



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Análisis comparativo del microbioma epífito de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

EVERLY NEVAREZ FLORES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, ENERO 2024

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

Análisis comparativo del microbioma epífito de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales.

T E S I S

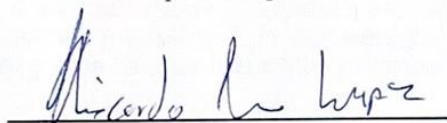
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

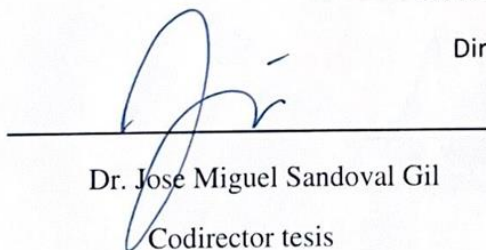
EVERLY NEVAREZ FLORES

Aprobada por:

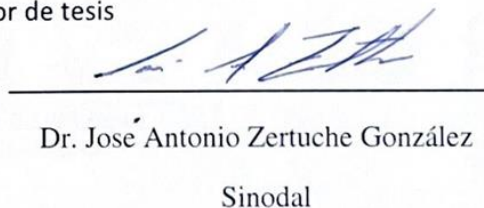


Dr. Ricardo Cruz López

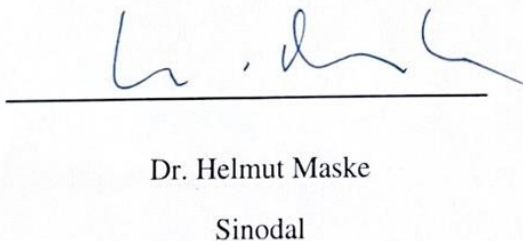
Director de tesis



Dr. Jose Miguel Sandoval Gil
Codirector tesis



Dr. José Antonio Zertuche González
Sinodal



Dr. Helmut Maske
Sinodal

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría**

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Ivone Giffard Mena

Me dirijo a usted en mi calidad de **Director de tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Everly Nevarez Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

"Análisis comparativo del microbioma epífita de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales".

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 9 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. Ricardo Cruz López
Director de tesis

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Ivone Giffard Mena

Me dirijo a usted en mi calidad de **Co-director de tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Everly Nevarez Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

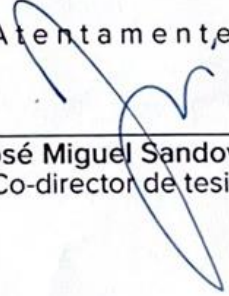
"Análisis comparativo del microbioma epífito de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales".

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 9 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. José Miguel Sandoval Gil
Co-director de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Ivone Giffard Mena

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Everly Nevarez Flores como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto **Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

"Análisis comparativo del microbioma epífito de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales".

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 9 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. Jose Antonio Zertuche González
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Ivone Giffard Mena

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Everly Nevarez Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

"Análisis comparativo del microbioma epífito de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales".

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 9 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. Helmut Maske
Sinodal

c.c.p. Expediente

Análisis comparativo del microbioma epífita de la macroalga *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo y naturales.

Resumen.

En los últimos años se ha prestado especial atención a la interacción del complejo macroalgas y bacterias, i.e. holobionte. En esta interacción puede haber relaciones de simbiosis ya que las bacterias aportan nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo de las algas, y estas últimas proporcionan un entorno propicio y compuestos orgánicos de carbono a las comunidades bacterianas. La naturaleza de esta relación puede variar según diversos factores como la especie de alga involucrada, la composición y abundancia bacteriana, o las condiciones físico-químicas del entorno. En este contexto, *Ulva* sp., un género de macroalgas verdes de interés ecológico y comercial, ha sido objeto de estudio debido a su relevante interacción alga-bacteria en su desarrollo y productividad. A pesar de esto, la comprensión de la diversidad de grupos bacterianos asociados con *Ulva* sp. sigue siendo limitada. Esta tesis se centró en analizar el microbioma epífita de *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo de pozas piloto comerciales en tierra. Los objetivos principales fueron: i) investigar si la comunidad microbiana epífita en *U. ohnoi* experimenta cambios durante un ciclo de cultivo de cuatro semanas, y ii) comparar esta comunidad bacteriana con la presente en *U. ohnoi* en su entorno silvestre. Para la consecución de estos objetivos se desarrollaron nuevas metodologías para el aislamiento y el análisis de la biopelícula bacteriana epífita, que permitieron cuantificar la abundancia total de bacterias y diferenciar distintos morfotipos bacterianos. Además, se realizó una secuenciación masiva del gen 16S rRNA para examinar la taxonomía de la comunidad bacteriana en las muestras de *U. ohnoi* cultivada y silvestre. Los resultados revelaron que *U. ohnoi* cultivada presenta una mayor diversidad de fenotipos bacterianos con una distribución aleatoria, y la estructura bacteriana experimenta cambios a medida que avanzaba el ciclo de cultivo. En *U. ohnoi* silvestre, donde se esperaba encontrar una mayor abundancia de grupos bacterianos, se observó la situación opuesta. También se encontraron marcadas diferencias en la composición y abundancia de grupos bacterianos. En el caso de *U. ohnoi* cultivada, se observó una predominancia significativa

del grupo taxonómico Gamma-proteobacteria, mientras que en *U. ohnoi* silvestre, los grupos más representativos fueron Firmicutes y Bacteroidetes, aunque se registró una diversidad bacteriana generalmente menor. Ambos tipos de *Ulva* mostraron una riqueza destacada de Variantes de Secuencias de Amplicones (ASVs).

Palabras clave: *Ulva ohnoi*, abundancia, microscopía, bacterias epífitas, metagenómica.

Abstract

In recent years, special attention has been paid to the interaction of the macroalgae-bacteria complex (i.e., holobiont). It is recognized that this symbiosis can be mutually beneficial; while the bacteria provide essential nutrients for optimal algal growth, the algae provide a conducive environment and organic carbon compounds to the bacterial communities. The nature of this relationship may vary according to various factors such as the algal species involved, bacterial composition and abundance, or the physicochemical conditions of the environment. In this context, *Ulva* sp., a genus of green macroalgae of ecological and commercial interest, has been the subject of study due to its relevant algae-bacteria interaction in its development and productivity. Despite this, the understanding of the diversity of bacterial groups associated with *Ulva* sp. remains limited. This thesis focused on analyzing the epiphytic microbiome of *Ulva ohnoi* under culture conditions, specifically in pilot ponds on land. The main objectives were: i) to investigate whether the epiphytic microbial community in *Ulva ohnoi* undergoes changes during a four-week culture cycle, and ii) to compare this bacterial community with that present in *Ulva ohnoi* in the wild. To achieve these objectives, new methodologies for the isolation and analysis of epiphytic bacterial biofilm were developed to quantify the total bacterial abundance and differentiate different bacterial morphotypes. In addition, massive 16S rRNA gene sequencing was performed to examine the taxonomy of the bacterial community in cultured *Ulva* and wild *Ulva* samples. The results revealed that, in the case of cultured *Ulva*, there was a greater diversity of bacterial phenotypes with a random distribution, and the bacterial structure underwent changes as the culture cycle

progressed. In wild *Ulva*, where a higher abundance of bacterial groups was expected to be found, the opposite situation was observed. Marked differences were also found in the composition and abundance of bacterial groups. In the case of cultivated *Ulva*, a significant predominance of the taxonomic group Gamma-proteobacteria was observed, while in wild *Ulva*, the most representative groups were Firmicutes and Bacteroidetes, although a generally lower bacterial diversity was recorded. Both *Ulva* types showed an outstanding richness of Amplicon Sequence Variants (ASVs).

Dedicatoria.

“Cuando llegue la inspiración, que me encuentre trabajando”

Pablo Picasso.

Para mí misma.

Agradecimientos.

Quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Ricardo y Co director Dr. Jose por darme la oportunidad de ser parte del equipo de botánica marina. Gracias por su apoyo, para llevar a cabo este bonito proyecto. Gracias porque siempre estuvieron al pendiente, gracias por sus enseñanzas, pero sobre todo muchas gracias por su paciencia y confianza que me tuvieron a lo largo de estos dos años de maestría.

También quiero agradecer al Doctor Zertuche por ser parte de este proyecto y brindar el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

Un gran agradecimiento al Dr. Helmut Maske por permitirme usar su equipo de laboratorio y ser parte del comité. También un agradecimiento al Dr. Carlos de la facultad de ciencias por tomarse el tiempo en ayudarnos con la cuantificación de ADN. Ale y Laura por enseñarme y ayudarme siempre con las técnicas y manejo del equipo de laboratorio de botánica marina.

Gracias a mis compañeras de posgrado por compartirme sus conocimientos y experiencias en este mundo de la ciencia, pero sobre todo Iliana por ser tan amable y ayudarme siempre que lo necesitaba con el análisis bioinformático. Muchas gracias y gracias a todos mis maestros que me dieron clases durante el posgrado.

Gracias a la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitirme continuar con mis estudios de maestría.

Muchísimas gracias a CONAHCYT por el apoyo económico brindado durante estos dos años de maestría.

Muchas gracias a la empresa PROMAC-BLUE EVOLUTION por financiar este proyecto.

Gracias por todo.

CONTENIDO

Resumen	ix
Abstract	x
Dedicatoria	xii
Agradecimientos	xiii
Lista de figuras	xvi
Lista de tablas	xvi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo general.....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
capítulo 2. Metodología	4
2.1 Evaluación de los diferentes grupos bacterianos epífitos de <i>Ulva ohnoi</i> durante un ciclo de cultivo en pozas piloto comerciales y en ambiente natural.....	4
2.1.1 Cultivo de <i>U. ohnoi</i> : Unidad acuícola Piloto Comercial (UAPC)	4
2.1.2 Colecta de <i>U. ohnoi</i> silvestre (Bahía de San Quintín)	4
2.1.3 Descripción de las pozas piloto.....	4
2.1.4 Variables fisicoquímicas del agua de cultivo	5
2.1.5 N total y carbohidratos solubles	6
2.1.6 Filtraciones secuenciales.....	6
2.1.7 Microscopía de epifluorescencia.....	7
2.1.8 Extracción y cuantificación de ADN	10
2.2 Análisis del microbioma por secuenciación masiva del gen 16S rRNA.....	11
2.3 Análisis estadísticos.....	12
Capítulo 3. Resultados	13
3.1 Evaluación de los muestreos físico- químicos de <i>Ulva ohnoi</i> durante su cultivo en pozas piloto comerciales.....	13
3.2 Evaluación de los muestreos biológicos en el cultivo de <i>Ulva ohnoi</i> en pozas piloto comerciales.....	16
3.3 Detección de bacterias epífitas asociada con <i>Ulva ohnoi</i> (cultivada y silvestre)	16

3.4 Abundancia relativa de la comunidad bacteriana epífita asociada con <i>Ulva ohnoi</i> (cultivada y silvestre).....	20
3.5 Evaluación de la abundancia bacteriana asociada con la macroalga <i>Ulva ohnoi</i> (cultivada y silvestre).....	23
3.6 Evaluación de la composición taxonómica bacteriana epífita de <i>U. ohnoi</i> (cultivada vs silvestre) por medio de secuenciación masiva del gen 16S RNA.....	25
Capítulo 4. Discusión.....	29
4.1 Efecto del sistema de cultivo en la estructura y función del microbioma epífito de <i>Ulva ohnoi</i>	29
4.2 Análisis comparativo de la comunidad bacteriana epífita en <i>Ulva ohnoi</i> cultivada y silvestre.....	30
Capítulo 5. Conclusiones.....	34
5.1 Nuevas líneas de investigación	35
Literatura citada.	36
ANEXOS.....	43
Anexo 1. Curva de rarefacción	43

Lista de figuras

Figura 1- Esquema del diseño experimental	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2- Descripción del tratamiento experimental de las filtraciones para las muestras del biofilm <i>Ulva Ohnoi</i> (cultivada y silvestre)	7
Figura 3-Tratamiento de las muestras para la reducción de la autofluorescencia (clorofila)	8
Figura 4- Representación esquemática de captura de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5- Extracción de ADN	11
Figura 6- Parámetros fisicoquímicos medidos en las pozas piloto.....	14
Figura 7- Concentración de nutrientes en el agua de más de las pozas.....	15
Figura 8- Variación del análisis proximal (carbohidratos solubles, nitrógeno y proteínas).....	16
Figura 9 -Morfotipos bacterianos identificados por medio de microscopía de epifluorescencia (S1-S2)	17
Figura 10- Morfotipos bacterianos identificados por medio de microscopía de epifluorescencia (S3-S4)	18
Figura 11- Microscopía de epifluorescencia (SQ).....	19
Figura 12- Abundancia relativa (%) bacterias asociadas a <i>U. ohnoi</i> cultivada durante la semana (S1-S4).....	21
Figura 13- Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa (%) de dos tipos de bacterias asociadas a la biopelícula de <i>U. ohnoi</i> silvestre.....	22
Figura 14- Abundancia relativa en distintos ambientes.....	23
Figura 15- Abundancia bacteriana total.....	25
Figura 16- Gráfico de barra a nivel fila	26
Figura 17- Gráfico de barra a nivel clase.....	27
Figura 18- Gráfico de barra a nivel orden.....	28

Lista de tablas.

Tabla 1. Análisis de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Basándonos en los datos obtenidos de la abundancia bacteriana por ambiente.....	23
Tabla 2. Diversidad bacteriana asociada a la biopelícula de <i>Ulva</i> mediante secuenciación del gen 16S rRNA en estudios previos.....	32

Capítulo 1. Introducción

Existe un creciente interés en la relación entre macroalgas y microorganismos asociados (i.e. complejo holobionte), dada el crucial papel de éstos últimos en el metabolismo y crecimiento de los macrófitos. En particular, esta interacción es esencial en el desarrollo y la supervivencia de algas del género *Ulva* (van der Loos et al., 2022; Kessler et al., 2018). La liberación de metabolitos por parte de estas bacterias puede estimular el crecimiento y desarrollo de *Ulva* (Egan et al., 2013; Weinberger et al., 2007). Esta compleja interacción alga-bacteria puede variar a lo largo del ciclo de vida de *Ulva* sp. y como resultado de cambios en factores ambientales (van der Loos et al., 2022; Pita et al., 2018). Por ejemplo, Van der Loos et al. (2022) documentaron que la variabilidad de las bacterias asociadas a *Ulva* sp. se ve influenciada por múltiples factores ambientales, incluyendo las estaciones del año, la disponibilidad de nutrientes, la irradiancia, el pH, la temperatura, así como las mareas y corrientes. Estos hallazgos enfatizan la importancia de las bacterias en la adaptación de *Ulva* sp. a los cambios en su entorno. Otros trabajos reportan casos similares para otras especies (p.e., *Ectocarpus subulatus*; Dittami et al. 2016). La relación simbiótica de *Ulva* con su microbioma es compleja, e involucra procesos como la producción de metabolitos, como la talusina, que estimulan la división celular y la diferenciación de su talo, incluyendo la formación de rizoides y el desarrollo de las paredes celulares (Alsufyani et al., 2020). Además, *Ulva* sp. es capaz de atraer bacterias promotoras del crecimiento mediante la liberación de quimioatrayentes como el dimetilsulfoniopropionato (DMSP), y son varios los autores que destacan la importancia de la función y diversidad de los grupos bacterianos asociados a la macroalga (Gharderiardakani et al., 2022; Alsufyani et al., 2017).

