distintos órdenes dentro de los filos Bacteroidota, Cyanobacteriota, Planctomycetota, Pseudomonadota y Verrucomicrobiota, por ejemplo: Flavobacteriales, Synechococcales, Pirellulales, Rhodobacterales, SAR11, Burkholderiales y Verrucomicrobiales, además de Thermoplasmata

perteneciente al Grupo Marino II como la única clase dominante dentro del dominio Archaea. Esta composición taxonómica se mostró homogénea entre las distintas estaciones de muestreo a lo largo de la laguna.

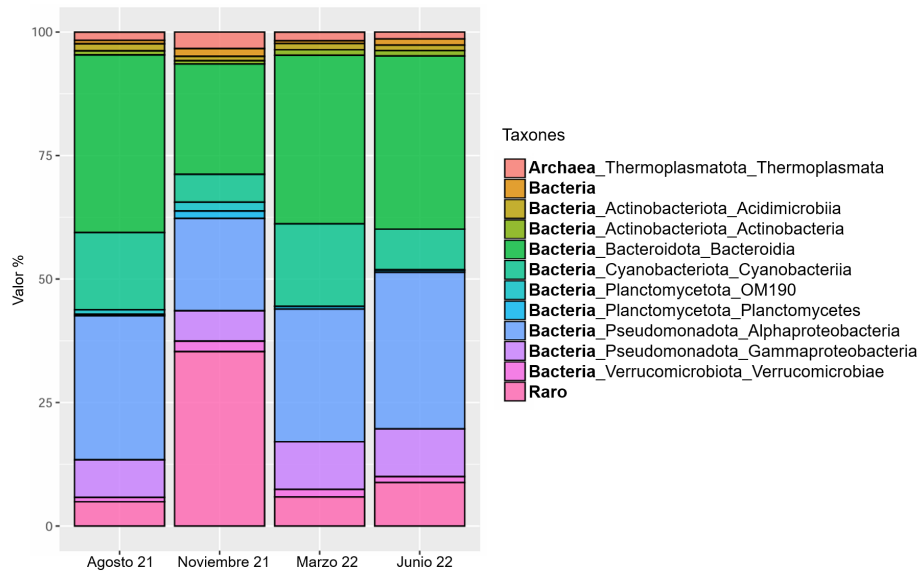
Además, se pudieron observar diferencias temporales entre las clases de los distintos filos. Por ejemplo, las clases Bacteroidia (37.07 %) y Alfa-proteobacteria (30.96 %) mostraron mayor abundancia en comparación con las Gamma-proteobacteria (9.68%) en los 4 meses de muestreo. En particular, temporalmente se observa como grupo dominante al filo Actinobacteriota, siendo las clases más representativas la Acidimicrobia (1.49 %) y Actinobacteria (1.32 %). También, se observa que en el mes de Marzo (16.62%) la abundancia relativa del filo Cyanobacteria es mayor en los meses de agosto (15.67 %), Junio (8.24 %) y disminuye en noviembre (5.65 %) (Fig. 5). Además, dentro del dominio Archaea, el filo Thermoplasmata muestra una mayor abundancia en el mes de noviembre (4.70 %) (Fig. 5).

Con respecto a los taxones raros, se observaron en un rango de 4.92-35.32 % del total de ASVs identificados en las distintas estaciones de muestreo a lo largo de la laguna (Fig. 6). Sin embargo, se observaron diferencias temporales en su frecuencia con un efecto directo en la diversidad total del mes de muestreo. Por ejemplo, el mes de noviembre tuvo la mayor presencia de taxones raros (26 ASVs), mientras que agosto fue el mes que presentó la menor presencia de éstos (13 ASVs) (Fig. 6). Además, se analizaron las diferencias en la diversidad de la comunidad para los meses de muestreo con base en el índice de diversidad de Shannon (Fig. 7). En particular, se observó una diferencia en la distribución de la mediana, el primer cuartil y el límite mínimo inferior de los meses de agosto y noviembre, los cuales mostraron el valor mínimo (4.7 y 5.2) y máximo (5.7 y 6.6) de diversidad. El valor correspondiente al primer cuartil y la magnitud del límite mínimo inferior, permiten inferir la contribución de los taxones raros en la diversidad temporal de la comunidad. Por ejemplo, para el mes de noviembre, que presentó una mayor presencia de taxones raros también mostró el valor más alto del índice de diversidad (rango del cuartil al límite inferior de 5.6 a 5.2) (Fig. 7). Con respecto a diferencias espacio-temporales, los valores atípicos permitieron identificar estaciones de muestreo que mostraron una diversidad por encima o debajo de la media en una temporada en particular. Por ejemplo, se observaron para el mes de agosto la estación S3 (6.0) que se encuentra en la

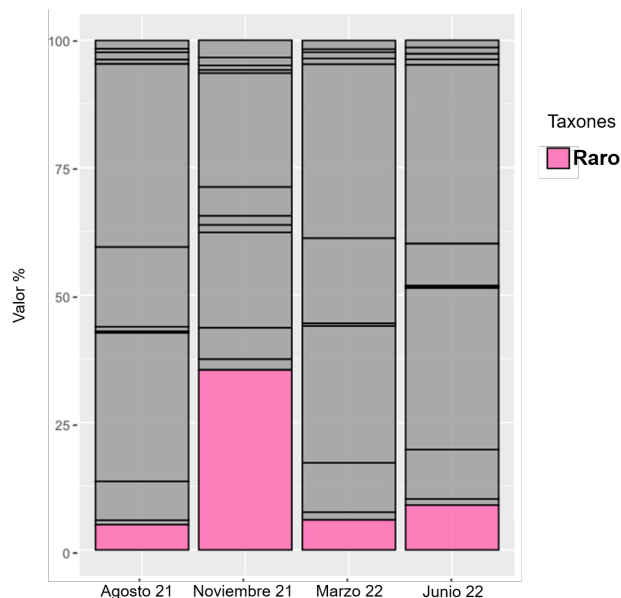
cabeza y para el mes de junio las estaciones S15 ubicada en la boca (6.6) y S5 ubicada en la cabeza (5.5).



**Figura 4.- Composición taxonómica espacial de las ASVs identificadas en la base de datos de Silva 138 mediante QIIME2, utilizando el gen 16 ARNr en el muestreo de 2021 y 2022.** En la figura se representan los taxones abundantes ( $\geq 1\%$  de abundancia relativa) y el conjunto de taxones “raros” que representan el ( $< 1\%$ ). Cada barra representa una estación de muestreo específica y está segmentada por colores, que indican diferentes taxones microbianos. El tamaño del segmento representa la abundancia relativa calculada a partir del número total de lecturas procariotas en la columna de agua de la estación de muestreo durante este período.

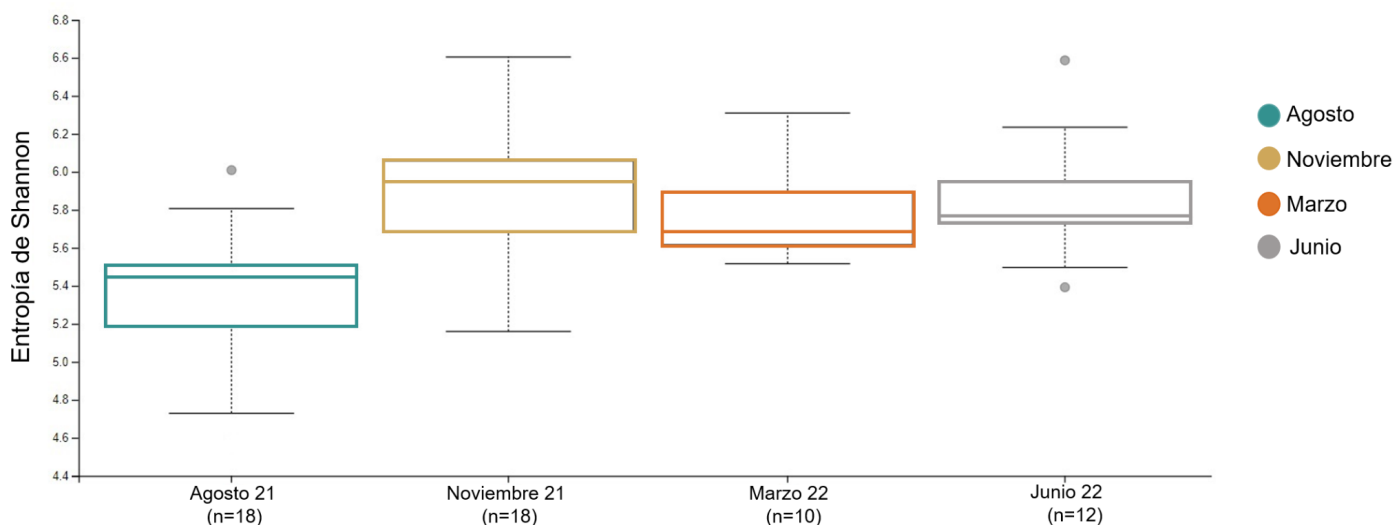


**Figura 5.- Composición taxonómica temporal de las ASVs identificadas en la base de datos de Silva 138 mediante QIIME2, utilizando el gen 16 ARNr.** En la figura se representan el conjunto de los taxones abundantes ( $\geq 1\%$  de abundancia relativa) y el conjunto de taxones “raros” que representan el ( $< 1\%$ ). El tamaño de la barra representa la abundancia relativa en los meses de agosto-noviembre durante el 2021 y marzo-junio del 2022.



**Figura 6.- Composición taxonómica temporal de las ASVs identificadas en la base de datos de Silva138 mediante QIIME2, utilizando el gen 16 ARNr.** En la figura se destaca el

conjunto de los taxones “raros” (< 1% de abundancia relativa). El tamaño de la barra representa la presencia de estos taxones en los meses de agosto-noviembre durante el 2021 y marzo-junio del 2022.



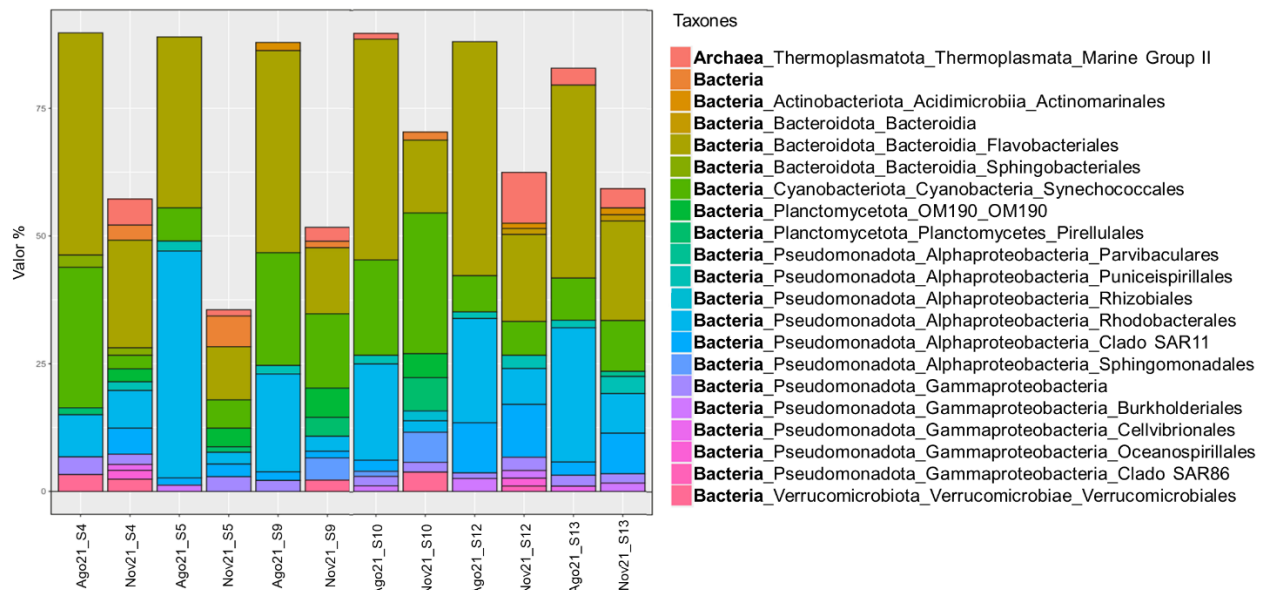
**Figura 7.- Gráfica de cajas y bigotes, representando la diversidad temporal utilizando el índice de Shannon.** El tamaño de cada caja representa la “abundancia relativa” de varios taxones bacterianos y archaea. Las líneas discontinuas extendidas (bigotes) representan en la base los cuartiles inferior y superior (25 y 75 %) y al final los valores mínimo y máximo encontrados. La línea media representa la mediana y “n” representa el número de veces de muestreo a una profundidad de 2 metros en la columna de agua en diferentes meses a lo largo de la Laguna Ojo de Liebre.

#### 6.4 Variaciones espacio-temporales en la composición de la comunidad

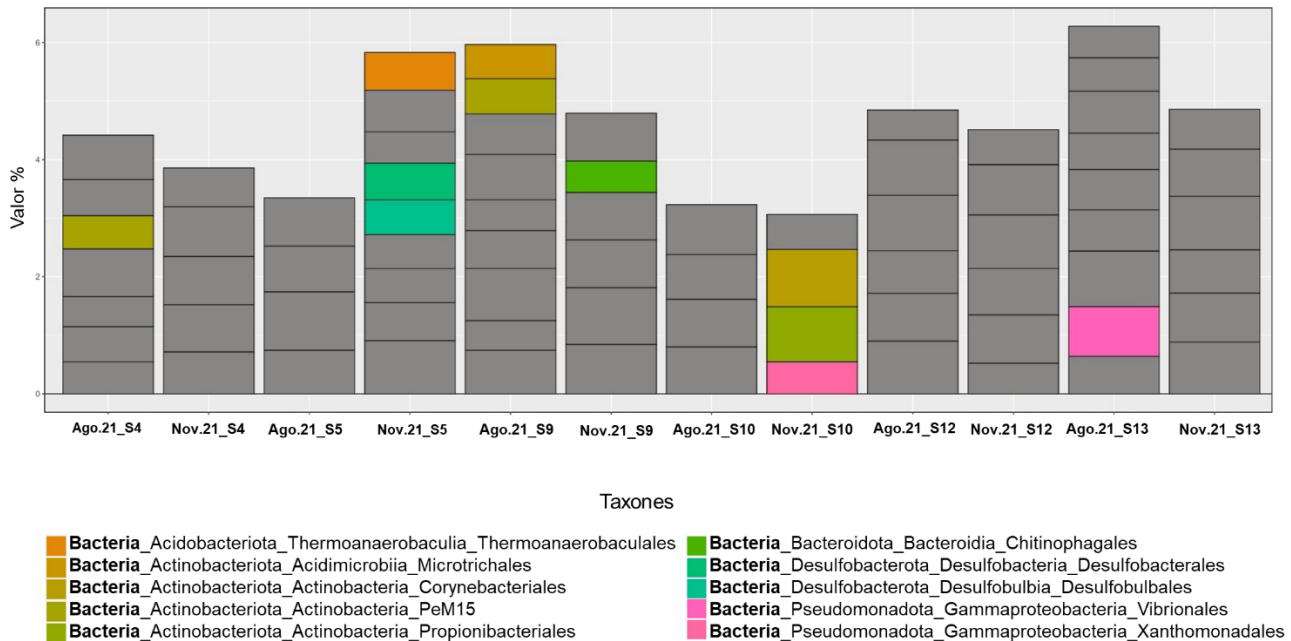
Para evaluar los cambios puntuales en la composición de la comunidad relacionados con la variación espacio-temporal, se seleccionaron con base en el análisis de agrupación jerárquica 6 estaciones ubicadas en la región de la boca (S12 y S13), medio (región de las islas; S9 y S10) y cabeza (S4 y S5) de la laguna. En general se observaron diferencias en la composición de la comunidad en relación a la región de la laguna. Por ejemplo, en la región de la boca (S12

y S13) durante el mes de noviembre se observó un incremento de Thermoplasmata del Grupo Marino II, además de la tendencia a mantener su abundancia para las clases Flavobateriales y Synechococcales, y un aumento de Puniceispirillales. En la región de las islas (S9 y S10) se observó un cambio evidente en la proporción de Thermoplasmata del Grupo Marino II y Verrucomicrobiales. Particularmente, en la estación S10, hay un aumento significativo en la proporción de Pirellulales y Sphingomonadales en noviembre, mientras que en agosto predominan Flavobateriales y Rhodobateriales. Para la región de la cabeza (S4 y S5) se observó que la proporción de SAR11 es significativamente mayor en noviembre, mientras que en agosto es para Synechococcales. Finalmente, en la estación S5, se observó un aumento de la clase Gammaproteobacteria en noviembre, mientras que la mayor abundancia fue de Flavobateriales y Rhodobateriales.

Además, considerando la contribución de los grupos raros a la diversidad de la comunidad, se evaluaron las diferencias en la ocurrencia de éstos en las mismas estaciones seleccionadas. Principalmente, se identificaron taxones no observados previamente incluyendo Thermoanaerobaculia (Thermoanaerobaculales), Acidimicrobiia y Desulfobacteria con los órdenes Thermoanaerobaculales, Microtrichales, Desulfobacterales y Desulfobulbales, respectivamente. Así como órdenes de clases antes mencionadas como Corynebacteriales, PeM15 y Propionibacteriales de Actinobacteria, Chitinophagales de Bacteridia, Vibrionales y Xanthomonadales de Gammaproteobacteria. Además, se identificaron patrones de distribución en las distintas regiones de la laguna (Fig. 9). En la región de la boca, en la estación S13 se observó al orden de Vibrionales. En la región de las islas, en la estación S9 durante el mes de agosto se observaron a Microtrichales y PeM15, mientras que en noviembre se observó a Chitinophagales. En la estación S10 solo en noviembre se observaron a Corynebacteriales y Propionibacteriales, y a Xanthomonadales. Con respecto a la región de la cabeza, la estación S4 durante agosto presentó únicamente el orden PeM15, en noviembre no hubo presencia de algún taxón. Finalmente, la estación S5 solo en el mes de noviembre presentó a la arquea Thermoanaerobaculia, y los órdenes Desulfobacterales y Desulfobulbales.



**Figura 8.- Gráfica de barras de la composición espacial y temporal de taxones microbianos abundantes (1 % de abundancia relativa) en diferentes estaciones de muestreo (S4, S5, S9, S10, S12, S13) durante dos épocas del año (agosto 21 y noviembre 21).** Cada barra representa una estación de muestreo específica en un mes particular y está segmentada por colores, que indican diferentes taxones microbianos, como Archaea y varias clases de Bacteria. Se observan diferencias notables en la estructura de la comunidad microbiana entre los dos meses en las mismas estaciones de muestreo, indicando posibles influencias de factores estacionales o ambientales.

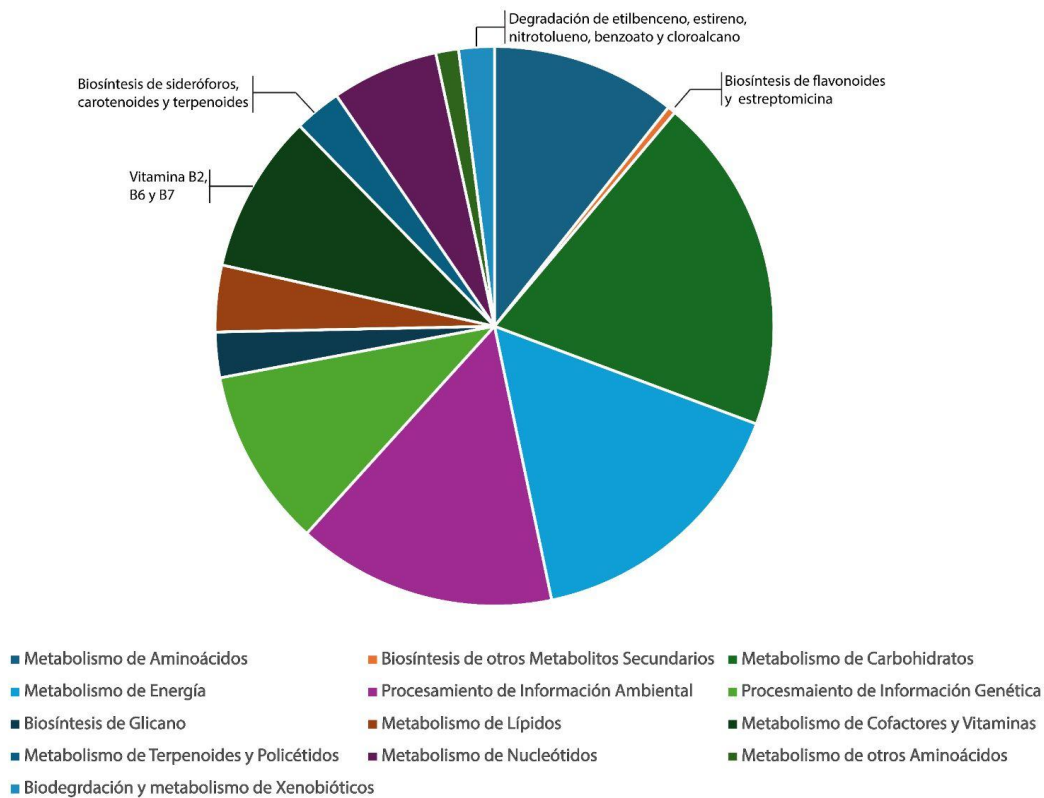


**Figura 9.- Gráfica de barras de la composición de taxones microbianos “raros” (0.9 a 0.5 % de abundancia relativa) en diferentes estaciones de muestreo (S4, S5, S9, S10, S12 y S13) durante dos épocas del año (agosto y noviembre).** Cada barra representa una estación de muestreo específica en un mes particular y está segmentada por colores, que indican diferentes taxones microbianos no observados en los resultados previos, como Archaea y varias clases de Bacteria.