La variabilidad en el microbioma asociado a *Ulva* sp. a lo largo del ciclo de vida y en respuesta a factores ambientales a diferentes escalas temporales y espaciales ha sido documentada en estudios previos. Egan et al., (2013) reportaron que los cambios ambientales pueden alterar las comunidades microbianas y alterar la relación simbiótica a parasitaria o mutualista. Diferentes autores han sugerido que la composición y estructura del microbioma asociado a *Ulva* sp. es el resultado de procesos estocásticos,

incluyendo la colonización aleatoria de bacterias, y las variaciones en las condiciones ambientales y geográficas (van der Loos et al., 2022; Adair & Douglas, 2017). Por ejemplo, el estudio realizado por Gharderiardakani et al. (2020) con *Ulva australis* resalta la importancia crítica de la asociación con bacterias específicas y los metabolitos que estas bacterias generan. Sus hallazgos revelaron que, en condiciones libres de bacterias (axénicas) o en ausencia de un microbioma adecuado, *U. australis* pierde su morfología típica. El denominado "microbioma central" se refiere a la comunidad de bacterias estables que desempeñan un papel esencial en el funcionamiento general de *Ulva* sp. y otras especies (van der Loos et al., 2022; Bonthond et al., 2020). Estas bacterias no solo son clave para el crecimiento y la diferenciación celular de, sino que también condicionan su capacidad de adaptación y resistencia frente a perturbaciones ambientales (van der Loos et al., 2022; Shade & Handelsman, 2012).

La interdependencia entre *Ulva* sp. y sus bacterias asociadas ha sido examinada mediante análisis metagenómicos. Estos análisis han permitido identificar los grupos bacterianos esenciales para el crecimiento, la diferenciación celular y la morfogénesis (Alsufyani et al., 2020; Wichard, 2015; Egan et al., 2013; Goeck et al., 2010). Sin embargo, la información es aún escasa respecto de *U. ohnoi* y su microbioma asociado en condiciones de cultivo.

En el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030, el cultivo de macroalgas se considera en la actualidad una actividad acuícola con papel crítico a nivel mundial en la seguridad alimentaria, en la mitigación del cambio climático, en la creación de empleos y en el crecimiento de la economía. El estudio realizado por Moreira et al. (2021) subraya este papel, al reportar el aumento en la productividad y la diversificación comercial en esta área, destacando su creciente importancia en el escenario actual

En la región de Baja California, México, el aprovechamiento y la explotación de macroalgas no solo tienen un gran potencial económico, sino que también desempeñan un papel clave en la diversificación de las actividades acuícolas locales. Vázquez-Delfín et al. (2019), sugieren que el cultivo de macroalgas mediante técnicas de acuicultura

sostenible puede garantizar una producción constante de alta calidad a largo plazo. El cultivo de *Ulva ohnoi* en pozas piloto comerciales se lleva realizando con éxito desde hace años en la Universidad Autónoma de Baja California (Revilla-Lovano et al., 2021). Sin embargo, este tipo de cultivo aún enfrenta importantes retos, como el conseguir incrementar la productividad del alga y la calidad en su contenido nutricional. Para la consecución de estos objetivos, se necesita evaluar la fisiología del alga en sus condiciones de cultivo, así como las interacciones con su microbioma epífita. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo principal el caracterizar el microbioma epífita asociado a *U. ohnoi* en cultivo. Se examinaron los cambios en el microbioma a lo largo de un ciclo de cultivo (1 mes), y se comparó dicho microbioma con el de muestras de *U. ohnoi* silvestre colectadas en la laguna costera de San Quintín.

1.1 Hipótesis.

- La composición del microbioma epífita de *Ulva ohnoi* cambiará durante un ciclo de cultivo, debido a cambios drásticos en la densidad del alga y en factores físico-químicos asociados (p.e., luz, pH).
- Habrá diferencias en la composición del microbioma epífita de *Ulva* cultivada vs *Ulva* silvestre.

1.2 Objetivo general.

- Caracterizar el microbioma epífita de *Ulva ohnoi* en condiciones de cultivo en pozas piloto comerciales.

1.3 Objetivos específicos.

- 1) examinar si hay cambios en la composición/estructura del microbioma epífita durante un ciclo de cultivo (1 mes).
- 2) comparar la composición/estructura del microbioma epífita de *Ulva ohnoi* cultivada con muestras silvestres.

2.1 Evaluación de los diferentes grupos bacterianos epífitos de *Ulva ohnoi* durante un ciclo de cultivo en pozas piloto comerciales y en ambiente natural.

2.1.1 Cultivo de *U. ohnoi*: Unidad acuícola Piloto Comercial (UAPC)

El estudio se llevó a cabo en noviembre de 2021, durante un ciclo de cultivo de *Ulva ohnoi* de cuatro semanas. El sistema de cultivo UAPC (Unidad Acuícola Piloto Comercial) se encuentra en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). El sistema de cultivo usado es el conocido como “cultivo por volteo” (Zertuche-González 1987; Vandermeulen 1989; Revilla-Lovano et al., 2021), y funciona a partir de un sistema de aireación desde el fondo con cuatro aireadores trifásicos (220 V) que hacen llegar el aire a un tubo PVC de 4” perforado y colocado de forma longitudinal en el fondo de cada poza. Esto genera un movimiento convectivo que permite que las algas estén en constante movimiento entre el fondo y la superficie con el fin de aprovechar la mayor cantidad de luz posible.

2.1.2 Colecta de *U. ohnoi* silvestre (Bahía de San Quintín)

Se recolectó biomasa de *Ulva ohnoi* en la Bahía de San Quintín (30°25' N, 115°58' O), situada a 200 km al sureste de la ciudad de Ensenada, Baja California. Se caracteriza por exhibir una variación de temperatura en el mar que abarca desde 11°C hasta 27°C, así como un rango de pH que oscila entre 7.71 y 8.07. Las concentraciones de nitrato generalmente están por debajo de 1 µM en las zonas más internas de la laguna (Álvarez-Borrego y Álvarez-Borrego 1982; Cabello-Pasini et al., 2003).

2.1.3 Descripción de las pozas piloto

El sistema de cultivo está diseñado con estanques rectangulares de tierra compactada, forrados con policloruro de vinilo plastificado (PVC-P) de color blanco y paredes con un ángulo hacia el interior, lo cual ayuda la dispersión de la luz incidente. Los estanques de cultivo tienen las dimensiones de: 4 m de ancho, 10 m de largo y 1 m de profundidad, abarcan un área de 40 m² y cuentan con una capacidad de 40 m³. La circulación de agua de los estanques es del tipo semi-cerrada, ya que se llevan a cabo recambios del agua

(80% del volumen). Con una siembra inicial de 1 kg m^{-3} de peso fresco (PF) de *U. ohnoi*, que se incrementó a 8 kg m^{-3} (PF) al término del cultivo. se llevaron a cabo fertilizaciones dos veces por semana (F, Figura 1) con una concentración de Nitrógeno y Fosforo ($250:25 \text{ } \mu\text{M}$) seguidas por recambios (R, Figura. 1) de agua al 80%. Durante el cultivo (4 semanas), los muestreos biológicos se llevaron a cabo únicamente durante los días de fertilización (lunes y jueves). Se recolectaron muestras de biomasa de *U. ohnoi* (F, Figura 1). Las muestras fueron recolectadas en bolsas ziploc, (N=3) por poza (P1 y P2), un total de n=6 muestras. Estas muestras se utilizaron para llevar a cabo análisis fisiológicos y para evaluar el microbioma asociado en *U. ohnoi* a lo largo del estudio.

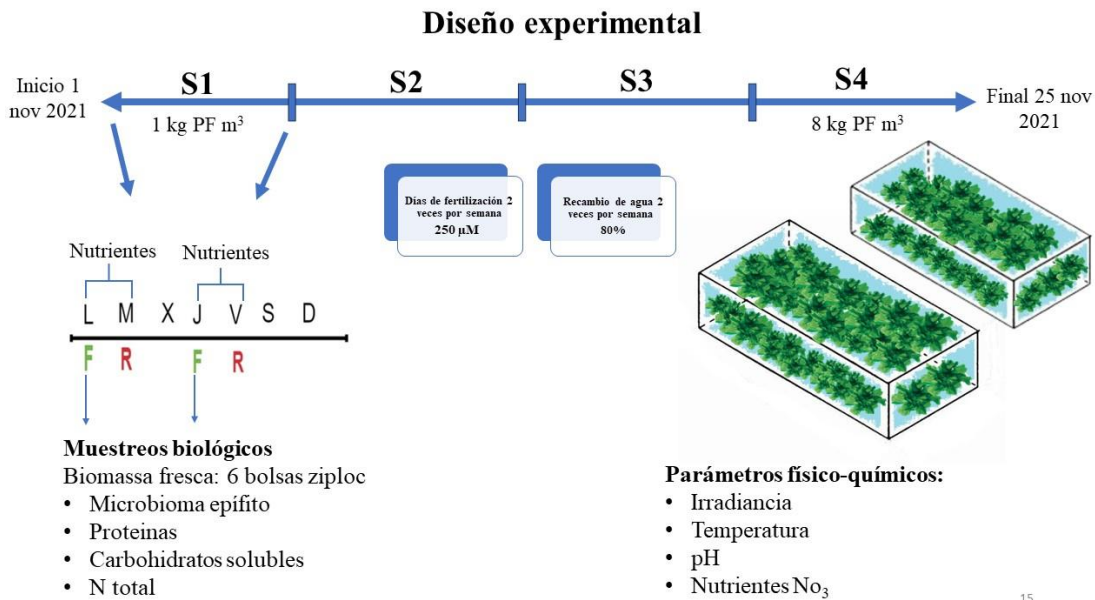


Figura 1. Esquema del diseño experimental llevado a cabo durante un ciclo de cultivo (4 semanas) con una siembra inicial de 1 kg m^{-3} peso fresco (PF) de *Ulva ohnoi* y dos días de fertilización (F: L, J) y dos días de recambio al 80% (R: M, V).

2.1.4 Variables fisicoquímicas del agua de cultivo

Se realizaron mediciones continuas de Irradiancia (I), temperatura y pH. La irradiancia y temperatura se midieron con un sensor HOBO (Pendant® MX Water Temperature Data Logger) colocados a 50 cm de profundidad. El pH fue medido con un potenciómetro (HOBO pH and Temperature Data Logger) colocado a 30 cm de la superficie. Los análisis

de concentración de nitrato en el agua de las pozas se llevaron a cabo cuatro días por semana (F y R, Figura 1) coincidiendo con los días de fertilización (lunes y jueves) y los días de recambio al 80% (martes y viernes). Durante los días de fertilización se recolectaron por triplicado (n=3) muestras de nitratos del agua de las pozas (P1 y P2) en tres momentos diferentes del día: antes, durante y en el transcurso de la tarde (16 hrs) y para los días de recambio se colectaron (n=3) muestras una vez al día. Las muestras se colectaron en tubos Falcon de 50 ml sin previa filtración

La concentración de nitratos (NO_3^-) en agua de mar se midió utilizando un sensor SUNA (V2 Nítrate Sensor).

2.1.5 N total y carbohidratos solubles

Las muestras colectadas de *Ulva ohnoi* fueron lavadas con agua de destilada y secadas a 60°C durante 24 h. Posteriormente, las muestras se molieron y se usó el método microkjendahl (Horwitz 1990) para el análisis del contenido de nitrógeno total (% PS), obteniéndose el porcentaje de concentración de proteína al multiplicar por el factor diluyente 5.

Para el análisis de carbohidratos solubles (% PS) se utilizó el protocolo modificado de Hernández-Garibay et al. (2010). Se realizó una hidrólisis en muestras de tejido seco pulverizado en baño maría durante 3 h a 60 °C, en 2 mL de HCl 0.2 N. El contenido de carbohidratos solubles (% PS) de la muestra hidrolizada en ácido se cuantificó espectrofotométricamente por el método colorimétrico del fenol sulfúrico (Dubois et al. 1956).

2.1.6 Filtraciones secuenciales.

Se recolectaron dos tipos de muestras en bolsas ziploc, *U. ohnoi* cultivada y silvestre. Se usó una solución de N-Acetil-L-Cisteína (Sigma-Aldrich, Inc.) para la remoción de bacterias epífitas (1 ml) (Figura 2). La función de la N-Acetil-L-Cisteína es disolver la mucosa que envuelve a las bacterias en la biopelícula. Las muestras fueron incubadas (1h) con esta solución en un matraz de 250 ml con agua de mar estéril (Figura 2).

Después, la solución fue filtrada con filtros de membrana de policarbonato (1.0- 0.2 μm). Al finalizar las filtraciones, los filtros fueron colocados en recuadros de papel aluminio esterilizados previamente. Las muestras se conservaron en congelación (-20°C) hasta realizarse la extracción de ADN.

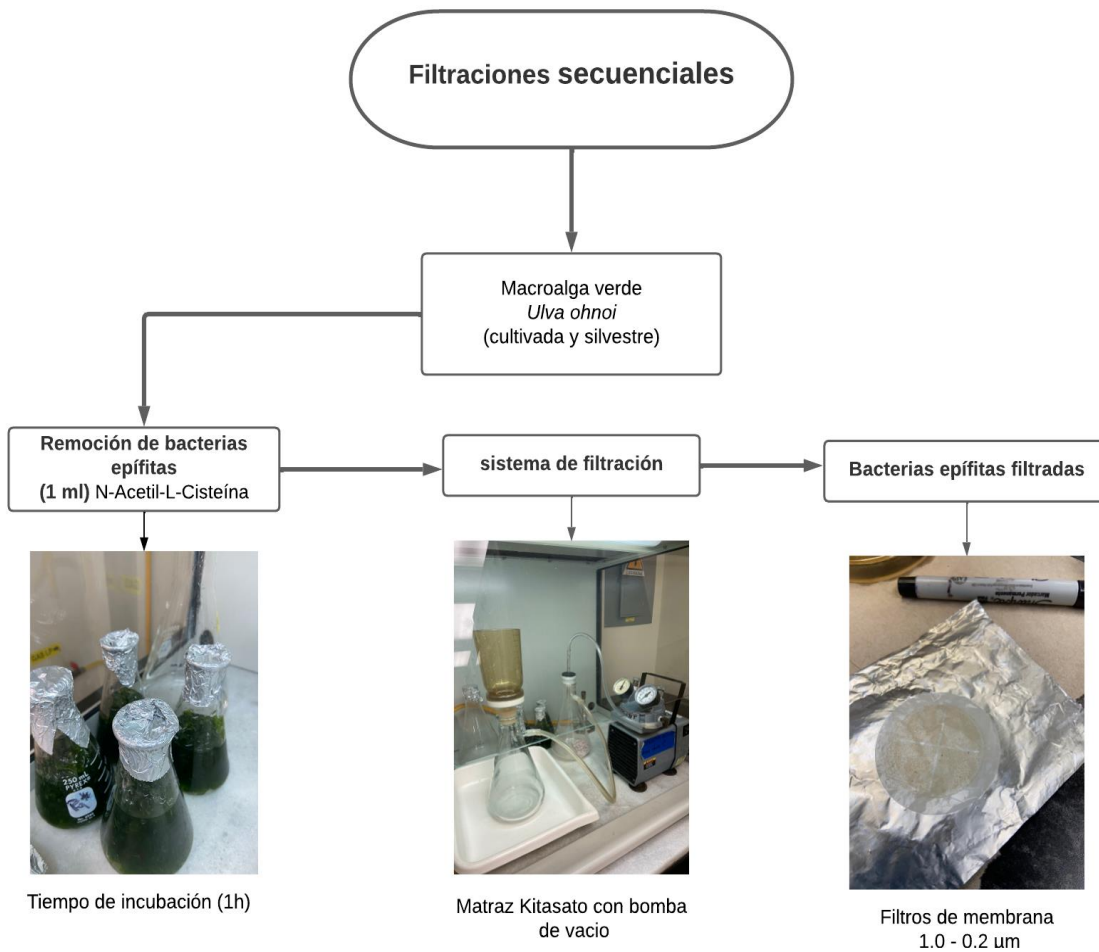


Figura 2. Metodología para extracción de bacterias de biopelícula de *Ulva ohnoi* (silvestre y cultivada). mediante el uso del tratamiento con solución de N-Acetil-L-Cisteína.

2.1.7 Microscopía de epifluorescencia.

Para la cuantificación de bacterias epífitas por epifluorescencia se recolectó tejido de *U. ohnoi* cultivada en las pozas piloto comerciales y *U. ohnoi* silvestre de la Bahía de San Quintín. Ambos tipos de muestras fueron preservadas en tubos falcon de 50 ml en agua

de mar estéril con una solución de formaldehído al 2% hasta su posterior análisis de microscopía.

Para el montaje de las muestras fue necesario deshidratar el tejido previamente para reducir la auto fluorescencia de la clorofila. Para esto, se realizaron lavados secuenciales con etanol (50, 75, 100%) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos cada uno (Figura 3).

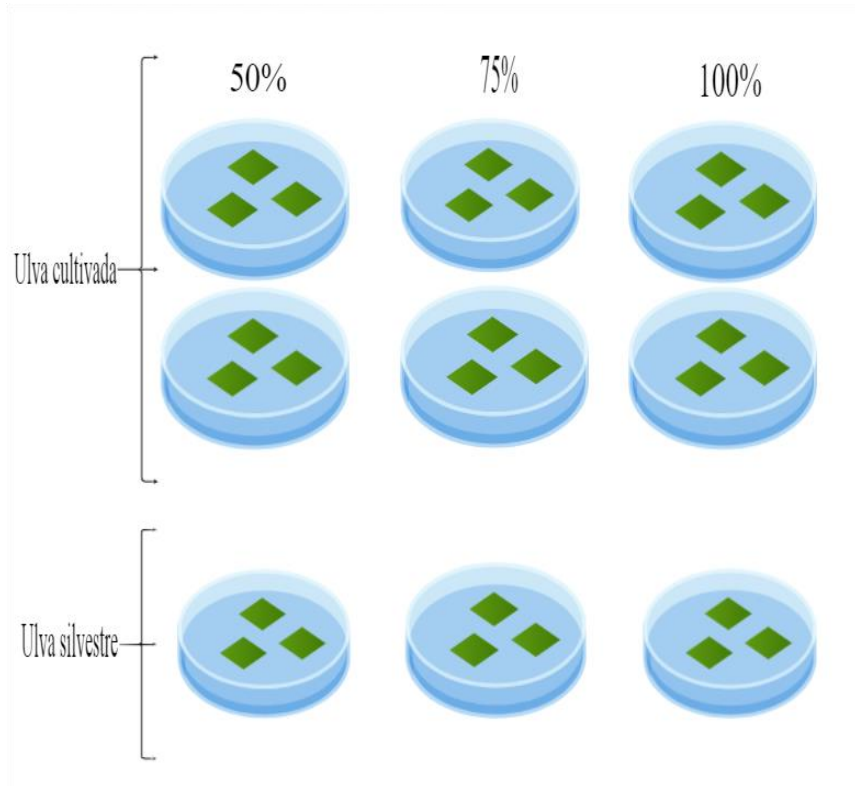


Figura 3. Tratamiento de muestras de *U. ohnoi* (cultivada y silvestre) para reducir la auto fluorescencia (clorofila) mediante diferentes concentraciones de etanol.

Una vez finalizados los lavados con etanol, se prepararon las muestras para microscopía (Fig. 4) con las siguientes soluciones: 89 μL Glicerol-PBS 50:50, 1 μL 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI; $1,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), 1 ml y 10 μL de solución anti-blanqueamiento (phenylenediamine sulfate). A cada muestra deshidratada se le añadió 13 μL de la solución de montaje. Se utilizó el fluorocromo DAPI para teñir el ADN, con un máximo de excitación y emisión de 358 nm y 461nm respectivamente.

Se usó el microscopio de epifluorescencia de la marca Axioskope II plus (Carl Zeiss, Alemania), con objetivo 100X (Plan-Apochromat, Carl Zeiss), y lámpara de arco de xenón de 175 W (Lambda LS, Sutter) conectada a través de una guía de luz líquida. El microscopio procura espectros de excitación y emisión controlados por ruedas de filtro (Lambda 10-3, Sutter) (Schneider et al., 2012; Cruz-López & Maske, 2014). La captura de imágenes se realizó generando Z-stacks con una distancia de 0.5 μm entre cada imagen. Se capturaron las imágenes de manera aleatoria, generando una galería de imágenes para las muestras de *U. ohnoi* cultivada fue necesario hacer conteos por semana (n=20) con su respectivo número de réplicas por cada muestra (N=6). De igual modo para las muestras de *U. ohnoi* silvestre se hizo un conteo (n=20) muestras por réplica (N=3)

Una vez generada la galería de imágenes, se procedió a su limpieza y al conteo de bacterias (C, Figura 4) utilizando el programa ImageJ (FIJI). Este proceso consistió en 3 pasos: (1) ajuste y escala de píxel (696x63) μm , (2) corrección del ruido blanco con un ajuste de píxel (100), (3) ajuste de resolución con filtro >promedio >3D> Lut (color falso). Una vez completados estos pasos, se continuó con la cuantificación de bacterias para determinar la abundancia microbiana por cuadrante (5355 μm^2). Esta cuantificación implicó también un conteo de diferentes morfotipos bacterianos en donde se calcularon los promedios y desviaciones estándar de la abundancia bacteriana por cuadrantes de 5355 μm^2 . Se determinó la cantidad total de células bacterianas adheridas al tejido de *U. ohnoi* y se evaluó la distribución del microbioma en dos entornos diferentes.

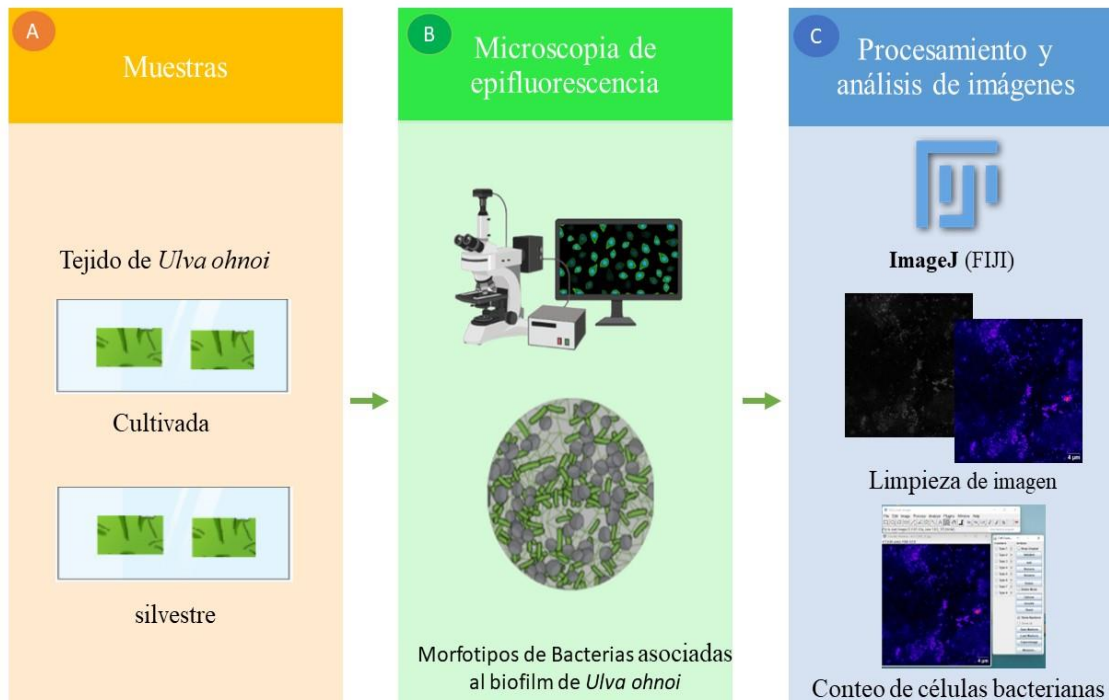


Figura 4. Representación esquemática del proceso de captura de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia en tejido de *Ulva sp* (cultivada y silvestre). (A) Fijación del tejido. (B) Identificación de morfortipos bacterianos. (C) Captura, limpieza y conteo de imágenes. Se realizaron n= 20 capturas de imágenes en áreas de $5,4 \times 10^3 (\text{mm}^2)$.

2.1.8 Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo ADN del microbioma de *U. ohnoi* de 10 muestras en total: 8 de *U. ohnoi* cultivada y 2 para la silvestre. Los filtros de membrana ($0.2 \mu\text{m}$) se colocaron en microtubos Eppendorf (Figura 5). A cada membrana se le añadió 1 ml de un buffer de lisis (Collins et al. 1987). Posteriormente las muestras fueron lisadas en un mini BeadBeater (BIOSPEC PRODUCTS) en agitación vigorosa, con un tiempo de 60 s a 5000 rpm. En este paso se realizó una lisis celular con el fin de romper las membranas celulares y liberar el material genético (ADN) del microbioma. El material celular lisado se preparó para la extracción y cuantificación de ADN utilizando el kit PowerSoil®, siguiendo el protocolo del fabricante (Figura 5). Una vez finalizada la extracción de ADN, las muestras se conservaron en congelación (-20°C) hasta su posterior análisis.

Se cuantificó la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm y la pureza del ADN (concentración de proteínas 280 nm) para cada una de las muestras evaluadas, por medio de espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop (Thermo Scientific Nanodrop ND-100 UV-VIS). Posteriormente las muestras se conservaron congeladas a -20°C.

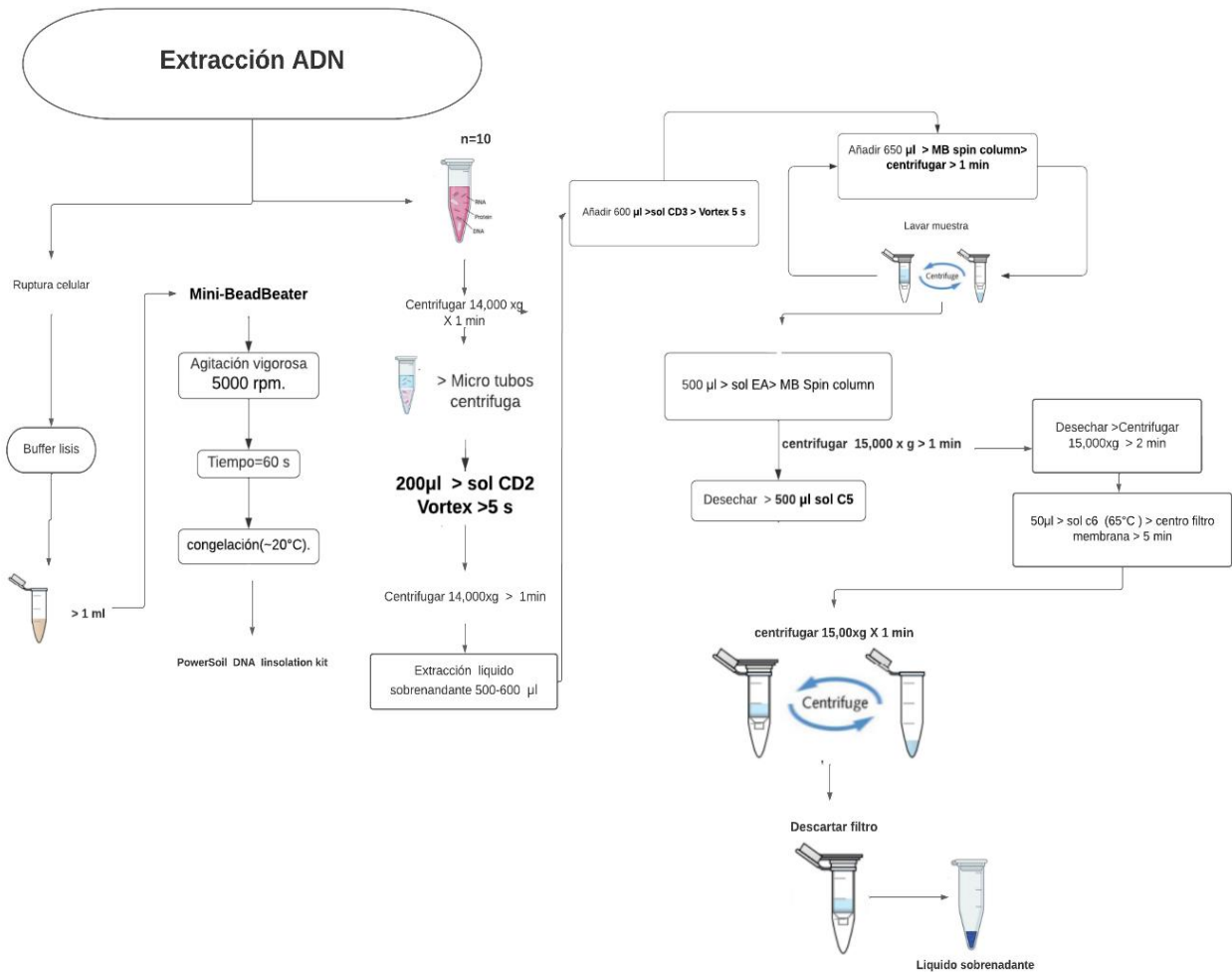


Figura 5. Descripción de la extracción de ADN utilizando el kit marca PowerSoil® para las muestras de *Ulva ohnoi* (cultivada y silvestre).

2.2 Análisis del microbioma por secuenciación masiva del gen 16S rRNA

Se seleccionaron 8 muestras correspondientes desde el inicio del experimento hasta el final del ciclo de cultivo (S1-S4) de *U. ohnoi*, y 2 muestras de *U. ohnoi* silvestre al azar. Estas muestras se utilizaron para secuenciar el gen 16S rRNA región V3-V4 (primers),

con el fin de identificar la composición taxonómica de las comunidades microbianas asociadas a la superficie de las algas, mediante secuenciación masiva TruSeq® DNA PCR-Free (Illumina, EE. UU.)