### 6.5 Inferencia de metabolismo

Para inferir el potencial metabólico en la columna de agua, se utilizaron las secuencias y asignaciones taxonómicas de las ASVs que definen la composición taxonómica de la comunidad procariota. El análisis diferencial se realizó mediante dos aproximaciones principales: 1) la inferencia de genes y 2) la inferencia de rutas metabólicas, ambos considerando la diferencia estacional de la comunidad resuelta con el análisis jerárquico. Por lo que se analizaron y compararon las inferencias de los genes y rutas metabólicas presentes en los meses de agosto y noviembre. Respecto a lo encontrado del análisis de abundancia diferencial estacional se identificaron un total de 4529 genes, de los cuales 2214 contribuyen

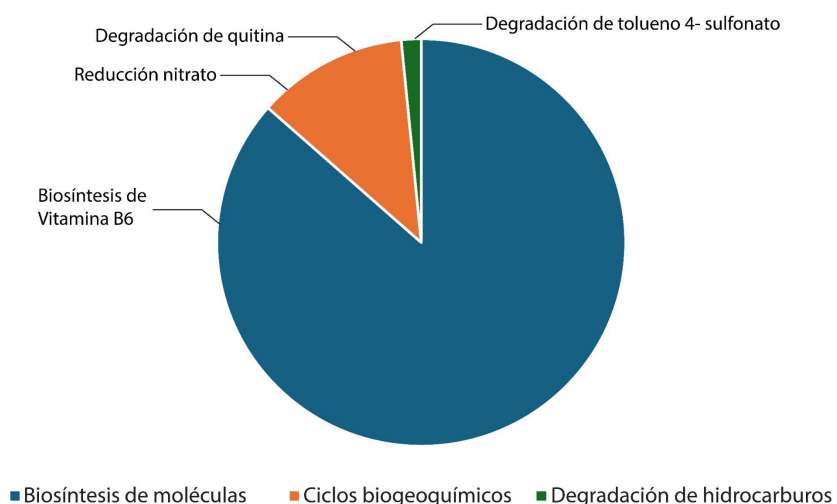
significativamente ( $p < 0.05$ ) a esta diferencia estacional. Dentro de las categorías relacionadas con los genes inferidos destacan el metabolismo de cofactores y vitaminas (9%), la degradación de xenobióticos (2 %), el metabolismo de terpenoides y policétidos (2.7 %) así como la biosíntesis de metabolitos secundarios (0.5 %), además de las categorías dentro del metabolismo central como el metabolismo de carbohidratos (20 %), lípidos (4 %), aminoácidos (11 %) y generación de energía (16 %). En particular, se seleccionaron los genes dentro de las categorías de metabolismo de cofactores y vitaminas, la degradación de xenobióticos, el metabolismo de terpenoides y policétidos así como la biosíntesis de metabolitos secundarios. Entre los que destacan genes de metabolismo de la vitamina B6, riboflavina (B2) y biotina (B7) (Metabolismo de cofactores y vitaminas) , la biosíntesis de flavonoides y estreptomina (Biosíntesis de metabolitos secundarios), biosíntesis de sideróforos, carotenoides y terpenoides (Metabolismo de terpenoides y policétidos), y degradación de etilbenceno, estireno, nitrotolueno, benzoato y cloroalcano (Degradación de xenobióticos) (Fig. 10).



**Figura 10.- Clasificación de la inferencia de genes relacionados con categorías de metabolismo para la comunidad de la columna de agua de la Laguna Ojo de Liebre.**

Gráfica de pastel en donde cada segmento representa la proporción de las categorías KO del total de genes inferidos.

Respecto a la inferencia de rutas metabólicas, se resolvieron un total de 420 rutas metabólicas de las cuales fue posible asignar a una categoría a 377. Del total de rutas asignadas, el 86.47% estaban relacionadas con la biosíntesis de moléculas incluyendo aminoácidos, el 11.93% están relacionadas directamente con los ciclos biogeoquímicos, como el carbono, nitrógeno y azufre, y el 1.56% relacionadas con degradación de hidrocarburos. Además, se observó que 130 rutas metabólicas contribuyen significativamente ( $p < 0.05$ ) a la diferenciación estacional del metabolismo inferido para la comunidad (Fig. 11). Dentro de las categorías significativas observadas se destacan la ruta de reducción de nitrato, la biosíntesis de vitamina B6, la degradación de quitina y la degradación de tolueno 4-sulfonato.



**Figura 11.- Clasificación de la inferencia de rutas metabólicas para la comunidad de la columna de agua de la Laguna Ojo de Liebre.** Gráfica de pastel en donde cada segmento representa la proporción de las categorías mayoritarias del metabolismo inferido.

## 7. DISCUSIÓN

### *Composición y estructura de la comunidad procariota*

En este estudio se analizó la variación espacio-temporal de la composición y estructura de la comunidad microbiana procariota de la columna de agua de la Laguna Ojo de Liebre. El análisis de secuencias del gen 16S ARNr mostró una comunidad procariota dominada por filos comúnmente encontrados en sistemas acuáticos en donde ocurren gradientes de salinidad. Particularmente se observó que la estructura de la comunidad se encontraba significativamente influenciada por parámetros fisicoquímicos como la temperatura y salinidad dividiendo a la comunidad en tres grupos de acuerdo al mes de muestreo principalmente, mientras que espacialmente la comunidad de la boca y cabeza se encuentran bien diferenciadas. Además, se infirieron rutas de metabolismo primario relacionadas con la biosíntesis de moléculas como aminoácidos, metabolismo heterotrófico, al igual que rutas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre, y de degradación de hidrocarburos. Lo anterior sugiere que la Laguna Ojo de Liebre es un sistema diverso con respecto a la comunidad microbiana de la columna de agua y que tiene el potencial de aportar directamente a la biogeoquímica del ecosistema.

Similar a lo reportado en otros ambientes, las observaciones de este trabajo sugieren que las propiedades fisicoquímicas de la laguna tienen un efecto en la composición y estructura de la comunidad microbiana (Thompson & Lee, 2020). Se ha observado en diferentes estudios que variables como la salinidad, temperatura y pH tienen un efecto significativo en las comunidades microbianas de ambientes acuáticos. Principalmente en ambientes marinos la temperatura tiene un efecto directo y más evidente en la función de las comunidades microbianas (Zhou *et al.*, 2013). Respecto a las características fisicoquímicas y dinámica de Laguna Ojo de Liebre, se observó un gradiente para la temperatura y salinidad, con relación significativa en la estructura de la comunidad procariota que se divide espacial y temporalmente en grupos (Fig. 2). Por ejemplo, los meses de agosto y noviembre, que mostraron la mayor diferencia en la composición de la comunidad, se caracterizaron por presentar un gradiente fisicoquímico asociado a periodos de marea muerta (CICESE, 2024) que ocurrieron durante los días de muestreo. Los periodos de marea muerta favorecen a la diferenciación estacional en la laguna

ya que cuando la marea es baja, si la Bahía de Vizcaíno tiene una dinámica fuerte, entonces el agua de la laguna sale y ocurre una entrada de agua nueva con una diferencia de temperatura, salinidad y densidad (Álvarez-Borrego y Granados-Guzmán, 1992). En específico, se observó que la temperatura mostró la correlación más significativa ( $r^2 = 0.77$ ,  $p = 0.001$ ) con la composición de la comunidad, explicando la agrupación de las muestras del mes de agosto que resultó el más cálido en el periodo de muestreo, mientras que la densidad, aunque no significativamente, explica la agrupación de las muestras para el mes de noviembre, y su división entre boca y el resto de la laguna. Esta dinámica es similar a lo reportado para otras lagunas hipersalinas costeras en donde los gradientes de temperatura y salinidad se encuentran influenciados por los rangos de marea, tasas de evaporación, circulación y morfología (Clementino *et al.*, 2018; Cury *et al.*, 2011).

Con respecto a la diferenciación espacial entre boca y cabeza de la laguna, la influencia de la marea en el tiempo de residencia de las masas de agua entre estas regiones puede explicar el posible recambio y permanencia de distintos taxones que contribuye a la variación temporal de la comunidad (Álvarez-Borrego, 2004). Por ejemplo, Soto-López (2024) reportó que los meses con mayor tiempo de residencia fueron noviembre (124 días) durante el periodo de muestreo. Se ha registrado previamente que cuando la marea es baja en la región de la boca ocurre un intercambio de agua densa del interior que se desplaza y es reemplazada por agua menos densa en la superficie, por lo que el tiempo de residencia es menor. En contraste, en la región de la cabeza el tiempo de residencia puede ser mayor si la circulación en Bahía Vizcaíno es débil, aunque también depende de los cambios en el patrón de vientos (Soto-López, 2024).

Sin embargo, aun considerando la dinámica de la laguna y su efecto en la estructura de la comunidad, fue posible la diferenciación de taxones microbianos que se encontraran de manera recurrente con respecto a su frecuencia y abundancia, a lo que se denominó como el núcleo de la comunidad. Estos grupos taxonómicos abundantes (>1% abundancia relativa entre estaciones y periodos de muestreo) resultaron similares a aquellos observados en otros estudios realizados en ambientes hipersalinos con condiciones de salinidad y rangos de temperatura similares a los observados en la Laguna Ojo de Liebre. Por ejemplo, los filamentos

Pseudomonadota, Bacteroidota, Actinobacteriota, Cyanobacteria y Verrucomicrobiota han sido previamente reportados para la Laguna de Araruama en rangos de salinidad de 36 a 50 (Clementino *et al.*, 2008) y la Laguna de Thau con rangos de salinidades de 25 a 40 y un gradiente térmico de ~10 a 20 °C (Trombetta *et al.*, 2022). Además, fue posible distinguir el efecto de la dinámica estacional que influye en la estructura y composición de la comunidad procariota con patrones temporales en la distribución y abundancia de los filos que componen el núcleo de la comunidad (Fig. 5). Por ejemplo, se observó un patrón en la variación de la abundancia del filo Cyanobacteria, que fue más alta en marzo y disminuyó en los meses posteriores, alcanzando su valor más bajo en noviembre. Adicionalmente, los filos Planctomycetota y Verrucomicrobiota mostraron una mayor abundancia en noviembre, en comparación al resto de los meses estudiados. Tanto como Verrucomicrobiota y Planctomycetota son filos generalmente mesófilos que prefieren temperaturas de ~20° C a 35°C; sin embargo, algunas especies pueden tolerar rango de temperatura más amplios. Es común encontrar ambos filos juntos, aunque generalmente no se presentan como dominantes en la comunidad microbiana en la columna de agua, ya que prefieren sedimentos ricos en materia orgánica. Por ejemplo, representantes de estos filos pueden contribuir a la degradación de compuestos orgánicos complejos e incluso estar relacionados con la degradación de hidrocarburos (Lee *et al.*, 2009; Schlesner & Stackebrandt, 1987; Hedlund & Staley, 2006). De manera similar, la presencia del filo Actinobacteriota, con la clase representativa Acidimicrobia, su predominancia en ambientes hipersalinos podría deberse a su capacidad para resistir altas concentraciones de sal mediante la acumulación de solutos compatibles además de su capacidad para la formación de esporas o estructuras resistentes, y su versatilidad metabólica que les permite utilizar una amplia gama de sustratos y concentraciones de oxígeno (Ventura *et al.*, 2007). En general, la variación estacional observada podría estar relacionada por cambios en la disponibilidad de nutrientes, la luz solar y la temperatura, además de la dinámica de la laguna que se encuentra directamente relacionada con las mareas. La entrada de agua marina rica en nutrientes ocurre principalmente por acción de las mareas, y en general siguen un patrón estacional siendo mayores concentraciones en invierno y principios de primavera debido al afloramiento oceánico en el Pacífico (Álvarez-Borrego, 2004). Sin embargo, la escasa entrada de agua

dulce provoca que los niveles de nutrientes sean relativamente bajos en comparación con otras lagunas costeras más influenciadas por ríos (Kjerfve, B., & Magill, K. E. 1989).