El procesamiento de secuencias se basó en la detección y eliminación de quimeras, recorte de secuencias, y eliminación de lecturas mitocondriales, arqueas y eucariotas. Además, se filtraron las variantes de secuencia de amplicón (ASV).

La asignación taxonómica para este estudio se realizó con sklearn (Pedregosa et al. 2011), que se basa en el algoritmo de machine learning (inteligencia artificial) Naive Bayes, con la base de datos de referencia entrenada de SILVA 138-version (Quast et al. 2012), y con el archivo de secuencias representativas generado con DADA2 y R studio (v 4.2.0).

2.3 Análisis estadísticos

Para evaluar los cambios en la estructura y dinámica del microbioma asociado a *U. ohnoi* durante un ciclo de cultivo (4 semanas), se llevaron a cabo dos etapas: (I) se realizó un análisis univariante de los datos ambientales que incluyó la verificación de la normalidad de los datos (pH, temperatura e irradiancia) de las muestras de *U. ohnoi* cultivada, utilizando la prueba de Shapiro-Wilk (1965). (II) se aplicó un análisis de dispersión a los datos biológicos, que incluían carbohidratos y proteínas totales. Para visualizar estos datos, se generaron gráficos utilizando el programa SigmaPlot versión 11.0 (SYSTAT Software Inc.).

Para la estimación de la abundancia de los diversos morfotipos bacterianos presentes en la biopelícula de *U. ohnoi*, tanto en muestras cultivadas como en muestras silvestres. Este análisis se dividió en tres etapas: (I) análisis de la abundancia bacteriana total, (II) análisis de la abundancia relativa utilizando las fórmulas propuestas por Carreño y Romero en 2015, y (III) análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis."

En donde ni es el número de individuos de la misma especie y N el número de individuos totales en la muestra.

$$(I) Ab = \frac{ni}{N} \quad (II) Ab\% = \frac{ni}{N} \times 100$$

(III) Se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para evaluar la presencia de diferencias significativas entre las medianas de la abundancia bacteriana en cada grupo, en este caso, las semanas (S1-S4) y un entorno externo (SQ).

$$H = \frac{12}{N(N + 1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N + 1)$$

Los análisis estadísticos de la estimación de la abundancia se realizaron en R Studio (v 4.2.0).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Evaluación de los muestreos físico- químicos de *Ulva ohnoi* durante su cultivo en pozas piloto comerciales.

Se observó una disminución gradual de la irradiancia (A, Figura 6) a medida que aumenta la biomasa de *U. ohnoi*. A partir de la segunda semana del experimento, se observa una reducción promedio del 70% en la irradiancia (A, Figura 6) y durante la última semana (S4), se evidencia una reducción significativa del 96% a una profundidad de 50 cm, y del 100% en el fondo de las pozas.

De forma general, los valores del pH (B, Figura 6) registrados al inicio del día se encontraron en el rango de 8.0- 8.2. El pH se incrementó a lo largo del día hasta alcanzar valores máximos de 9.5 y 9.7.

Durante la primera semana (S1), se registró la temperatura más elevada con valores de 21°C y una mínima que osciló entre 18-19°C (C, Figura 6). A partir de la segunda (S2) y tercera (S3) semana, la temperatura se mantuvo estable, presentando valores máximos de 20-21°C y mínimos de 17°C. Durante la cuarta semana (S4), se observó una disminución en la temperatura, con máximas de 18-19°C y mínimas de 15°C.

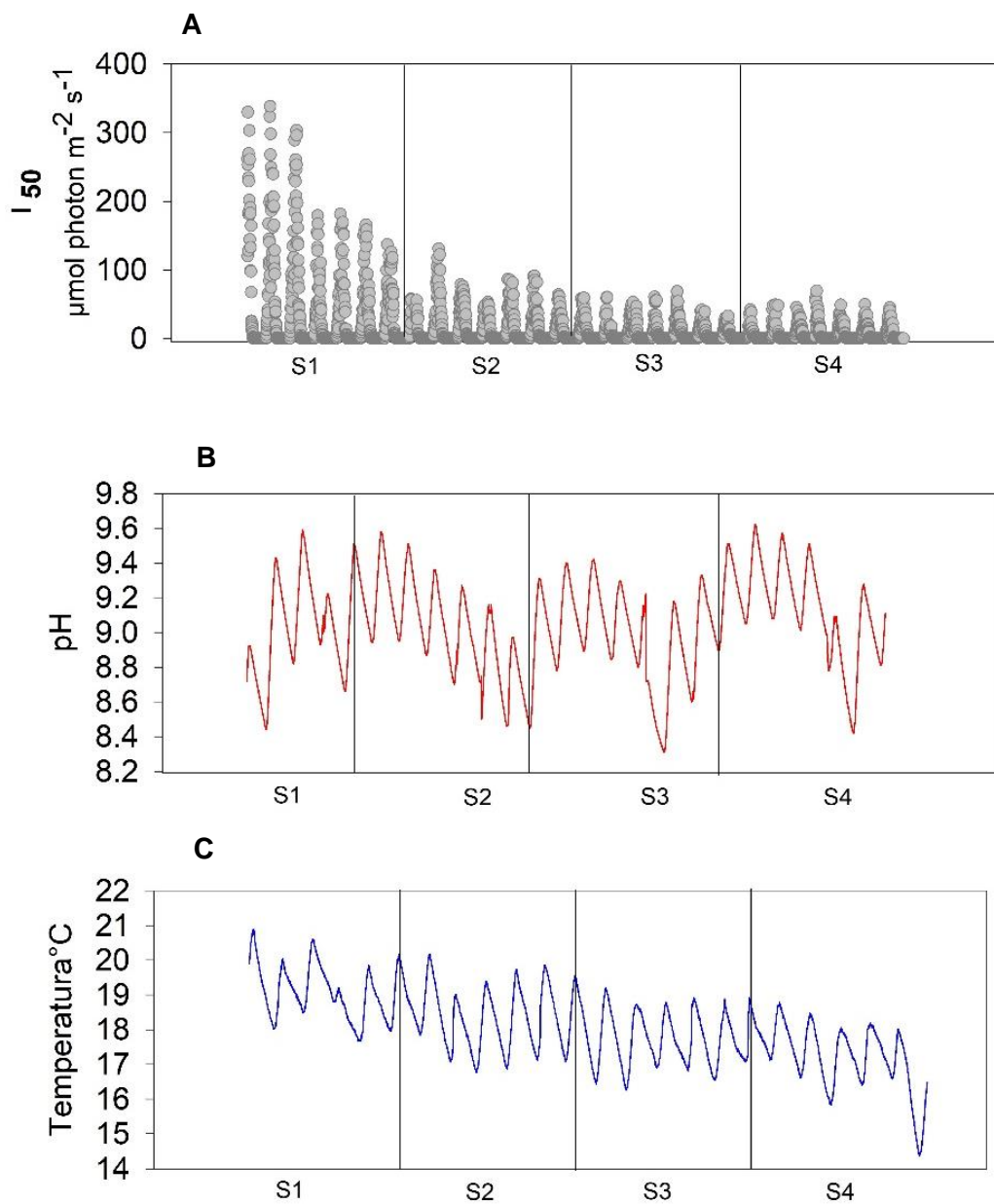


Figura 6. Parámetros físico-químicos medidos en las pozas piloto de cultivo de *U. ohnoi*. Los valores mostrados en las gráficas son datos continuos. Irradiancia (A), pH (B) y Temperatura (C).

Durante el experimento de cuatro semanas, de manera general no se observó una relación evidente entre el consumo de (NO_3^-) y el incremento de la biomasa de *U ohnoi*.

A excepción durante los días de recambio donde **descendió a menos de** El consumo de (NO_3^-) fue muy variable entre los días de la semana como entre cada semana p.e, durante el primer día de fertilización no hubo un consumo significativo a lo largo del día, sin embargo, el segundo día de fertilización (jueves) en el transcurso del día si hubo una reducción en el consumo 150 μM (Figura 7).

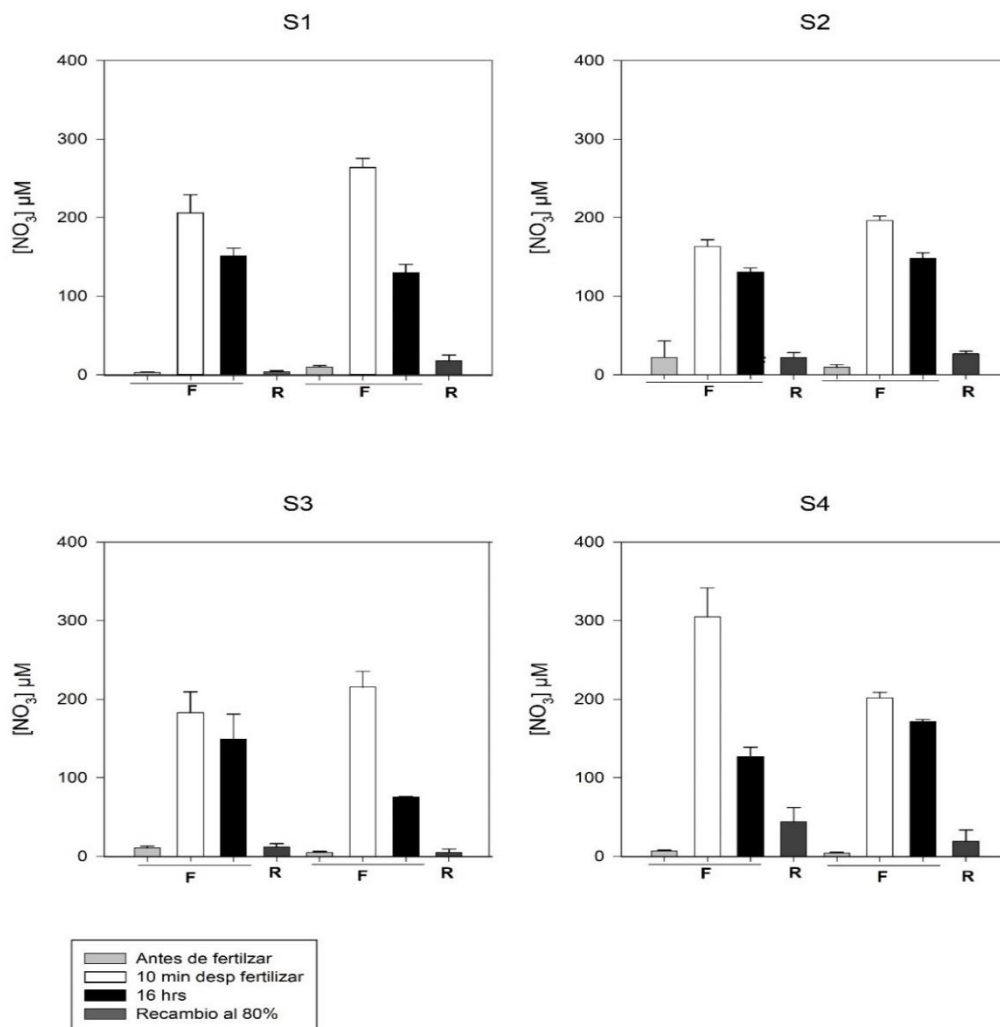


Figura 7. Concentración de nitratos (NO_3^-) (μM) en el agua de mar de las pozas durante las semanas de cultivo (S1-S4), en los días de fertilización (F) y recambio de agua al 80% (R); Las barras indican el tiempo (minutos y hora) en la que se tomaron las muestras de nutrientes (NO_3^-).

3.2 Evaluación de los muestreos biológicos en el cultivo de *Ulva ohnoi* en pozas piloto comerciales.

No se encontraron patrones significativos en el contenido en carbohidratos y nitrógeno a lo largo del ciclo de cultivo (Figura 8). durante el ciclo de cultivo (S1-S4)

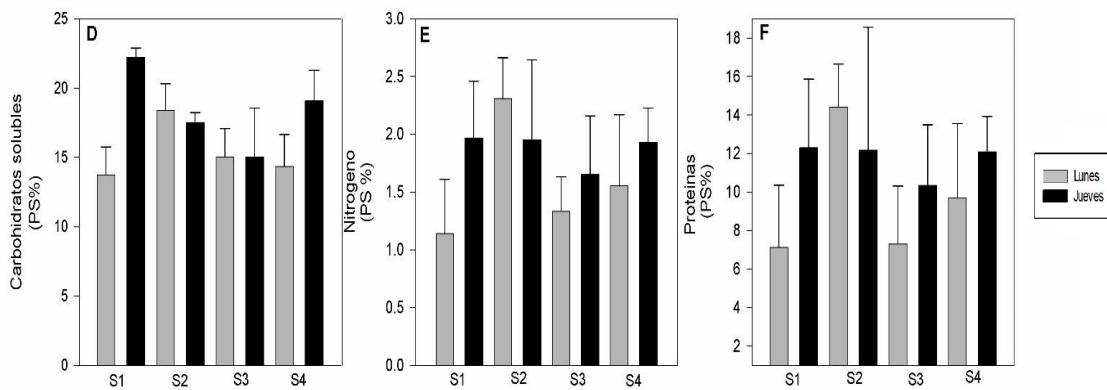


Figura 8. Variación del análisis proximal del contenido de carbohidratos solubles (D) Nitrógeno (E) y proteínas (F) de *U. ohnoi.*, Durante el ciclo de muestreo (S1-S4). Las barras de color gris y negro representan los días de fertilización (lunes-jueves). los valores mostrados en las gráficas representan el porcentaje de las muestras en peso seco (promedio) con su respectiva desviación estándar.

3.3 Detección de bacterias epífitas asociada con *Ulva ohnoi* (cultivada y silvestre)

Durante el cultivo de *U. ohnoi* se identificaron tres morfotipos de células bacterianas (t1-t3), cada uno con variaciones en su abundancia (Figura 9). El morfotipo t1 corresponde a bacterias de forma esférica que tienden a agruparse en micro colonias, mientras que el t2 consiste en bacterias también esféricas, pero con una forma más definida y un tamaño mayor. Estas últimas, por lo general, se encontraban cerca de otras células de la misma cepa bacteriana, manteniendo cierta distancia entre ellas. Por otro lado, el morfotipo t3 corresponde a bacterias con forma ovalada que forman cadenas.

En la primera semana del cultivo (S1) se observaron los tres morfotipos de células bacterianas (tipo 1, t1; tipo 2, t2; tipo 3, t3) con variaciones en su abundancia (Figura 9). Se aprecia un incremento en la abundancia de las células bacterianas durante el transcurso de cultivo (S1-S2), mostrando un patrón de distribución heterogéneo. Se observó (A-C, Figura 9) cómo los diversos morfotipos de bacterias mostraron patrones de comportamiento, incluyendo la distancia entre los morfotipos identificados y las diferencias en su abundancia, como se ejemplifica en el caso del morfotipo (1) (B-D Figura 9). En la semana 2 (B-D, Figura 9), se observó un aumento significativo en la abundancia de los morfotipos t1 (75 %) y t2 (25 %), mientras que no se encontró el t3. Durante la tercera semana (Figura 10), el t3 apareció, aunque con una baja abundancia, y t1 y t2 siguieron siendo los morfotipos más predominantes.

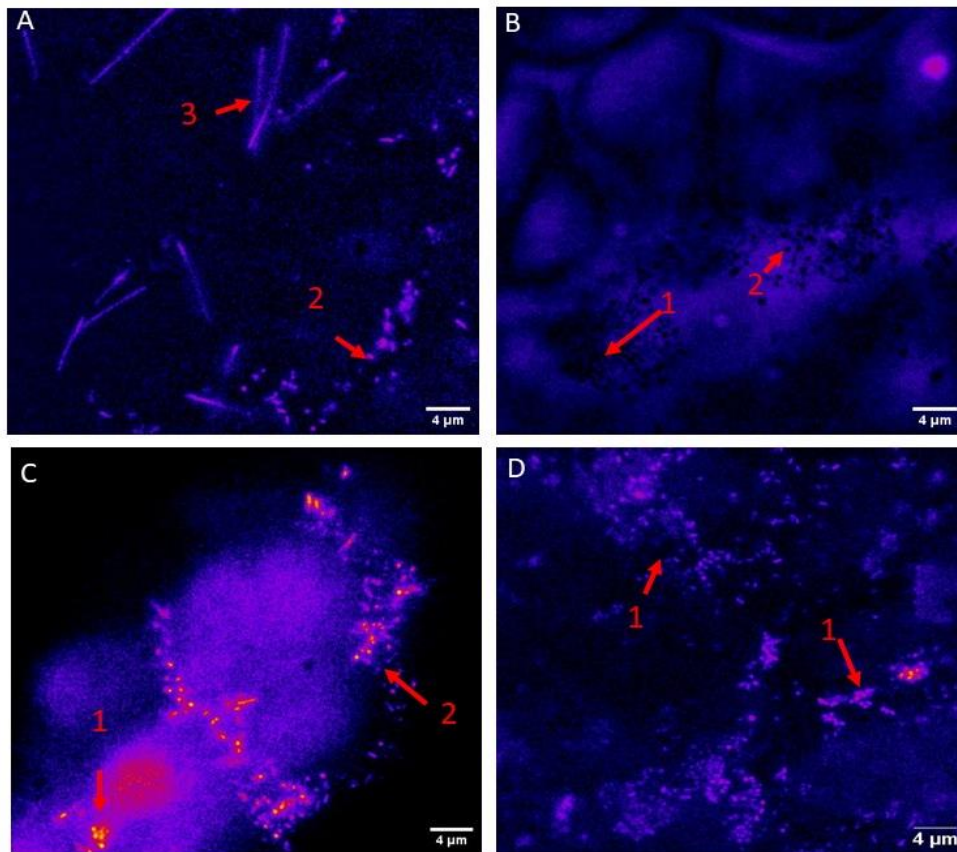


Figura 9. Imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia: células bacterianas en el biofilm de *Ulva ohnoi* (S1-S2) Teñidas con el fluorocromo DAPI. Los números señalados con flechas indican los morfotipos bacterianos encontrados en la muestra (cuadrante =1091 μm^2). S1(lunes A y jueves C), S2 (lunes B y jueves D)

En la mayoría de las imágenes analizadas se observó que el "morfofoto t1" solía estar con su misma cepa bacteriana, localizadas entre los surcos de las células (B-C, Figura 9) y en la capa superficial de la biopelícula de *U. ohnoi* (D, Figura 10). En cambio, para los morfotipos t2 y t3, se observó una distribución más dispersa y menos homogénea (A-C, Figura 10).

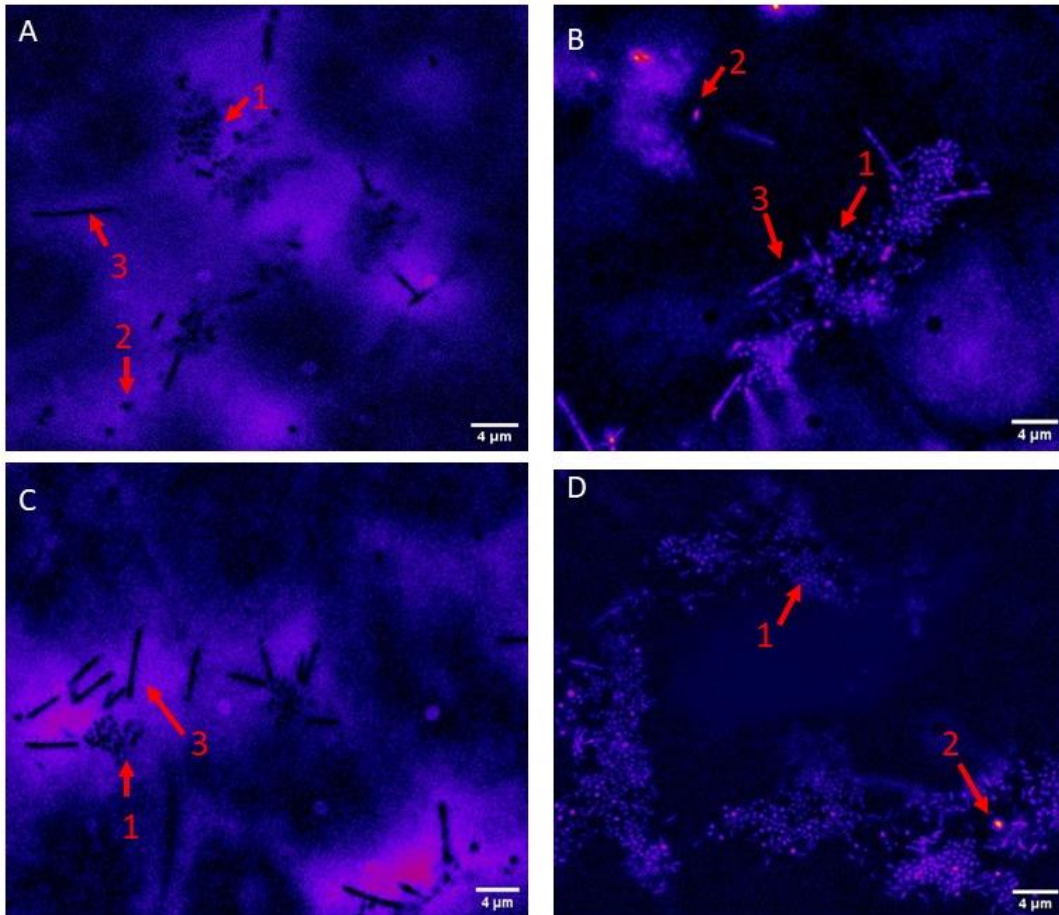


Figura 10. Imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia: células bacterianas en el biofilm de *Ulva ohnoi* (S3-S4) Teñidas con el fluorocromo: DAPI. Los números señalados con flechas indican los morfotipos bacterianos encontrados en la muestra (cuadrante =1091 μm^2). S3 (lunes A y jueves. C), S4 (lunes B y jueves D).

Las imágenes obtenidas revelaron notorias disparidades en lo que respecta a la diversidad de morfotipos bacterianos y al número de células adheridas a la biopelícula en diversos microhábitats. En el caso de la *U. ohnoi* cultivada, se constató un sustancial incremento en la abundancia bacteriana, así como una amplia diversidad taxonómica (Figura 9-10). Estas variaciones presentaron un contraste en relación con las observadas en las muestras correspondientes de la silvestre (Figura 11).

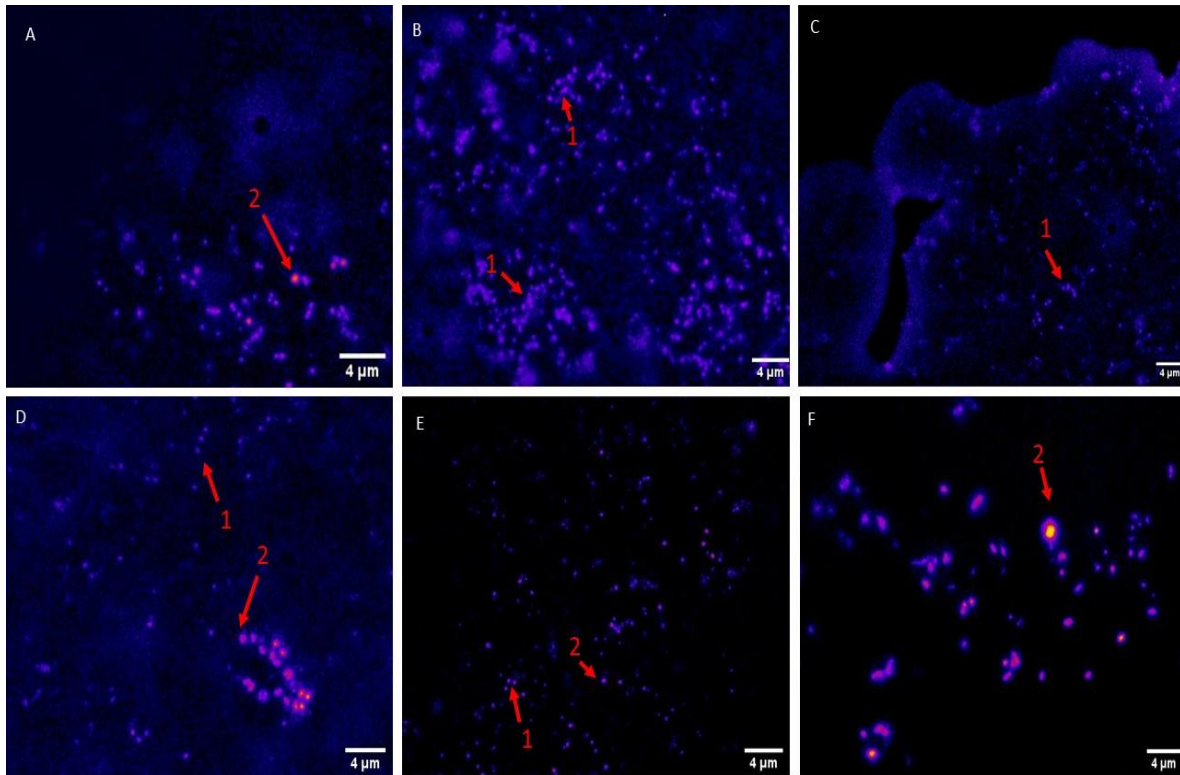


Figura 11. Imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia: Teñidas con el fluorocromo DAPI. Los números señalados con flechas indican los morfotipos bacterianos encontrados en la muestra. (cuadrante =1091 μm^2). (A-E) células bacterianas adheridas en la biopelícula de *U. Ohnoi* (silvestre).

En cuanto a *U. ohnoi* cultivada, se observaron cambios en la abundancia bacteriana durante el ciclo de cultivo (S1-S4), siendo el morfotipo t1 el que se presentó con mayor presencia (80%) en todas las muestras. Los morfotipos de bacterias predominantes en las muestras de *U. ohnoi*. silvestre fueron los t1 (90 %) y t2 (10 %). No hubo presencia del morfotipo t3. Asimismo, se constató que la distribución espacial de los morfotipos

bacterianos fue más homogénea (Figura 11). De forma general, las poblaciones bacterianas se localizaron en la primera capa de la biopelícula y en la periferia de la célula huésped (D, Figura 11).

3.4 Abundancia relativa de la comunidad bacteriana epífita asociada con *Ulva ohnoi* (cultivada y silvestre).

Para *U. ohnoi* cultivada (Figura 12b), se identificaron tres morfotipos de bacterias. El t1 siguió predominando ($\geq 85\%$), mientras que t2 (14%) y t3 (1%) fueron los menos abundantes.

Durante las semanas 1-2 (Figura 12), t1 fue el morfotipo más abundante (95%), seguido por t2 ($>80\%$). Sin embargo, t3 disminuyó significativamente ($<10\%$) en la segunda semana. Durante las semanas 3 y 4 (Figura 13), t1 siguió siendo predominante, pero hubo una fuerte disminución en t2 y t3.

En *U. ohnoi* silvestre (Figura 13) solo se encontraron dos tipos de morfotipos, t1 y t2. El t1 fue predominante (más del 90%), pero t2 comenzó a aparecer a partir de la muestra 10 en adelante. A diferencia de las muestras de *U. ohnoi* cultivada (Figura 12), t2 no mostró un patrón uniforme.

En las muestras de *U. ohnoi* silvestre, solo se observaron dos tipos de morfotipos, t1 (81%) y t2 (19%) (Figura 14a)

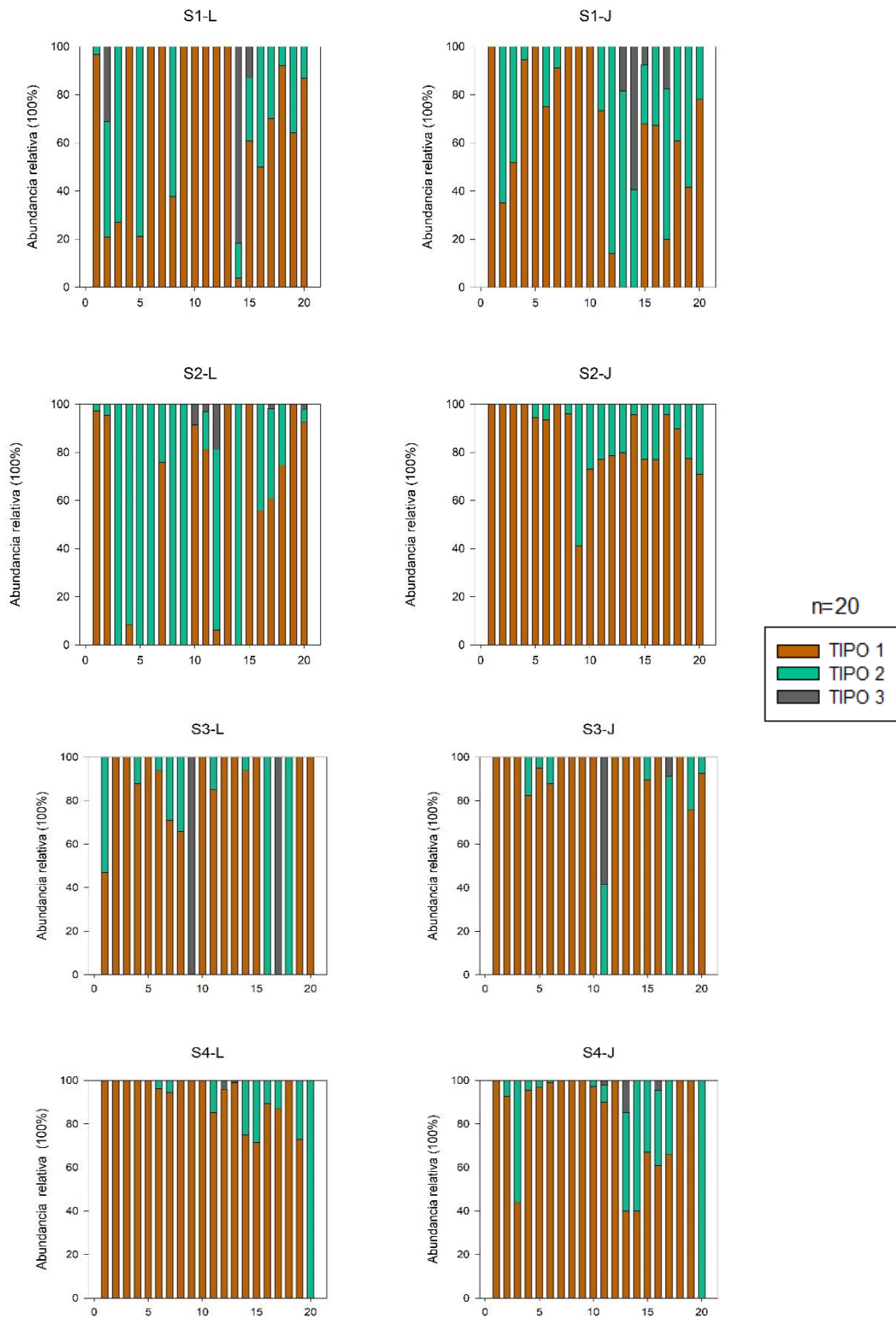


Figura 12. Abundancia relativa (%) bacterias asociadas a *U. ohnoi* cultivada durante la semana (S1-S4). En el eje X se representa el número de muestras (n=20), mientras que en el eje Y se refleja la abundancia relativa total (100%). Los morfotipos bacterianos identificados (1, 2, 3): t1 (naranja), t2 (verde) y t3 (gris).