A diferencia de otros ambientes hipersalinos en donde se han observado distintos filos de arqueas como Euryarchaeota y Thaumarchaeota (Trombetta *et al.*, 2022) en la laguna de Thau, o los filos Euryarchaeota y Halobacteriota en la laguna de Araruma (Clementino *et al.*, 2018), en este estudio solo se observó el filo Thermoplasmata afiliado con el Grupo Marino II del dominio Arquea. Este filo ha sido previamente reportado como parte de la comunidad en tapetes microbianos en la Bahía de Vizcaíno, conectada a la Laguna Ojo de Liebre (Roberson, 2009). En particular los representantes de Thermoplasmata que se observan en la columna de agua de ambientes marinos, como el Grupo Marino II, ya que desempeñan un papel importante en la renovación de la materia orgánica, especialmente material orgánico disuelto derivado del fitoplancton. Por lo que en ambientes marinos se considera que la presencia de este grupo de Thermoplasmata está asociado con una alta abundancia de fitoplancton (Hugoni, *et al.*, 2013), lo cual es relevante para la laguna considerando que se trata de un ambiente altamente productivo (CONANP, 2004).

También se observó la presencia de grupos taxonómicos denominados como raros (< 1% de abundancia relativa), que además contribuyen a la diversidad estacional de la comunidad (Fig. 6 y 7). En ambientes acuáticos, los grupos raros pueden tener un impacto significativo en la diversidad ecológica, ya que su presencia puede aumentar la complejidad de las interacciones biológicas y de las redes tróficas (Lyons *et al.*, 2005). Los grupos raros identificados en la Laguna Ojo de Liebre son comparables con aquellos observados en otros ambientes con salinidad comparable (30-37). Por ejemplo, el filo Desulfobacterota se han encontrado en el Lago Hipersalino Limski Kanal (Sassi *et al.*, 2012), mientras que el filo Bacillota, específicamente Bacilli, ha sido identificado en salinas de evaporación de Santa Pola y en las salinas del Great Salt Lake (Baxter *et al.*, 2005; Lefort *et al.*, 2002). La contribución de grupos raros a la diversidad de comunidades microbianas se ha observado en distintos ambientes en donde se ha demostrado que las comunidades microbianas raras desempeñan un papel clave en la degradación de compuestos orgánicos, incluidos los contaminantes (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016; Pester *et al.* 2010). Por ejemplo, integrantes del filo Bacillota que se caracterizan

por un metabolismo reductor de sulfato se han encontrado con abundancias relativas menores al 0.01% (Pester *et al.*, 2010). En comparación, los filos Crenarchaeota, Acidobacteriota, Bdellovibrionota, Chloroflexota, Gemmatimonadota, Latescibacterota, Marinimicrobia y Myxococcota incluyen taxones que generalmente habitan en sedimentos marinos (Könneke *et al.*, 2005; DeLong *et al.*, 2006; Biddle *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2008; Quaiser *et al.*, 2011; Offre *et al.*, 2013; Muñoz-Dorado *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017; Landry *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2020). En particular, la presencia de estos últimos filos sugiere que la comunidad de la columna de agua se encuentra influenciada por procesos de resuspensión del sedimento que potencialmente aportan microorganismos a la columna de agua, y que en función de las condiciones fisicoquímicas pueden sobrevivir. Estos aportes por resuspensión del sedimento se han observado en otros ambientes como el Mar Báltico en donde distintos procesos han intensificado la resuspensión de sedimentos, lo que ha contribuido a cambios en las comunidades microbianas, afectando el ciclo de nutrientes y la calidad del agua (Guan *et al.*, 2019). Además, en el Lago Gatún también se ha observado que la resuspensión de sedimentos, por la actividad de embarcaciones, resulta un mecanismo importante para el aporte de microorganismos a la columna de agua. Estos microorganismos pueden incluir degradadores de hidrocarburos, lo cual es relevante dada la actividad industrial en la región (Sun *et al.*, 2020).

Además, se observó que la ocurrencia de los grupos raros y su relación con la diversidad mostraba un patrón espacial y temporal. Por ejemplo, el valor de diversidad más alto se observó para el mes de noviembre en relación con el aumento significativo de ASVs identificadas como raras, en comparación con el mes de agosto que presentó el menor valor de diversidad, así como la menor abundancia de ASVs raras. La distribución espacial de estos taxones raros parece estar relacionada con la dinámica hidrográfica de la laguna, especialmente con el tiempo de residencia del agua y la circulación influenciada por las mareas. En la cabeza de la laguna (S5), caracterizada por un alto tiempo de residencia durante periodos de marea muerta, se observó una mayor abundancia de taxones como Thermoanaerobaculia (Thermoanaerobaculales) y Desulfobacterota (Desulfobacterales y Desulfobulbales), mientras que Actinobacteriota (Microtrichales, Corynebacteriales, PeM15 y Propionibacteriales) se observaron en la zona media (S9 agosto y S10 noviembre) donde la

circulación es más dinámica y el tiempo de residencia del agua es menor debido al intercambio de agua que ocurre entre la laguna y la entrada de agua del océano, que también corresponde a la zona en donde se registró una mayor diversidad taxonómica. La variabilidad en los tiempos de residencia, especialmente en función de la fuerza de la circulación en Bahía Vizcaíno, afecta directamente la renovación del agua y por lo tanto pudiera tener un efecto en la entrada o permanencia de estos grupos raros. Por ejemplo, en periodos de débil circulación, es más probable que el agua con especies de origen externo permanezca más tiempo en la laguna, proporcionando una oportunidad para la creación de microhábitats únicos que pueden albergar grupos que solo ocurren temporalmente (Mehrabi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2024).

#### *Inferencia temporal del metabolismo procariota*

El metabolismo de vitaminas como la piridoxina (B6), la riboflavina (B2) y la biotina (B7) en ambientes hipersalinos costeros y oceánicos es un área de creciente interés debido a su papel clave en la supervivencia y adaptación al medio ambiente marino. Estos ambientes, son habitados por comunidades microbianas que dependen de cofactores vitamínicos para llevar a cabo procesos metabólicos esenciales; por ejemplo, numerosas reacciones enzimáticas como el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas. En particular, la piridoxina (B6) es clave en el metabolismo de aminoácidos, mientras que la riboflavina (B2) participa en las reacciones de oxidación-reducción como parte de los cofactores FAD (flavina adenina dinucleótido) y FMN (flavina mononucleótido). Por su parte, la biotina (B7) está involucrada en la síntesis de ácidos grasos y en el metabolismo de los carbohidratos, facilitando reacciones de carboxilación (Oren, 2011; Gómez-Consarnau *et al.*, 2018). El estudio del metabolismo de estas vitaminas en los ecosistemas marinos, destaca que son sintetizadas principalmente por microorganismos marinos, como bacterias y fitoplancton (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023), y son esenciales no solo para los productores primarios, sino también para los consumidores en niveles tróficos superiores, tales como el zooplancton y los peces (Wang *et al.*, 2023). Por ejemplo, en zonas como el Atlántico Norte, Long Island y las regiones costeras de California, se ha documentado que estas vitaminas juegan un papel crítico en los ciclos biogeoquímicos locales y en la actividad metabólica del fitoplancton y bacterioplancton. Por ejemplo, en el Atlántico Norte, se ha registrado que la disponibilidad de riboflavina (B2) está

vinculada a la productividad primaria y a las interacciones microbianas durante las floraciones de fitoplancton. Este fenómeno ocurre debido a que varias bacterias marinas son capaces de producir riboflavina en condiciones oligotróficas, lo que favorece la nutrición del fitoplancton (Zhang *et al.*, 2017). En estudios realizados en las bahías de Long Island, con intercambio de agua restringido con el Océano Atlántico adyacente, se ha observado que la biotina (B7) es esencial en las comunidades bacterianas responsables de la degradación de materia orgánica, especialmente en zonas influenciadas por la descarga de ríos y la formación de zonas hipóxicas. Por lo tanto, la disponibilidad de estas vitaminas afecta directamente la salud y la productividad de los ecosistemas marinos, lo que a su vez tiene un impacto en las pesquerías y los recursos marinos utilizados por los seres humanos.

Lo anterior es particularmente relevante en la laguna Ojo de Liebre, en dónde distintos organismos de importancia ecológica y económica, así como distintas actividades socioeconómicas convergen y dependen de la productividad de la laguna (CONANP, 2004 y 2013; CONANP y SEMARNAT, 2016). Por ejemplo, en la comunidad microbiana núcleo de la Laguna Ojo de Liebre, se identificaron diversos taxones que podrían participar activamente en la biosíntesis de vitaminas B. Entre estos se observaron dentro del filo Pseudomonadota los órdenes Rhizobiales, Rhodobacterales, Sphingomonadales y el clado SAR11, del filo Cyanobacteriota el orden Synechococcales y del filo Bacteroidota los órdenes Flavobacteriales y Sphingomonadales. Por ejemplo, se ha encontrado que algunas bacterias del filo Pseudomonadota *i.e.* Alteromonadales, Chromatiales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, y Cianobacteriota como *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, tienen la capacidad de sintetizar biotina *de novo*. Además, grupos como las Alphaproteobacteria *i.e.* Magnetococcales, Rhizobiales, Rhodobacterales, Sphingomonadales, y las bacterias del filo Bacteroidota *i.e.* Cytophagia, Flavobacteriia y Sphingobacteriia también están involucradas en la producción de biotina, lo que resalta su relevancia en el ciclo de nutrientes y la dinámica ecológica de estos ambientes marinos (Sañudo-Wilhelmy *et al.* 2006). En las aguas costeras de California, se ha observado que la vitamina piridoxina (B6), a través de su forma activa piridoxal-5'-fosfato (PLP), facilita la síntesis de osmoprotectores en microorganismos que enfrentan fluctuaciones en salinidad y nutrientes en microorganismos, por ejemplo, *Pelagibacter* ubique (SAR11) (Alfa-proteobacteria), *Vibrio fischeri* (Gamma-proteobacteria) y las cianobacterias *Prochlorococcus*

marinus y *Synechococcus* sp. (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, estudios posteriores pueden enfocarse en la relación de estos taxones con la comunidad fitoplanctónica de la laguna y el potencial metabolismo de vitaminas que favorecen a la productividad de la laguna.

En los ecosistemas marinos costeros de California se ha estudiado cómo las bacterias adaptan su metabolismo para la síntesis de metabolitos secundarios en presencia de nutrientes limitados. En estos casos, la competencia microbiana en un ambiente con alta densidad de especies microbianas, como ocurre en los sedimentos de sistemas productivos (aprox.  $10^8$  células/g de sedimento húmedo; Luna *et al.*, 2002), induce la activación de rutas metabólicas que además de ser útiles para su supervivencia, son potencialmente valiosas para aplicaciones farmacológicas, resaltando el valor de distintas especies bacterianas como fuente de antibióticos naturales (Prochnow *et al.*, 2004). Dentro de los resultados de inferencia metabólica se observó la posible presencia de genes relacionados con la producción de estreptomicina, un antibiótico aislado del metabolismo secundario del género *Streptomyces* sp. En la laguna Ojo de Liebre, siguiendo métodos cultivo dependientes se han aislado cepas pertenecientes a este género (Zamora-Quintero *et al.*, 2022), lo que contrasta con nuestras observaciones taxonómicas. Sin embargo, considerando el aislamiento directo de representantes de este género no se descarta por completo la posible producción de este compuesto, y en general de distintos metabolitos con potencial actividad antibiótica producidos por representantes del filo Actinobacteriota presentes en los sedimentos de la laguna (Zamora-Quintero *et al.*, 2022), que en este estudio también se encuentran como parte del núcleo de la comunidad procarionta.

En referencia a la biosíntesis de metabolitos secundarios como sideróforos, carotenoides y terpenoides, la presencia de estos sugiere una comunidad que ha desarrollado estrategias evolutivas complejas que permiten a los microorganismos prosperar bajo condiciones ambientales extremas, como limitaciones de nutrientes, radiación ultravioleta intensa y altas salinidades. Por ejemplo, la producción de sideróforos demuestra cómo los microorganismos han desarrollado sistemas altamente especializados para adquirir hierro, un nutriente generalmente limitante en la columna de agua marina debido a su baja solubilidad en

condiciones oxigenadas, y que por lo tanto las comunidades microbianas también influyen en el ciclo biogeoquímico del hierro, impactando a niveles tróficos superiores en estos ecosistemas. En particular, se ha reportado la potencial producción de sideróforos como la Desferrioxamina E en diversos géneros del filo Actinobacteriota aislados de la Laguna Ojo de Liebre, en relación a una posible respuesta de estrés oxidativo y respiración celular (Zamora-Quintero *et al.*, 2022), lo cual resulta relevante como una posible estrategia adaptativa para la adquisición de hierro en este ecosistema ya que se ha reportado la ausencia de enriquecimiento significativo de hierro en los sedimentos de la laguna (Valdivieso-Ojeda *et al.*, 2021). Con base en lo anterior, se puede inferir que la dependencia de estas moléculas en zonas hipersalinas resalta su papel como un factor determinante en la estructura y función de las comunidades microbianas locales. Por ejemplo, la presión selectiva por un elemento limitante puede favorecer la frecuencia y abundancia de los microorganismos que presentan metabolismos secundarios capaces de quelar hierro y hacerlo biológicamente accesible, (Vraspir & Butler, 2009). Estos microorganismos no sólo aseguran su propia supervivencia, sino que pueden influir indirectamente en la comunidad al modificar la disponibilidad de hierro para otros organismos, regulando patrones de exclusión y dominancia (Vraspir & Butler, 2009; Oren, 2014), y con un posible efecto en la dinámica de los ciclos de nitrógeno y carbono debido a las interacciones entre especies que compiten o colaboran en la adquisición de hierro (Valdivieso-Ojeda *et al.*, 2021).

En relación a la producción de flavonoides por metabolismo microbiano en ambientes marinos o salinos, investigaciones en diferentes ecosistemas muestran que la relevancia de estos compuestos está relacionada con la protección frente al estrés oxidativo y la radiación UV, lo que es particularmente evidente en lagunas costeras de alta salinidad (Ventosa *et al.*, 2008, Gunde-Cimerman *et al.*, 2018), como Ojo de Liebre. Durante el periodo de muestreo se observaron rangos en los valores de temperatura y salinidad en un gradiente temporal y estacional para los meses de agosto (25-27°C y 34-45) y noviembre (19-21°C y 34-42), y con valores de radiación UV reportados para la laguna en estas temporadas que varían desde 134.4 kW/m<sup>2</sup>/día en agosto y 85.3 kW/m<sup>2</sup>/día para noviembre (radiación acumulada por día) (NASA POWER, 2022). En particular, los valores de radiación UV se encuentran dentro de los límites reportados para considerar que las comunidades microbianas de la laguna se

encuentran bajo estrés oxidativo (Alonso-Reyes *et al.*, 2021). Por ejemplo, en las salinas de Santa Pola y en otras áreas hipersalinas del Mar Mediterráneo, se tiene registro de que la comunidad de bacterias y arqueas se caracterizan por su capacidad para producir compuestos como los carotenoides y los flavonoides, como la bacteriorrubina y la astaxantina. Estas moléculas permiten estabilizar las membranas celulares y actúan como antioxidantes potentes, neutralizando especies reactivas de oxígeno generadas en condiciones de alta exposición solar. Además, se reconoce su importancia biotecnológica, desde antioxidantes naturales hasta colorantes alimentarios, lo que sustenta el potencial económico de explorar estos ecosistemas marinos extremos como fuentes sostenibles de biomoléculas (Goodwin *et al.*, 2017; Oren, 2014). Adicionalmente, los terpenoides sintetizados por bacterias marinas y halófilas, destacan por su contribución a la homeostasis de membranas en condiciones osmóticas extremas y también por su papel en la biosíntesis de compuestos bioactivos. Un ejemplo de estos metabolitos es la salinosporamida A producida por el género de actinobacterias marinas y tienen aplicaciones farmacológicas de gran valor, incluyendo propiedades anticancerígenas. Los terpenoides sintetizados por bacterias marinas y halófilas, cumplen un papel esencial en ecosistemas costeros, incluyendo lagunas costeras, al contribuir significativamente al reciclaje de nutrientes y la regulación de redes tróficas (Fenical *et al.*, 2006; Seemann *et al.*, 2020).

Aun cuando la metodología de inferencia de metabolismo que se llevó a cabo no permite la relación directa entre los taxones identificados y los metabolismos, se puede destacar un ejemplo en particular de la posible relación entre la abundancia del orden Synechococcales y el metabolismo de flavonoides. Considerando que las inferencias metabólicas se realizaron en una escala temporal, con las comparaciones de las diferencias entre los meses de agosto y noviembre, se observa la fluctuación del orden Synechococcales en diferentes puntos de la laguna (Fig. 8) entre estos meses de muestreo. Particularmente, se observa un gradiente en su abundancia entre las estaciones S4 (cabeza) y S12 y S13 (boca), en dónde es mayor para S4 en el mes de agosto. Durante este periodo y estación es en dónde se reportan las mayores salinidades y temperaturas, por lo que la producción de metabolitos como los flavonoides serviría de protección para los microorganismos en estas condiciones, considerando que este tipo de metabolismo contribuye significativamente con la diferencia estacional del metabolismo

inferido. En lagunas hipersalinas de Europa y América del Norte, donde las fluctuaciones de salinidad y la alta radiación solar son constantes, se ha encontrado que la cianobacteria *Synechococcus* (orden *Synechococcales*) sintetiza flavonoides y otros antioxidantes para protegerse del estrés ambiental. Estos compuestos, además de proteger contra el daño oxidativo, juegan un papel importante en la regulación osmótica y la estabilización celular en condiciones extremas de este microorganismo (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Lo anterior sugiere una potencial relación entre la abundancia del orden *Synechococcales* y la producción de flavonoides en la laguna Ojo de Liebre en función de la variación estacional del ambiente.

La biodegradación de compuestos xenobióticos en ambientes hipersalinos costeros demuestra la adaptabilidad microbiana a condiciones extremas y su potencial para la remediación ambiental. Por ejemplo, estudios sobre la biodegradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos han identificado arqueas halófilas, que son capaces de degradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos incluso en condiciones de salinidad superiores al 25% de NaCl. Estas especies poseen rutas metabólicas únicas adaptadas a condiciones de estrés osmótico y bajos niveles de oxígeno, lo que las convierte en candidatas valiosas para procesos de remediación en entornos áridos y salinos (Oren, 2014). No obstante, en el presente estudio no se encontró una gran diversidad de arqueas más allá del filo *Thermoplasmata*, lo que sugiere que la viabilidad de la degradación de tolueno requiere una mayor exploración. Esto se debe a que la degradación del tolueno en la columna de agua es poco común, ya que la difusión y dilución del tolueno en el agua reducen significativamente la probabilidad de contacto con los microorganismos responsables de este proceso. En comparación, en suelos o sedimentos, donde el tolueno tiende a acumularse, la biodegradación resulta más eficiente debido a la mayor disponibilidad de microorganismos especializados y adaptados a la degradación de hidrocarburos (Widdel & Rabus, 2001). Estudios posteriores pudieran enfocarse en la cuantificación y caracterización de fuentes de hidrocarburos, que posiblemente se concentren en los sedimentos y que pudieran ser resuspendidos a la columna de agua por la dinámica de la laguna antes mencionada. Además de explorar con más detalle la diversidad de microorganismos hidrocarbonoclastas que se pudieran encontrar tanto en los sedimentos como en la columna de agua de agua.

Finalmente, se destaca el potencial metabolismo de degradación de la quitina. La degradación de la quitina en ecosistemas acuáticos, como lagunas, es crucial para los ciclos del carbono y del nitrógeno, impactando directamente su reciclaje (Keyhani y Roseman, 1999). Este proceso conecta el flujo de materia orgánica con la dinámica microbiana, ya que este biopolímero, proveniente principalmente de zooplancton y detritos, es descompuesto por microorganismos especializados (Souza et al., 2011), siendo los más comúnmente estudiados Chitinofagales (Bacteroidota) y Vibrionales (Gammaproteobacteria). Los Chitinofagales desempeñan un papel importante en consorcios microbianos en ambientes ricos en materia orgánica degradan la quitina principalmente a través de rutas que incluyen la actividad de quitinasas extracelulares, que rompen el polímero en oligómeros como quitobiosa y otros derivados más simples (Gooday, 1990), mientras que los Vibrionales, destacan por su versatilidad genética para procesar quitina y derivados, presentando capacidades enzimáticas especializadas para hidrolizar quitina mediante quitinasas endo y exo (familias GH18 y GH19), sistemas de transporte específicos de quitobiosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc), y mecanismos para la deacetilación de quitina a quitosano (Techkarnjanaruk et al., 1997; Meibom et al., 2004). En este estudio, los órdenes Chitinofagales y Vibrionales se observaron dentro de los grupos raros durante el mes de noviembre en distintos sitios de la laguna, S5 (cabeza) y S10 (zona central), respectivamente. Aun cuando en este estudio no se realizó una evaluación de la sucesión entre la comunidad fitoplanctónica y zooplanctónica, para la laguna se ha reportado la presencia de grupos de fitoplancton de distintos tamaños que permiten la actividad trófica de la herbivoría del zooplancton (Sánchez-Covarrubias et al., 2021). Lo anterior sugiere que, posterior al pico de abundancia entre grupos de fito y zooplancton pudiera haber una acumulación de quitina como sustrato disponible para estos taxones bacterianos, lo cual también se encuentra favorecido por los tiempos de residencia en el interior de la laguna durante los periodos de marea muerta en noviembre. Sin embargo, estudios que integren los distintos niveles tróficos de los microorganismos que habitan la laguna permitiría elucidar las redes de transferencia de energía, que, como este proceso, conectan directamente distintos sustratos con el metabolismo microbiano, la productividad primaria y la regeneración de nutrientes, resaltando así su importancia ecológica en los ecosistemas.