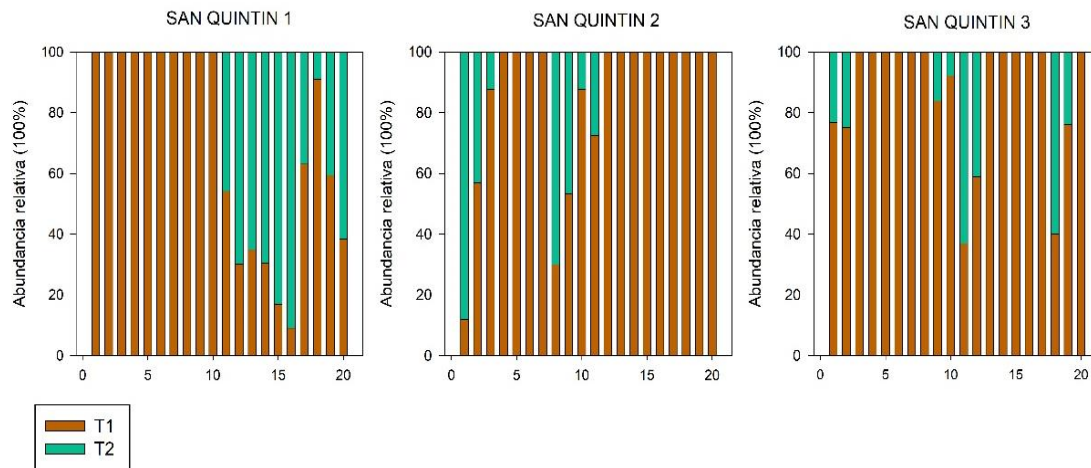


Figura 13. Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa (%) de dos morfotipos de bacterias asociadas a la biopelícula de *U. ohnoi* silvestre. En el eje X se representa el número de muestras (n=20), mientras que en el eje Y se refleja la abundancia relativa total (100%). Tipo (1,2). 1 (naranja), 2 (verde).

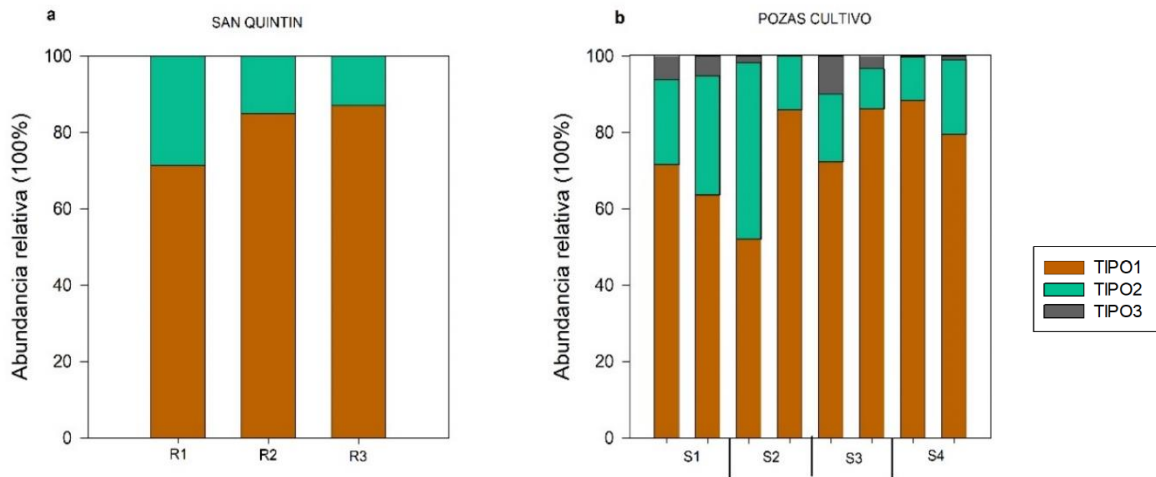


Figura 14. Abundancia relativa en dos distintos ambientes: a) San Quintín (b) Pozas cultivo. Tipos de morfotipos bacterianos asociados a la biopelícula de *U. ohnoi*. Tipo (1,2 ,3) t1 (naranja), t2 (verde) y t3(gris).

3.5 Evaluación de la abundancia bacteriana asociada con la macroalga *Ulva ohnoi* (cultivada y silvestre).

En el caso de las muestras de *U. ohnoi* cultivada, no se observa un patrón de abundancia constante a lo largo del ciclo de cultivo(S1-S4).

Durante la primera semana (S1), el promedio de abundancia bacteriana fue de 2611 por cuadrante, con un aumento significativo el jueves (S1) llegando a un promedio de 4597.5 en la tercera réplica. En la segunda semana (S2), se observa variabilidad en la abundancia, siendo la tercera réplica la que presenta el mayor número de células, con un promedio de 6098.5. En la tercera semana (S3), se registra una disminución significativa en el número de células por réplica, con un promedio total de 2855. Además, se observa que no hubo un patrón estable de abundancia bacteriana, siendo esta muy variable a lo largo del cultivo (Figura 15). Por el contrario, la variabilidad fue mucho más reducida en las muestras de *U. ohnoi* silvestre.

Tabla 1. Análisis de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Basándonos en los datos obtenidos de la abundancia bacteriana por ambiente.

Ambiente	Prueba no paramétrica: Kruskal-Wallis $P < 0.05$	
Cultivo (S1-S4)	$H = 1.428$	$p = 0.036$
Silvestre (SQ)		

Se reveló una diferencia significativa entre los entornos ($p = 0.036$), indicando una disparidad significativa en la abundancia bacteriana entre *U. ohnoi* cultivada y silvestre. Nuestro resultado sugiere una alta variabilidad de grupos bacterianos en los diferentes entornos (cultivo y silvestre) (Figura 15).

Los resultados estadísticos respaldan la existencia de variabilidad en los grupos taxonómicos en *Ulva* cultivada y silvestre, confirmado por el análisis de metagenómica que se realizó al profundizar en la secuenciación a través de una curva de rarefacción (ver anexo 1). Esta curva muestra la presencia de un número considerable de Secuencias Variantes Amplicon (ASVs) en ambos tejidos de *Ulva* cultivada y silvestre. Sin embargo, al observar las gráficas de abundancia relativa (Figura 14), se evidencia que los grupos bacterianos asociados no son idénticos.

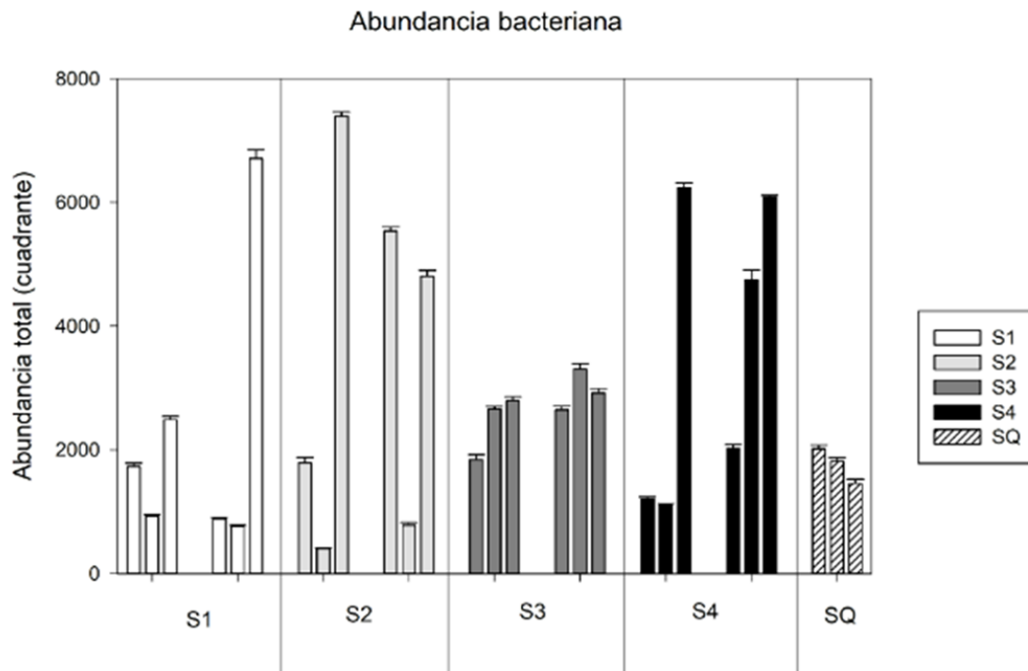


Figura 15. Abundancia total de bacterias epífitas para *U. ohnoi* cultivada (s1-s4) y silvestre (SQ). Los valores representados en las barras son los promedios obtenidos de las réplicas (N=3) con su respectiva desviación estándar.

3.6 Evaluación de la composición taxonómica bacteriana epífita de *U. ohnoi* (cultivada vs silvestre) por medio de secuenciación masiva del gen 16S RNA.

En total se detectaron 4386 ASV (Amplicon Sequence Variants) para este estudio. *U. ohnoi* en cultivo presentó mayor número de ASV 94.58 % (4146.10 de 4386 ASV), mientras que *U. ohnoi* silvestre mostró el 5.47% (239.89 de 4386). Además, se removió el 2.34 % correspondiente a bacterias sin identificar (*unassigned*)

Respecto de los ASVs en *U. ohnoi* cultivada, los filos bacterianos más abundantes fueron Proteobacteria (56.71%), Actinobacteria (15.64%) y Firmicutes (12.73%). Fibrobacteriota (0.32%) fue representativo en una medida limitada. Los restantes ASVs exhibieron abundancias inferiores (0.77%). (Figura 16).

En *U. ohnoi* silvestre, Firmicutes (73.97%) y Bacteroidota (21.19%) conformaron los filos predominantes. Actinobacteria (0.89%) y Verrucomicrobiota (2.11%), tuvieron presencia

baja. El conjunto restante (1.84%) englobó distintos filos bacterianos, aunque presentes en escasa abundancia. Por ejemplo, Acidobacteriota y Deinococcota no fueron identificados en las muestras de *U. ohnoi* silvestre (Figura 16-SQ).

En *U. ohnoi* cultivada, las clases más predominantes incluyeron a las Gammaproteobacterias (48.29%), Actinobacteria (11.83%), Bacteroidota (4.21%), Alphaproteobacterias (7.55%), Bacilli (2.90%), y con una menor proporción, Clostridia (1.39%). La fracción restante de clases bacterianas (26.3%) exhibió abundancias relativas inferiores o prácticamente nulas (Figura 17). En *U. ohnoi* silvestre (SQ, Figura 17), la clase Clostridia (72.27%) se mostró como la más representativa, seguida por Bacteroidia (21.20%). Las restantes clases incluyeron a Verrucomicrobiae (2.18%), Alphaproteobacterias (3.74%) y otras <0.6%. Cabe resaltar que no se evidenció presencia de gamma proteobacterias en las muestras de *U. ohnoi* silvestre (SQ, Figura 17).

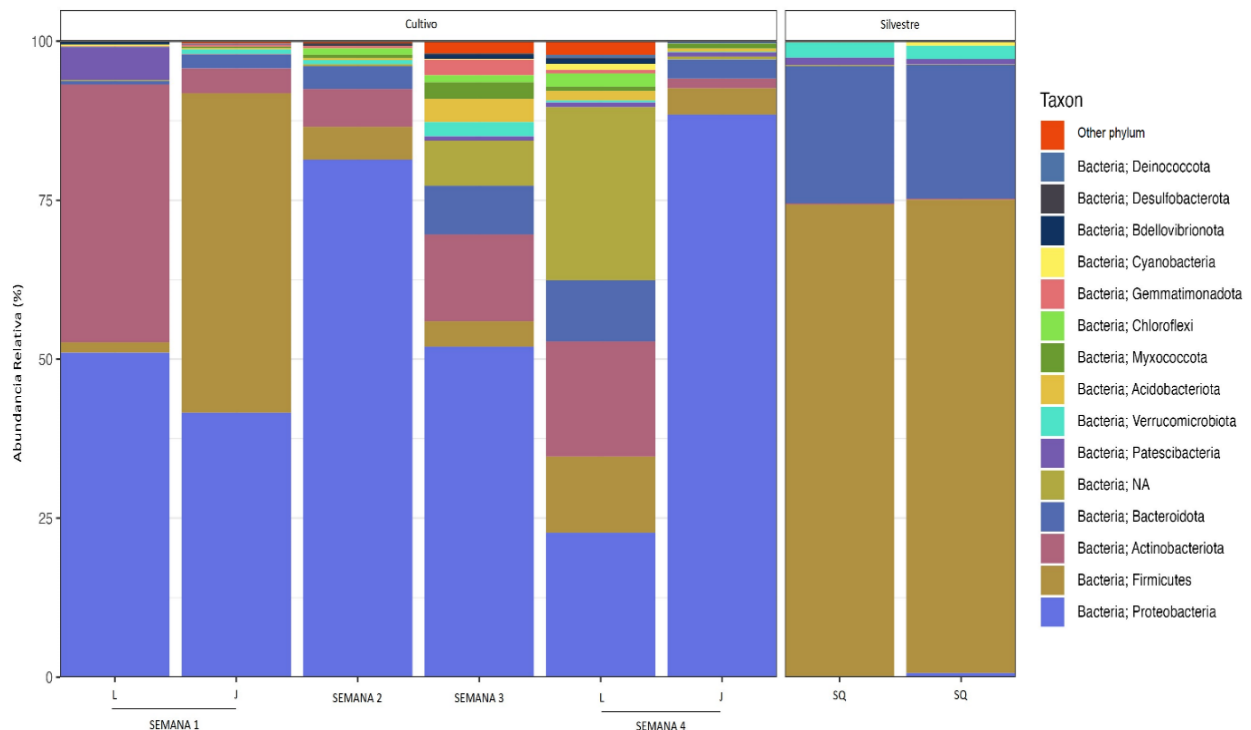


Figura 16. Abundancia relativa a nivel de filo: la composición taxonómica de *U. ohnoi* en distintos ambientes (cultivada y silvestre). Los valores, representados en un gráfico de barras, muestran en el eje Y la abundancia relativa, mientras que en el eje X se refleja la semana o sitio de recolección de cada muestra.

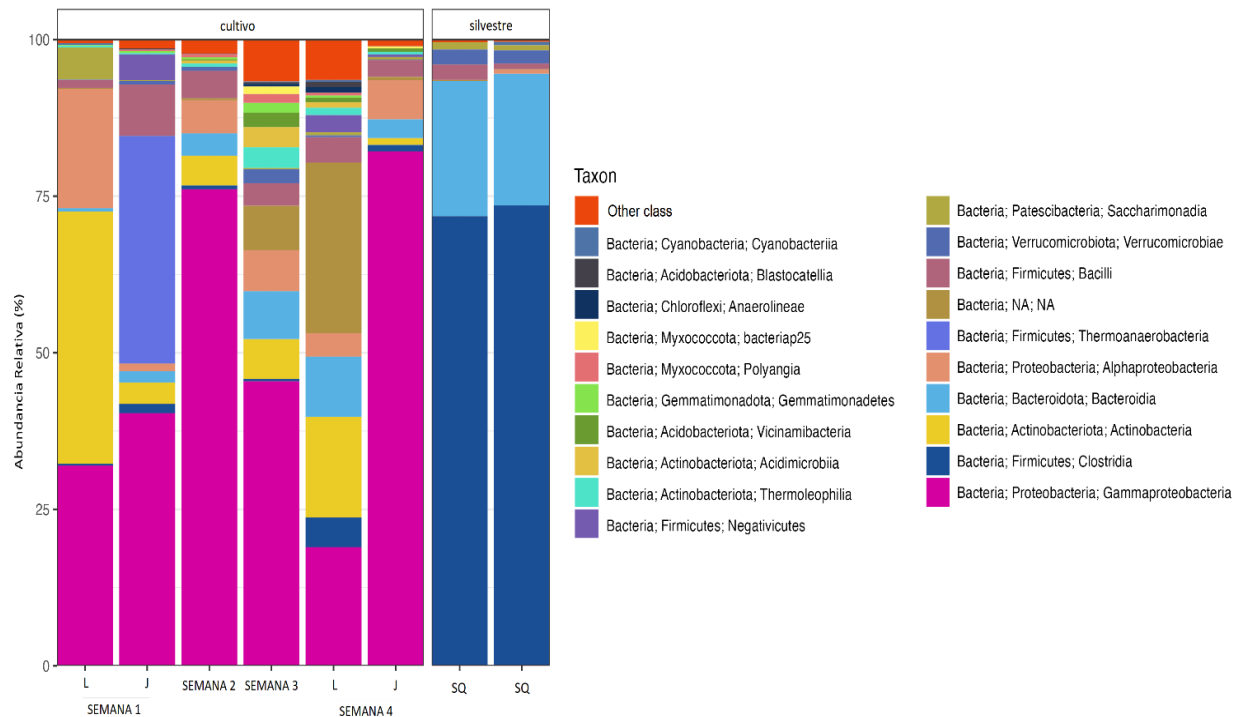


Figura 17. Abundancia relativa a nivel de clase: la composición taxonómica de *U. ohnoi* en distintos ambientes (cultivada y silvestre). Los valores, representados en un gráfico de barras, muestran en el eje y la abundancia relativa, mientras que en el eje x se refleja la semana o sitio de recolección de cada muestra.

A nivel taxonómico de orden en *U. ohnoi* cultivada, predominaron las Gammaproteobacterias del orden Burkholderiales (Figura 18). Como se evidencia en la Figura 16-17, muestran una consistencia notoria en las transiciones taxonómicas desde clase hasta orden en *U. ohnoi* cultivada. En *Ulva* silvestre, se presenta una mayor diversidad de órdenes pertenecientes al filo Firmicutes

Es importante mencionar en el gráfico de barras (representado en rojo) figuran agrupaciones adicionales de bacterias presentes en el tejido de *U. ohnoi*, tanto en cultivo como silvestre. Dichos grupos bacterianos se han catalogado como "otros grupos" (con su correspondiente porcentaje de presencia en las muestras) a fin de evitar la congestión visual en el gráfico, dada su escasa presencia en términos de abundancia (Figura 16-17-18).

Tal como se mencionó anteriormente, se realizó la selección de quince taxones con mayor frecuencia en el tejido de ambos ambientes. En *U. ohnoi* silvestre se presentaron seis de los quince taxones de mayor representatividad. *U. ohnoi* cultivada presentó los quince taxones, pero cinco de ellos demostraron ser los más abundantes y representativos a lo largo de un ciclo de cultivo (S1-S4), como se observa en la Figura 18.

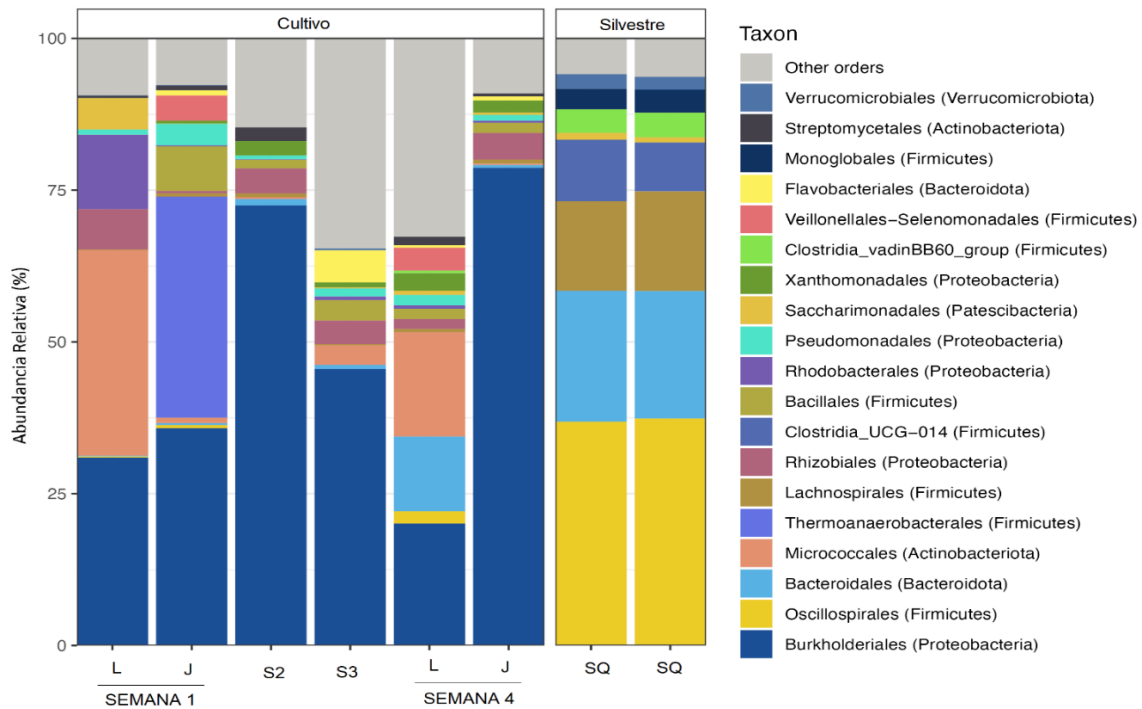


Figura 18. Abundancia relativa a nivel de orden: la composición taxonómica de *U. ohnoi* en distintos ambientes (cultivada y silvestre SQ). Los valores, representados en un gráfico de barras, muestran en el eje y la abundancia relativa, mientras que en el eje x se refleja la semana o sitio de recolección de cada muestra.

4.1 Efecto del sistema de cultivo en la estructura y función del microbioma epífita de *Ulva ohnoi*.

Durante un ciclo de cultivo, la disminución gradual de la irradiancia a medida que aumenta la biomasa de *U. ohnoi* es notoria a partir de la S2. La reducción en la disponibilidad de la luz puede tener un impacto significativo en la fotosíntesis y en el crecimiento de la macroalga (Gu et al., 2022), lo que a su vez puede afectar la producción de metabolitos que influyen en la formación de su comunidad microbiana epífita. De acuerdo con Florez et al. (2017), la acumulación de biomasa en las algas está estrechamente relacionada con la estructura del microbioma, ya que a medida que la biomasa de las algas aumenta, se crea un entorno propicio para la colonización y el desarrollo de comunidades bacterianas epífitas. Califano et al. (2020) demostraron que la cantidad de biomasa puede condicionar la diversidad y abundancia de los taxones simbióticos asociados a *Ulva* sp. En el caso de una mayor cantidad de biomasa, se requerirán mayores compuestos morfogenéticos para sustentar el crecimiento. Por ende, se espera una mayor presencia y abundancia de grupos bacterianos en términos de diversidad. Nuestros resultados concuerdan con estos estudios previos, y se observó mayor diversidad taxonómica *U. ohnoi* cultivada

Las variaciones en el pH en nuestro estudio pueden atribuirse a la actividad metabólica de *U. ohnoi* cultivada, ya que durante el día realizan la fotosíntesis y fijan bicarbonato y dióxido de carbono, lo que eleva el pH, mientras que, durante la noche, liberan dióxido de carbono, lo que reduce el pH del agua. En nuestros resultados no se observaron cambios sustanciales de pH a lo largo del ciclo de cultivo, por lo que su contribución a cambios en la comunidad bacteriana podría ser limitada. Singh y Reddy (2014) reportaron que la influencia del pH en el crecimiento de las bacterias asociadas a *U. lactuca* en un medio de cultivo afecta el crecimiento y la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias, lo cual sugiere que existe una relación estrecha entre el pH y el microbioma asociado a las algas.

Los rangos de temperatura no variaron significativamente a lo largo del ciclo del cultivo. Florez et al. (2017) mencionaron que el aumento de la temperatura puede promover la expansión de las Proteobacterias, influenciando la composición y diversidad de las comunidades bacterianas, incluso actuando como patógenos. En nuestros resultados de secuenciación (Figura 17) no se detectaron patógenos, pero sí una abundancia significativa de Proteobacterias (56.71%). Goecke et al. (2010) mencionan la importancia de comprender la relación entre la temperatura y el microbioma en los sistemas de cultivo para mejorar su eficiencia y productividad.

Durante las semanas S1-S4 no se registraron variaciones sustanciales en la concentración de carbohidratos solubles, nitrógeno y proteínas en *U. ohnoi*. Esto hace que no podamos establecer relaciones fiables entre el contenido de nutrientes de la macroalga y las bacterias asociadas, ya indicadas en otros estudios (Chisholm et al., 1996; Singh et al., 2011; Singh & Reddy, 2014; Ghaderiardakani et al., 2022).

A pesar del incremento en la biomasa, no se observaron cambios significativos en el consumo de NO_3^- durante el ciclo de cultivo. Cheng et al. (2022) indican el papel clave de las bacterias nitrificantes en la asimilación de nitrógeno inorgánico por parte de las algas, convirtiendo el amonio (NH_4^+) en nitrato (NO_3^-). Aunque en nuestros datos metagenómicos no identificaron grupos tradicionales de bacterias nitrificantes como la Clase: Beta proteobacteria; Orden; Nitrosomonadales pertenecientes al filo proteobacterias, sin embargo, se encontró la presencia de proteobacterias en conexión con nuestra *U. ohnoi* cultivada, lo que sugiere la posibilidad de un subconjunto de este filo bacteriano desempeñando una función similar a la de Nitrobacter. Se requieren investigaciones adicionales para verificar con certeza esta interacción nutriente alga-bacterias.

4.2 Análisis comparativo de la comunidad bacteriana epífita en *Ulva ohnoi* cultivada y silvestre

Nuestros resultados demostraron que la diversidad y composición del microbioma de *U. ohnoi* están intrínsecamente vinculadas al ambiente en el que las algas prosperan. *U.*

ohnoi cultivada mostró una gran diversidad de grupos taxonómicos en comparación con *U. ohnoi* silvestre. Se observó una predominancia taxonómica de Gammaproteobacterias a lo largo de todo el cultivo de *U. ohnoi*. Esto confirma trabajos previos (Tabla 2) en donde se refuerza que Gamma y Alphaproteobacterias son las clases comúnmente asociadas a algas marinas. Lo reportado por Califano et al. (2020) respalda lo observado en este trabajo, ya que también destacan la representatividad de las Gammaproteobacterias en *U. rigida* en condiciones de cultivo. Además, a través de experimentos de campo y laboratorio, estos autores documentaron su capacidad de degradar polisacáridos, sugiriendo que estas bacterias son más abundantes en tejido sano que en tejido enfermo. En nuestros análisis no se encontró tejido enfermo y tampoco se detectaron bacterias patógenas a lo largo de todo el experimento. Las Alphaproteobacterias desempeñan un papel simbiótico esencial en la relación con *Ulva* sp., influenciando la salud, el desarrollo y la inmunidad del hospedero, lo cual destaca su importancia en la defensa inmunológica del holobionte (Ghaderiardakani et al., 2020; Califano et al., 2020).

U. ohnoi silvestre y cultivada mostraron diferencias significativas en sus perfiles microbianos. La muestra silvestre destacó por la predominancia del filo Firmicutes, específicamente la clase Clostridia, evidenciando una distribución bacteriana más uniforme en comparación con la muestra cultivada, como se ilustra en las imágenes de microscopía (Figura 11). Ismail et al. (2018b) mencionan la capacidad de ciertas especies de Firmicutes para establecer relaciones simbióticas con algas marinas, descomponiendo la materia orgánica producida por estas algas, lo que contribuye al reciclaje de nutrientes en el ecosistema marino.

En nuestros resultados, se observó la presencia de Bacillales (16.37%) en *U. ohnoi* cultivada, pero no en la muestra silvestre. Ismail et al. (2018) señalan la posible relación simbiótica de *Bacillus* con *U. rigida*, actuando como agente antibacteriano que estimula el crecimiento y el sistema inmunológico del alga. Por otro lado, González et al. (2018) mencionan que ciertas especies de *Bacillus* presentes en la biopelícula de *U. lactuca* podrían poseer propiedades antimicrobianas capaces de combatir patógenos.

Polikovsky et al. (2020) y Wichard (2023c) resaltan que los sistemas de cultivo ofrecen un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias beneficiosas asociadas a *Ulva* sp., lo que podría ser relevante para investigar el mecanismo de la transferencia de metabolitos.

Es necesario aislar el microbioma presente *Ulva* sp y emplear técnicas de metagenómica, tal como se muestra en la Tabla 2, para seguir el perfil de la comunidad microbiana (Wichard, 2023c; Saha y Weinberger, 2019; Kessler et al., 2018). Además, se destaca la importancia de combinar la técnica de secuenciación con sistemas de cultivo, como se recomienda en el estudio de Wichard (2023b), para lograr el aislamiento de los grupos clave del microbioma.