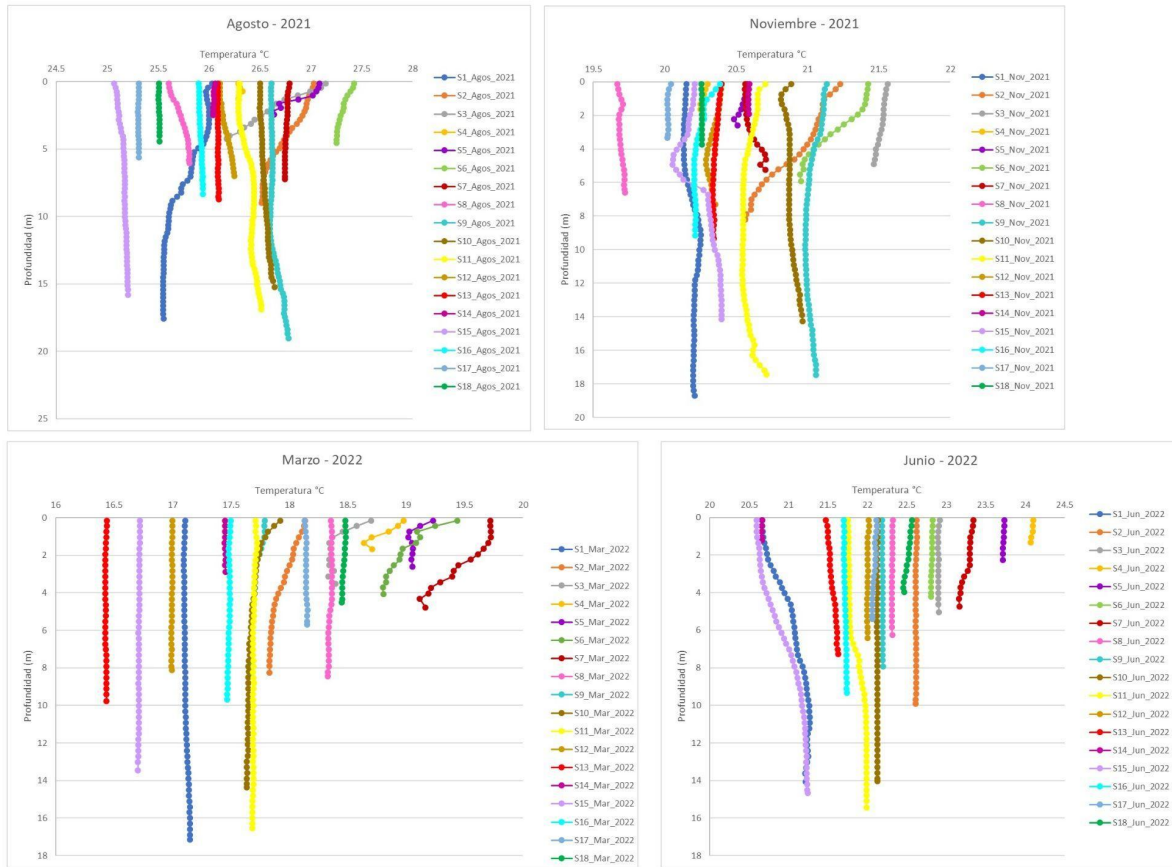
## 8. CONCLUSIONES

La comunidad procariota de la Laguna Ojo de Liebre presenta un núcleo taxonómico (>1% de abundancia relativa) dominado por filos bacterianos como Actinobacteriota, Planctomycetota, Cyanobacteriota, Verrucomicrobiota, Bacteroidota y Pseudomonadota, similares a los encontrados en otros ambientes hipersalinos (típicamente aguas con salinidades superiores a 40, pudiendo alcanzar hasta 300). La estructura y composición de la comunidad microbiana está influenciada por factores ambientales, como los gradientes de salinidad y temperatura. Por ejemplo, se observaron cambios temporales en la abundancia de los filos núcleo asociados con la variación de los factores ambientales de la laguna como la luz solar, temperatura, densidad y disponibilidad de nutrientes, siendo la temperatura el factor con un efecto más significativo en la estructura de la comunidad. Adicionalmente, se destaca la presencia de taxones "raros" (<0.5 % abundancia relativa) como Thermoanaerobaculia (Thermoanaerobaculales) y Desulfobacterota (Desulfobacterales y Desulfobulbales), que mostraron una distribución específica en áreas de la laguna y temporadas de muestreo en relación con alto tiempo de residencia de agua y menos renovación, como ocurre en la cabeza de la laguna durante el mes de noviembre. Estos grupos "raros" contribuyen a la diversidad temporal de la laguna.

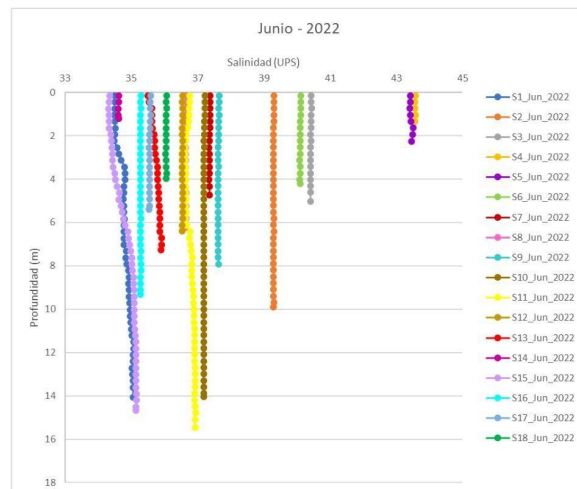
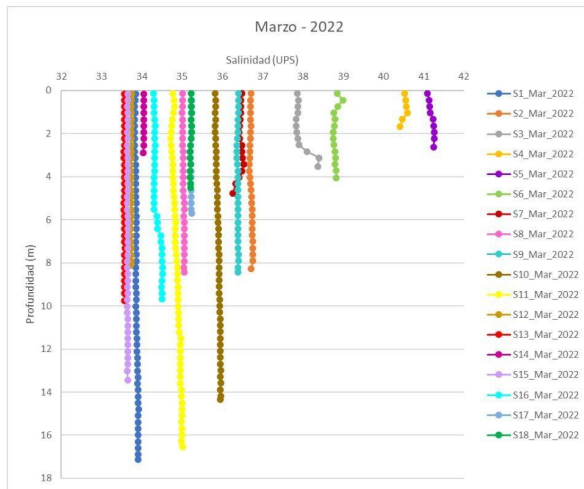
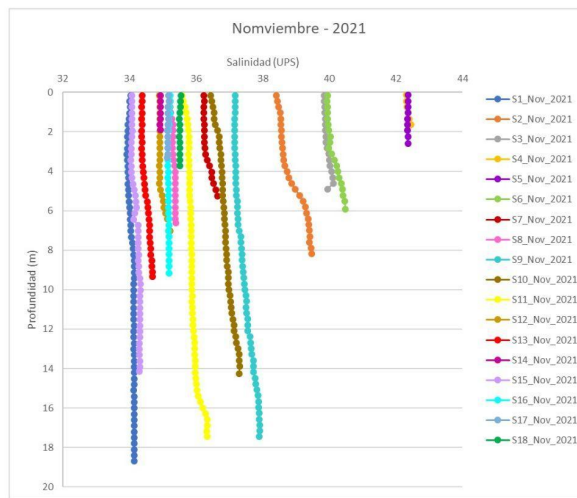
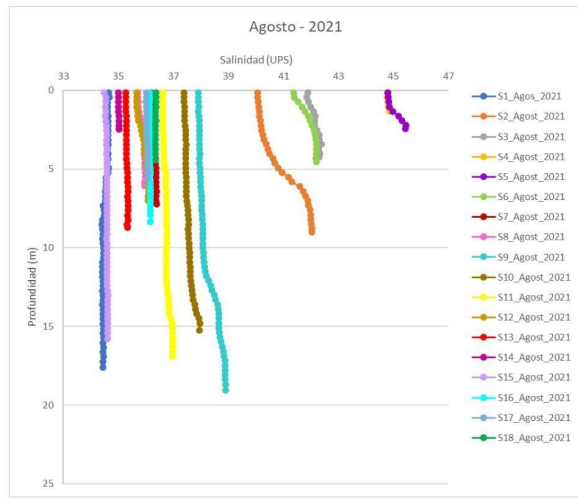
En cuanto a la inferencia del metabolismo microbiano, se identificaron genes y rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo de cofactores y vitaminas, la degradación de xenobióticos, el metabolismo de terpenoides y policétidos, así como la biosíntesis de metabolitos secundarios. Además, se encontraron rutas metabólicas dentro del metabolismo central, como el metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y generación de energía. Entre las rutas significativas destacan: la reducción de nitrato, la biosíntesis de vitamina B6, la degradación de quitina y la degradación de tolueno 4-sulfonato. Estas observaciones refuerzan el rol clave de la comunidad microbiana procariota en los ciclos biogeoquímicos de la columna de agua de la laguna y sugieren la existencia de taxones con capacidades metabólicas para la degradación de contaminantes y la producción de metabolitos secundarios. Asimismo, los metabolitos secundarios producidos por esta comunidad podrían facilitar interacciones microbianas que afectan la composición y estructura de la misma, al mismo tiempo que

mantienen procesos activos de reciclaje de nutrientes, esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas.

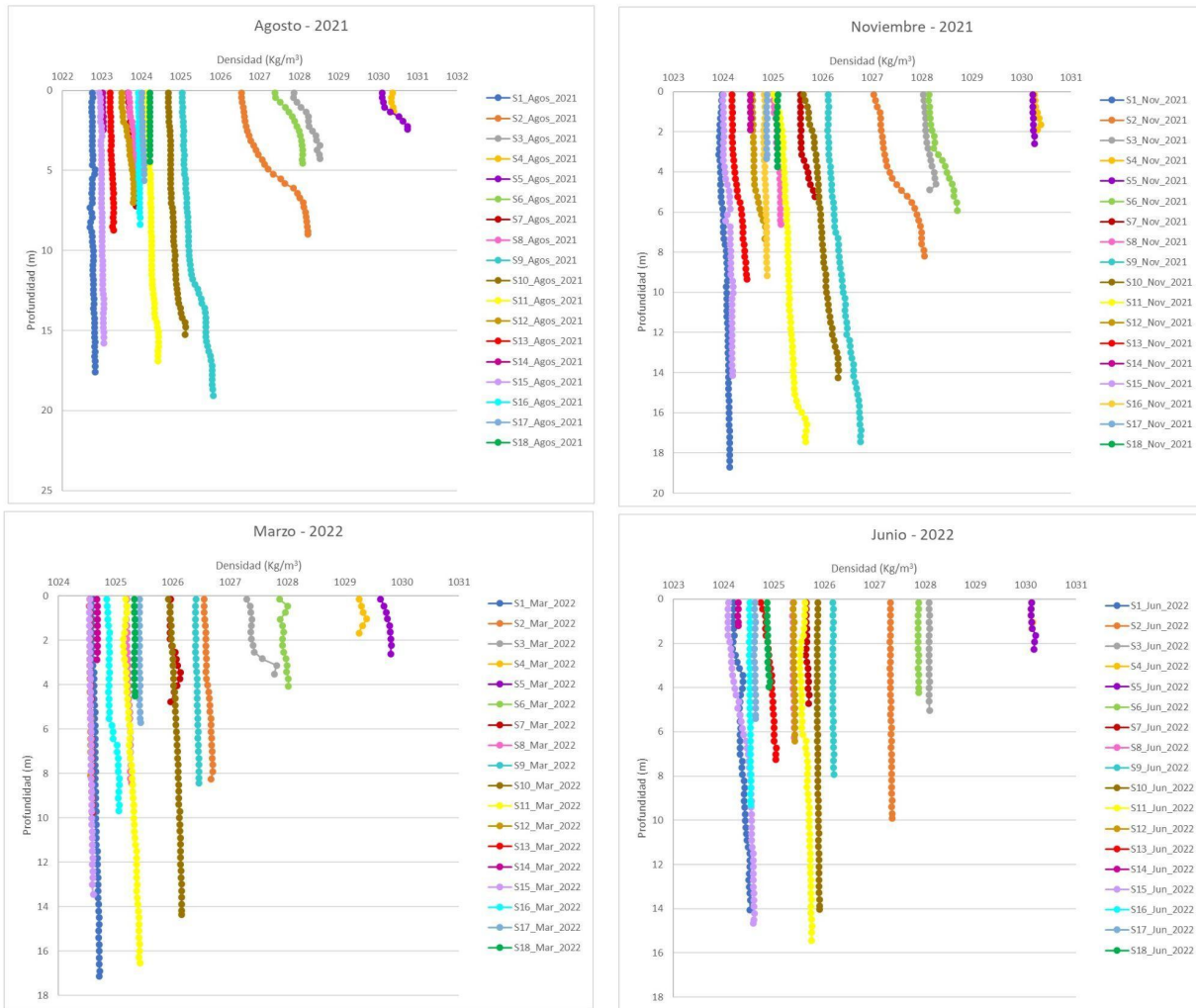
## 9. ANEXOS



Anexo 1.- Perfiles de temperatura 2021-2022 de los meses de muestreo de Laguna Ojo de Liebre.



**Anexo 2. Perfiles de salinidad 2021-2022 de los meses de muestreo de Laguna Ojo de Liebre.**



**Anexo 3. Perfiles de densidad 2021-2022 de los meses de muestreo de Laguna Ojo de Liebre.**

## 10. REFERENCIAS

Alonso-Reyes, D.G., Galván, F.S., Portero, L.R. et al. Genomic insights into an andean multiresistant soil actinobacterium of biotechnological interest. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 166 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03129-9>

Alvarez-Borrego y Granados-Guzmán, 1992. Variación espacio-temporal de temperatura en un hábitat de invierno de la ballena gris: laguna ojo de liebre. *Ciencias Marinas* (1992), 18(1): 151-165.

Alvarez-Borrego, S. (2004). Oceanografía física y biológica de Bahía de Vizcaíno, Baja California. *Ciencias Marinas*, 30(1), 1-20.

Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., & Amann, R. (2000). "Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns." *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3052-3057.

Arahal, D. R., Márquez, M. C., & Ventosa, A. (2007). Salting in the ancient world and its economic impact. *Saline Systems*, 3(1), 1-9.

Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the Deepwater Horizon spill. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6709-6715.

Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257-263.

Baxter, B.K., et al. "Microbial diversity of Great Salt Lake." In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, edited by N. Gunde-Cimerman, et al., Springer, 2005.

Begon M, Townsend CR, Harper JL 2006. *Ecology. From individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing. Oxford. Reino Unido. 759 pp.

Bermúdez Almada B. 2003. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar. Reserva de la Biosfera "El Vizcaíno", Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2-9.

Biddle, J. F., Lipp, J. S., Lever, M. A., Lloyd, K. G., Sørensen, K. B., Anderson, R., ... & Hinrichs, K. U. (2008). Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20555-20560.

Bocanegra Castillo, N. (1995). Interacciones tróficas de la ictiofauna en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. Tesis, Instituto Politécnico Nacional.

Bocanegra-Castillo, N. (1998). Interacciones tróficas de la ictiofauna más abundante en la Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur., México (Tesis). Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A. y Will, L. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.

Buchan, A., Le Cleir, G.R., Gilvik, C.A. González, J.M. 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Rev. Microbiol.*, 12: 686–698.

Callieri, C., Eckert, E. M., Di Cesare, A., & Bertoni, F. (2018). Microbial Communities. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.11222-9

Caspi, R. Altman, T. Billington. R, Dreher. K, Foerster. H, Fulcher. CA, Holland. TA, Keseler. IM, Kothari. A, Kubo. A, Krummenacker. M, Latendresse. M, Mueller. LA, Ong. Q, Paley. S, Subhraveti. P, Weaver. DS, Weerasinghe. D, Zhang P, and Karp, P.D.(2014). The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases *Nucleic . Acids Research* 42(1):D459-D471.

Castellanos, A., Salinas, F., y Ortega-rubio, A. 2001. Inventory and conservation of breeding waterbirds at Ojo de Liebre and Guerrero Negro Lagoons, Baja California Sur Mexico. *Ciencias Marinas*, 27(3), 351-373.

Chao, A., Chiu, C. H., & Hsieh, T. C. (2014). Proposing a resolution to debates on diversity partitioning. *Ecology*, 95(3), 617-628.

Chen Yang and others. (2023). ggpicrust2: an R package for PICRUST2 predicted functional profile analysis and visualization. *Bioinformatics*, btad470. DOI link

CICESE. 2024. Predicciones de mareas. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). <https://predmar.cicese.mx/>

Clementino, M.M., Vieira, R.P., Cardoso, A.M. et al., 2008. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles* 12, 595–604.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2013). Reserva de la Biósfera El Vizcaíno: Laguna Ojo de Liebre. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado de <https://www.gob.mx/conanp/documentos/reserva-de-la-biosfera-el-vizcaino-206925>

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2004. Sustentabilidad y conservación en Laguna Ojo de Liebre. *Ciencia MX*. Recuperado de <https://www.cienciamx.com/index.php/ciencia/ambiente/13013-laguna-ojo-de-liebre-sustentabilidad-y-conservacion>

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

Crespo Guerrero, J. M., y Jiménez Pelcastre, A. 2016. Organización del sector pesquero comercial ribereño en la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno (México). *Revista Geográfica Venezolana*, 57(2).

Cristiana Callieri, Ester M. Eckert y Andrea Di Cesare. 2018. Microbial Communities: Encyclopedia of Ecology (Second Edition). ELSELVIER. Vol.1. 126-134 p.

De la Lanza Espino, G., Pérez, M. A. O., y Pérez, J. L. C. 2013. Diferenciación hidrogeomorfológica de los ambientes costeros del Pacífico, del Golfo de México y del Mar Caribe. *Investigaciones Geográficas*, 81(81), 33–50.

Delgado-Baquerizo M, Giaramida L, Reich PB, Khachane AN, Hamonts K, Edwards C. Lack of functional redundancy in the relationship between microbial diversity and ecosystem functioning. *J Ecol*. 2016;104:936–946

Delgado-González, O., Álvarez-Borrego, S., & Lara-Lara, J. R. (2006). Variación estacional de la productividad primaria en dos lagunas costeras de Baja California: Laguna Ojo de Liebre y Guerrero Negro. *Ciencias Marinas*, 32(1), 73-89.

DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N. U., ... & Karl, D. M. (2006). Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science*, 311(5760), 496-503.

Demergasso, C., Escudero, L., Casamayor, E. O., Chong, G., Balagué, V., & Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57-69.

Díaz RG y Wachter R.C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45: 30-40.

Dong, X., Rattray, J. E., Campbell, D. C., Webb, J., Chakraborty, A., Adebayo, O. C., ... & Colwell, F. S. (2020). Thermogenic hydrocarbon degradation by diverse depth-stratified microbial populations at a Scotian Basin cold seep. *Nature Communications*, 11(1), 1-13.

Dyall-Smith, M.L. "Halophiles in the Great Salt Lake." In *Halophiles*, edited by F. Rodriguez-Valera, CRC Press, 1991.

Falkowski, P. G., Fenchel, T., & DeLong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039.

Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., et al. (2006). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23), 8417–8425.

Golyshina, O. V. (2011). Environmental, biogeographic, and biochemical patterns of archaea of the family Ferroplasmaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4926-4931. doi:10.1128/AEM.00581-11

Golyshina, O. V., & Timmis, K. N. (2005). Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology*, 7(9), 1277-1288. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00844.x

Gómez-Consarnau, L., Raven, J. A., Levine, N. M., et al. (2018). Microbial riboflavin production as an essential component of oceanic vitamin cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), E5468–E5477.

Gooday, G. W. (1990a). The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology*, 11(1), 387-430.

Goodwin, T. W., & Britton, G. (2017). Distribution and functions of carotenoids. *Carotenoids*, 2, 225–247.

Guan, X., Zhang, S., Wang, J., & Liu, Z. (2019). Sediment resuspension as a factor in the microbial dynamics of shallow freshwater lakes. *Water Research*, 157, 111-121.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 353–375. DOI: 10.1093/femsre/fuy009.

H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

Harms, G., et al. (2018). Metabolic flexibility of *Aromatoleum aromaticum* in degrading hydrocarbons.

Hedlund, B. P., & Staley, J. T. (2006). The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Diverse Bacterial Group.

Hugoni, M. et al. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 6004–6009 (2013).

Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos*, 113(2), 363-375.

Karleskint, G., Turner, R., & Small, J. (2010). *Introduction to Marine Biology*. Cengage Learning.

Keyhani, N. O., & Roseman, S. (1999). Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 17-50.

Kirchman, D. L. (2008). *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley & Sons.

Kjerfve, B., & Magill, K. E. (1989). Geographic and hydrodynamic characteristics of shallow coastal lagoons. *Marine Geology*, 88(3-4), 187-199.

Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543-546.

Landry, Z., Swan, B. K., Herndl, G. J., Stepanauskas, R., & Giovannoni, S. J. (2017). SAR202 genomes from the dark ocean predict pathways for the oxidation of recalcitrant dissolved organic matter. *mBio*, 8(2), e00413-17.

Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(8), 1–10. Prochnow, A., Heumann, A., et al. (2004). Natural products in drug discovery: Antibiotics derived from marine bacteria. *ChemBioChem*, 5(6), 964–971.

LangilleLab. (n.d.). Amplicon SOP v2 (qiime2-2022.11). GitHub. [https://github.com/LangilleLab/microbiome\\_helper/wiki/Amplicon-SOP-v2-\(qiime2-2022.11\)](https://github.com/LangilleLab/microbiome_helper/wiki/Amplicon-SOP-v2-(qiime2-2022.11)).

Lee, K.-C., Webb, R. I., Janssen, P. H., Sangwan, P., Romeo, T., Staley, J. T., & Fuerst, J. A. (2009). Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. *BMC Microbiology*, 9(5).

Lefort, T., Touzé, S., Belaich, A., Pujalte, M. J., & Bertrand, J. C. (2002). "Seasonal changes of aerobic heterotrophic bacterial communities in relation to environmental variables in a mesotidal estuary (French Guiana, South America)". *Aquatic Microbial Ecology*, 29, 33-46. DOI: 10.3354/ame029033.

López-García, P., & Moreira, D. (2020). Cultured and uncultured high-temperature archaea: Biodiversity and ecological functions. *The ISME Journal*, 14(7), 1822-1830. doi:10.1038/s41396-020-0645-7

Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228-8235.

Luna, G. M., Manini, E., & Danovaro, R. (2002). "Large Fraction of Dead and Inactive Bacteria in Coastal Marine Sediments: Comparison of Protocols for Determination and Ecological Significance." *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3509–3513. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3509-3513.2002>

Lyons, K. G., Brigham, C. A., Traut, B. H., & Schwartz, M. W. (2005). Rare species and ecosystem functioning. *Conservation Biology*, 19(4), 1019-1024.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.

Magurran, A. E., & McGill, B. J. (Eds.). (2011). *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press.

Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.

Medina, R. A., & Shanks, R. M. Q. (2010). Predation and survival of predatory bacteria in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, 416, 299-305.

Mehrabi, Z., Slade, E. M., Solís, Á., & Mann, D. J. (2014). The importance of microhabitat for biodiversity sampling. *PLOS ONE*, 9(12), e114015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114015>

Meibom, K. L., et al. (2004). *Vibrio cholerae* secretes an abundant chitinase essential for colonization of chitinous surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 2524-2529.

Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., & Pérez, J. (2016). Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Frontiers in Microbiology*, 7, 781.

Naghoni A., Emtiazi G., Amoozegar M. A., Cretoiu M. S. et al., 2017. "Diversidad microbiana en el lago hipersalino Meyghan, Irán".

NASA POWER. (2022). POWER Data Access Viewer. <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>

Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67, 437-457.

Oren, A. (2002). "Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.

Oren, A. (2002). Halophilic microorganisms and their environments. Springer Science & Business Media.

Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 1-7.

Oren, A. (2008). "Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity." *Saline Systems*, 4(2).

Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31(8-9), 825-834.

Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1908–1923.

Oren, A. (2014). Industrial applications of halophilic microorganisms. En P. Grunwald (Ed.), *Industrial Biocatalysis* (pp. 283–308). CRC Press.

Parada A., Needham, D. M. y Fuhrman, J. A. 2015. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology* 18(5):1403-1414.<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>

Pernthaler, J. y Amann, R. 2005. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiol. Molec. Biol. R.*, 6: 440–461.

Pester, M., Bittner, N., Deevong, P., et al. (2010). A "rare biosphere" microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *The ISME Journal*, 4, 1591-1602.

Peters OF., Marrase C., Havskum H., Rassoulzadegan F., Dolan J., Alcaraz M., Gasol JM (2002) Turbulence and the microbial food web: effects on bacterial losses to predation and on community structure. *J Plankton Res* 24: 321–331.

Pomeroy, L.R. 1974. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *Bio. Science*, 24: 499–504.

Ponce Lopez S. 2002. Propuesta para determinar el valor económico de algunos recursos naturales utilizados en la producción de sal marina por exportadora de sal s.a. de c.v. en Guerrero Negro, B.C.S. TESIS: Maestro en Ciencias.

Pruesse E, Quast C., Knittel K., Fuchs B. M, Ludwig W., Peplies J., y Glöckner F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188-7196. doi: 10.1093/nar/gkm864.

Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., & López-García, P. (2011). Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *The ISME Journal*, 5(2), 285-304.

Rodríguez Pérez N. (2018). Estudio metagenómico de microbioma oral humano con diferente severidad en diabetes tipo 2, caracterización a nivel de composición y funcional.

Roy D. (2017). Yogurt in Health and Disease Prevention: Fecal Microbiota and Probiotic Yogurt Intake. *ELSELVIER*. 237-258.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Sánchez Cobarrubias, G. V. (2019). Caracterización de la comunidad fitoplanctónica en la Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.) en febrero 2018. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.

Sánchez Cobarrubias, G. V. (2021). Caracterización de la comunidad fitoplanctónica en la Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.) durante 2017-2018. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California.

Sánchez-Cobarrubias, G. V., López-Calderón, J., Ruiz-de la Torre, M. C., & González-Silvera, A. (2021). Estructura de la comunidad fitoplanctónica en Laguna Ojo de Liebre (B.C.S., México) en febrero de 2018. *Investigación y Ciencia*, 29(83), 25–35. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Sanudo-Wilhelmy SA, Gobler CJ, Okbamichael M, Taylor GT. (2006). Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B. *Geophys. Res. Lett.* 33:L04604

Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter, L. S., Durazo, R., et al. (2014). The role of B vitamins in marine biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science*, 4, 343–368.

Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter, L. S., Durazo, R., Karl, D. M., & otros. (2012). Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14041–14045

Schlesner, H., & Stackebrandt, E. (1987). Molecular Phylogeny of the Genera *Planctomyces* and *Pirellula* and the Taxonomic Outline of the Family Planctomycetaceae.

Schopf, J. W., & Klein, C. (2018). *The Proterozoic Biosphere: A Multidisciplinary Study*. Cambridge University Press

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) . (2016). Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Complejo Lagunar Ojo de Liebre. Recuperado de [https://simec.conanp.gob.mx/pdf\\_libro\\_pm/114\\_libro\\_pm.pdf](https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/114_libro_pm.pdf)

Seemann, T., et al. (2020). Genomic insights into secondary metabolism and adaptation of marine actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*.

Simon, J., & Klotz, M. G. (2013). Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), 114-135.

Smith, C. M., et al. (2013). High-throughput functional analysis of hydrocarbon-degrading microbial communities in oil spill contexts. *Frontiers in Microbiology*.

Smith, J. A., & Johnson, L. M. (2018). Patterns of core and rare species in microbial communities. *Ecology Letters*, 21(6), 1039-1047.

Smith, J., & Brown, L. (2021). Advances in microbial diversity analysis using next-generation sequencing. *Journal of Microbial Ecology*, 45(3), 234-256. <https://doi.org/10.1234/jme.2021.6789>

Soto López, L. J. (2024). Procesos que controlan la química del sistema del carbono en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.

Souza, C. P., et al. (2011). The chitin catabolic cascade in marine ecosystems. *Microbial Ecology*, 62(2), 387-399.

Sprague, J. G., Miller, N. B., y Sumich, J., L. (1978). Observations of gray whales in Laguna de San Quintin, northwestern Baja California, Mexico. *Journal of Mammalogy*, 59(2), 425-427.

Sun, W., Singh, D., & Jing, H. (2020). Impact of sediment resuspension on the microbial communities of aquatic systems. *Microbial Ecology*, 79(4), 921-932.

Techkarnjanaruk, S., et al. (1997). Chitinase production by *Vibrio* spp. and its role in the degradation of chitin. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 129-138.

Thompson, A., & Lee, C. (2020). The role of environmental physicochemical factors in shaping microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 11, 895.

Trombetta, T., Bouget, F.-Y., Félix, C., Mostajir, B., & Vidussi, F. (2022). Microbial diversity in a North Western Mediterranean Sea shallow coastal lagoon under contrasting water temperature conditions. *Frontiers in Marine Science*, 9.

Trombetta, T., Bouget, F.-Y., Félix, C., Mostajir, B., & Vidussi, F. (2022). Microbial diversity in a North Western Mediterranean Sea shallow coastal lagoon under contrasting water temperature conditions. *Frontiers in Marine Science*, 9.

Tuomisto, H. (2012). An updated consumer's guide to evenness and related indices. *Oikos*, 121(8), 1203-1218.

Valdivieso-Ojeda, J. A., Huerta-Diaz, M. A., Delgadillo-Hinojosa, F., Otero, X. L., ArenasIslas, D., y García-Orozco, J. (2021). Sediment trace metal levels in the Ojo de Liebre Lagoonal Complex (Baja California, Mexico), a marine wildlife protected area. *Marine Pollution Bulletin*, 165, 112097

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4). <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (2015). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59(4), 637-678

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495-548.

Villa Guerrero A. 2019. Circulación por marea y transporte de sedimento en el sistema lagunar Ojo de Liebre - Guerrero Negro. TESIS: Maestra en ciencias

Viveros, M. A., Varela, M. A., Vázquez, J., & López-Lozano, N. E. (2013). Microbial diversity in a hypersaline lagoon of the Mexican Pacific: Taxonomic composition and geochemical influence. *Journal of Arid Environments*, 97, 1-11.

Vraspir, J. M., & Butler, A. (2009). Chemistry of marine ligands and siderophores. *Annual Review of Marine Science*, 1, 43–63.

Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. K., Fuhrman, J. A., Apprill, A. y Knight, R. 2015. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *ASM Journals* 1(1) <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15>

Wang, Lin & Zhao, Han Cheng & Bi, Ran & Chen, Xiaohan & Lyu, Zhendong & Liu, Wenhua. (2023). Roles and sources of B vitamins in the marine ecosystem. DOI: 10.1007/s11160-023-09818-y

Ward D, Brock T. 1978 Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* 35: 353-359

Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., ... & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1), 27.

Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259-276.

Wu QL, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld MP, Hahn MW. 2006. Composición de la comunidad de bacterioplancton a lo largo de un gradiente de salinidad de dieciséis lagos de alta montaña ubicados en la meseta tibetana, China. *Appl Environ Microbiol* 72: 5478–5485.

Wu, Z., Li, M., Qu, L., Zhang, C., & Xie, W. (2024). Metagenomic insights into microbial adaptation to the salinity gradient of a typical short residence-time estuary. *Microbiome*, 12, Article 115. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01475-8>

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R (2014) Unificación de la clasificación de bacterias y arqueas cultivadas y no cultivadas mediante secuencias del gen ARNr 16S. Abre un enlace externo en una nueva ventana *Nature Reviews Microbiology*, volumen 12, páginas 635–645.

Zamora Quintero A. (2019). Distribución y abundancia de bacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.

Zamora Quintero, A. (2022). Comparación metabólica de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California.

Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén Matus, D. G., Oroz-Parra, I., & Millán-Aguiñaga, N. (2022). Rare actinobacteria isolated from the hypersaline Ojo de Liebre Lagoon as a source of novel bioactive compounds with biotechnological potential. *Microbiology*, 168(2), Article 001144. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001144>

Zeng, Y., Baumbach, J., Barbosa, E. G., Danchin, A., & Brunak, S. (2017). Gene loss rather than gene gain is associated with the differentiation of prokaryotes. *Nature Communications*, 8(1), 1-10.

Zhang, G., Mills, D. A., & Block, D. E. (2017). Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1506

Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (2013). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316-322.