Tabla 2. Diversidad bacteriana asociada a la biopelícula de *Ulva* sp. mediante secuenciación del gen 16S rRNA en estudios previos.

Macroalga	Metodología	Bacterias asociadas	Referencias
<i>U. australis</i>	Secuenciación gen 16S rRNA	Alphaproteobacterias, Gammaproteobacteria Bacteroidetes	Tujula et al. (2009)
<i>U. australis</i>	Secuenciación gen 16S rRNA	Alphaproteobacterias, Gammaproteobacteria Bacteroidetes Planctomycetes	Burke et al. (2011a, b)
<i>U. intestinalis</i>	Secuenciación gen:16S rRNA	Alphaproteobacterias, Gammaproteobacteria Bacteroidetes	Lachnit et al. (2011)
<i>Ulva</i> sp.	Secuenciación gen:16S rRNA	Planctomycetes	Bondoso et al. (2013)
<i>U. rigida</i>	Secuenciación gen:16S rRNA	Gammaproteobacteria Bacteroidetes	Ismail et al. (2018)
<i>U. mutabilis</i>	Secuenciación gen:16S rRNA	Maribacter Proteobacteria	Alsufyani et al. (2020) Califano et al. (2020)
<i>U. rigida</i>	Secuenciación gen:16S rRNA	Gammaproteobacteria. Proteobacteria	
<i>U. prolifera</i>		Verrucomicrobia	Qu et al. (2021)

	Secuenciación gen:16S rRNA	Bacteroidetes	
<i>U. bulbosa</i>		Bacteroidetes	
<i>U. compressa</i>	Secuenciación gen:16SrRNA	Alphaproteobacterias Flavobacteriales,	Ghaderiardakani et al. (2022)
<i>U. prolifera</i>	Secuenciación gen:16S rRNA	Rhodobacterales	Zhao et al. (2022)

Nuestros resultados mostraron que hubo diferencias en la abundancia y composición de grupos bacterianos entre *U. ohnoi* cultivada y silvestre. Esto se debe el microbioma asociado cambia dependiendo a las condiciones de dicho entorno, apoyado con lo reportado por Califano et al. (2020) y Egan et al. (2013).

En la biopelícula de *U. ohnoi* cultivada y silvestre, se han identificado grupos bacterianos esenciales, entre los cuales se destacan Bacteroidetes y Alphaproteobacterias. En particular, dentro de Alphaproteobacterias, se encuentran los Rhodobacterales, que han sido reconocidos por su contribución significativa al desarrollo y crecimiento de *Ulva* sp. En diversos estudios (Tabla 2) los cambios en el microbioma se han monitoreado utilizando la secuenciación del gen 16S rRNA, junto con diversas técnicas de microscopía tales como hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH). Las bacterias epífitas que normalmente se asocian con las algas verdes son en su mayoría Gammaproteobacterias, Bacteroidetes y Alphaproteobacterias (Tait et al. 2009; Tujula et al., 2009). Las Alphaproteobacterias contribuyen significativamente a la asimilación de dimetilsulfoniopropionato (DMSP), un osmolito producido por algas incluyendo *Ulva* sp. (Tujula et al., 2009). En nuestro estudio no se reportó una alta abundancia de este grupo bacteriano, aunque sí estuvo presente en *U. ohnoi* cultivada y silvestre.

Con relación a nuestros resultados de microscopía de epifluorescencia, se observaron micro-colonias localizadas en proximidad a la pared intercelular en *U. ohnoi* cultivada. Tujula et al. (2009) ya habían reportado un comportamiento similar en *U. australis* silvestre y lo habían explicado con la acumulación de nutrientes entre las células superficiales del alga. En la biopelícula de *U. australis*, se identificaron capas compactas de polisacáridos que contienen xilosa y glucosa. Estos componentes actúan como fuente

de carbono para las micro-colonias que se han observado en estas áreas (Bobin-Dubigeon et al., 1997; Tujula et al., 2009). Inclusive, se ha documentado que estas capas de polisacáridos contribuyen a la protección de las bacterias asociadas contra posibles estresores en hábitats poco profundos de mareas, como la desecación y la radiación ultravioleta (Egan et al., 2013). Este hecho podría ofrecer una explicación plausible para el patrón de comportamiento observado en la *U. ohnoi* cultivada, a pesar de que se encuentre en un entorno de cultivo con condiciones de estrés diferentes. La ausencia de estas capas de polisacáridos en la *U. ohnoi* silvestre podría influir en la distribución bacteriana, dado que no proporciona la misma protección ni la fuente de nutrientes que se encuentra en la *U. ohnoi* cultivada. Además, es importante considerar que el entorno del *Ulva* silvestre difiere significativamente del entorno controlado de los sistemas de cultivo. Las metodologías empleadas para ello fueron la microscopía de epifluorescencia y la secuenciación masiva del gen 16S rRNA. Se espera que los resultados obtenidos a partir de este estudio brinden una comprensión más profunda de cómo cambia el microbioma asociado en condiciones de cultivo, y cómo estas interacciones influyen en el rendimiento y crecimiento de la macroalga. Además, este trabajo podría establecer bases para el desarrollo de nuevos protocolos, como la estimulación de las macroalgas en cultivo y la síntesis de compuestos bioactivos por medio de la modificación artificial de su microbioma epífita (Wichard, 2023; Ke et al., 2021).

Capítulo 5. Conclusiones

1. Debido a la elevada variabilidad en la diversidad / abundancia bacteriana encontrada a lo largo del ciclo de cultivo, no pudimos establecer la relación directa entre la variación de los parámetros físico-químicos y dichos desajustes del microbioma epífita.
2. La presencia dominante de Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes en *U. ohnoi* cultivada sugiere una interacción compleja entre las condiciones de cultivo, el estrés ambiental y la comunidad bacteriana asociada.

3. Se encontró menor diversidad de bacterias en el tejido de *U. ohnoi* silvestre en comparación con *Ulva* cultivada, lo cual podría estar asociado a las condiciones ambientales de su entorno natural, p.e. Disponibilidad fluctuante y menos predecible de nutrientes, variabilidad de temperatura.
4. Aunque *Ulva* cultivada exhibió una mayor riqueza taxonómica, es importante notar que ambas muestras presentaron una significativa variabilidad en la comunidad bacteriana

5.1 Nuevas líneas de investigación

La microscopía de epifluorescencia resultó fundamental para analizar la distribución de bacterias en la biopelícula en ambos entornos. Para una identificación y enumeración más precisa de las bacterias en las muestras, será necesario incorporar técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH). Asimismo, se proyecta implementar análisis de metabolómica con el fin de identificar y cuantificar los metabolitos producidos tanto por el alga como por las bacterias, lo que podría revelar aspectos cruciales de las interacciones metabólicas. Además, se explorará la capacidad de la *U. ohnoi* cultivada para resistir patógenos como *Vibrio*, evaluando cómo esta resistencia puede estar vinculada a la composición bacteriana. Estos estudios no solo son esenciales para comprender la salud y productividad de los cultivos, sino que también proporcionarán información valiosa sobre posibles aplicaciones biotecnológicas derivadas de las relaciones simbióticas.

La próxima fase en esta línea de investigación requerirá enfoques bioquímicos para identificar los compuestos químicos específicos que ciertos grupos bacterianos están exudando. Esta información es crucial para entender la función de las interacciones alga-bacteria y para explorar posibles aplicaciones biotecnológicas derivadas de estas relaciones simbióticas.

LITERATURA CITADA.

- Adair, K. L., & Douglas, A. E. (2017). Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology*, 35, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.002>
- Alsufyani, T., Weiss, A., Wichard, T., (2017a). Time course exo-metabolomic profiling in the green marine macroalga *Ulva* (Chlorophyta) for identification of growth phase-dependent biomarkers. *Mar. Drugs* 15, 14
- Alsufyani, T., Califano, G., Deicke, M., Grueneberg, J., Weiss, A., Engelen, A. H., Kwantes, M., Mohr, J. F., Ulrich, J. F., & Wichard, T. (2020b). Macroalgal–bacterial interactions: identification and role of thallusin in morphogenesis of the seaweed *Ulva* (Chlorophyta). *Journal of Experimental Botany*, 71(11), 3340–3349. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa066>
- Álvarez-Borrego, J. y Álvarez-Borrego S. (1982). Temporal and spatial variability of temperature in two coastal lagoons. *CalCOFI Reports* 23, 188-197.
- Barbato, M., Vacchini, V., Engelen, A. H., Patania, G., Mapelli, F., Borin, S., & Crotti, E. (2022). What lies on macroalgal surface: diversity of polysaccharide degraders in culturable epiphytic bacteria. *AMB Express*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01440-8>
- Bondoso J, Balagu_e V, Gasol JM & Lage OM (2013) Community composition of the Planctomycetes associated with different macroalgae. *FEMS Microbiol Ecol*. doi:10.1111/1574-6941.12258.

- Bonthond, G., Bayer, T., Krueger-Hadfield, S. A., Barboza, F. R., Nakaoka, M., Valero, M., Wang, G., Künzel, S., & Weinberger, F. (2020). How do microbiota associated with an invasive seaweed vary across scales? *Molecular Ecology*, 29(11), 2094–2108. <https://doi.org/10.1111/mec.15470>
- Bobin-Dubigeon C, Lahaye M, Guillon F, Barry JL, Gallant DJ. (1997). Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp cell-wall polysaccharides. *J Sci Food Agric* 75: 341–351.
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. (2011). Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva Australis*'s *Journal*, 5(4), 590–600 .<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.164>
- Cabello-Pasini, A., Muñoz-Salazar, R., y Ward, D. H. (2003). Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* at its southern end of distribution in the North Pacific. *Aquatic Botany*, 76, 31–47. doi:10.1016/S0304-3770(03)00012-3
- Carreño A., Romero J. (2015). Establecimiento y Medición de Parcelas para el Seguimiento y Monitoreo de la Vegetación en 4 Zonas de Cundinamarca Bajo Restauración Asistida (Villapinzón, Bojacá, Granada y Usme). Universidad Distrital Francisco José de Caldas al título de Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 24-27
- Califano, G., Kwantes, M., Abreu, M. H., Costa, R., & Wichard, T. (2020). Cultivating the Macroalgal Holobiont: Effects of Integrated Multi-Trophic Aquaculture on the Microbiome of *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00052>
- Cheng, Y., Wang, H., Deng, Z., Wang, J., Liu, Z., Chen, Y., Ma, Y., Liu, B., Yang, L., Zhang, Z., & Wu, L. (2022). Efficient removal of Imidacloprid and nutrients by algae-bacteria biofilm reactor (ABBR) in municipal wastewater: Performance,

mechanisms, and the importance of illumination. *Chemosphere*, 305, 135418.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135418>

Chisholm JRM, Dauga C, Ageron E, Grumont PAD & Jaubert_JM (1996) Roots in mixotrophic algae. *Nature* 381: 565.

Collins, F. H. (1987). A Ribosomal RNA Gene Probe Differentiates Member Species of the *Anopheles gambiae* Complex. *AJTMH*.
<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/37/1/article-p37.xml>

Cruz-López, R., & Maske, H. (2014). A non-amplified FISH protocol to identify simultaneously different bacterial groups attached to eukaryotic phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 797–804. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0379-2>

Döhler, G., Hagmeier, E. y David, C. (1995). Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ¹⁵N ammonium and ¹⁵N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 30:179–87.

Dittami, S. M., Duboscq-Bidot, L., Perennou, M., Gobet, A., Corre, E., Boyen, C., & Tonon, T. (2016). Host-microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *ISME Journal*, 10(1), 51–63.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.104>

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28:350–6

- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 462–476. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12011>
- Florez, J. Z., Camus, C., Hengst, M., & Buschmann, A. H. (2017). A Functional Perspective Analysis of Macroalgae and Epiphytic Bacterial Community Interaction. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02561>
- Ghaderiardakani, F., Quartino, M. L., & Wichard, T. (2020a). Microbiome-Dependent Adaptation of Seaweeds Under Environmental Stresses: A Perspective. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.575228>
- Ghaderiardakani, F., Langhans, L., Kurbel, V. B., Fenizia, S., & Wichard, T. (2022b). Metabolite profiling reveals insights into the species-dependent cold stress response of the green seaweed holobiont *Ulva* (Chlorophyta). *Environmental and Experimental Botany*, 200, 104913. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104913>
- Goecke, F. R., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 409, 267–299. <https://doi.org/10.3354/meps08607>
- Grueneberg, J., Engelen, A. H., Costa, R., and Wichard, T. (2016). Macroalgal morphogenesis induced by waterborne compounds and bacteria in coastal seawater. *PLoS One* 11: e0146307. doi: 10.1371/journal.pone.0146307
- Gu, K., Liu, Y., Jiang, T., Cai, C., Zhao, H., Liu, X., & He, P. (2022). Molecular Response of *Ulva prolifera* to Short-Term High Light Stress Revealed by a Multi-Omics Approach. *Biology*, 11(11), 1563. <https://doi.org/10.3390/biology11111563>
- Horwitz, J.E. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC International. 15a ed. Arlington. 1018 pp.
- Ismail, A. F., Ktari, L., Ahmed, M. H., Bolhuis, H., Bouhaouala, B., Stal, L. J., Boudabbous, A., & Bour, M. E. (2018). Heterotrophic bacteria associated with the green alga

- Ulva rigida: identification and antimicrobial potential. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2883-2899. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1454-x>
- Kessler, R. W., Weiss, A., Kuegler, S., Hermes, C., & Wichard, T. (2018). Macroalgal–bacterial interactions: Role of dimethylsulfoniopropionate in microbial gardening by *Ulva* (Chlorophyta). *Molecular Ecology*, 27(8), 1808–1819. <https://doi.org/10.1111/mec.14472>
- Lachnit T, Blümel M, Imhoff JF & Wahl M (2009) Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matter more than habitat. *Aquat Biol* 5: 181–186.
- Lachnit T, Meske D, Wahl M, Harder T & Schmitz R (2011) Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environ Microbiol* 13:655–665.
- Moreira, A., Cruz, S., Marques, R., & Cartaxana, P. (2021). The underexplored potential of green macroalgae in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 5–26. <https://doi.org/10.1111/raq.12580>
- Pedregosa, Fabian, Gael Varoquaux, Alexandre Gramfort, Vincent Michel, Bertrand Thirion, Olivier Grisel, Mathieu Blondel, et al. 2011. “Scikit-Learn: Machine Learning in Python.” *The Journal of Machine Learning Research* 12: 2825–30.
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A., & Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: From microbes to ecosystems. *Microbiome*, 6(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0428-1>
- Polikovskiy, M., Califano, G., Dunger, N., Wichard, T., & Golberg, A. (2020). Engineering bacteria-seaweed symbioses for modulating the photosynthate content of *Ulva* (Chlorophyta): Significant for the feedstock of bioethanol production. *Algal Research*, 49, 101945. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101945>
- Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jorg Peplies, and Frank Oliver Glockner. 2012. “The SILVA Ribosomal RNA

- Gene Database_Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools.” *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D590–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Ren, C. G., Liu, Z. Y., Wang, X. L., & Qin, S. (2022). The seaweed holobiont: from microecology to biotechnological applications. *Microbial biotechnology*, 15(3), 738–754. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14014>
- Revilla-Lovano, S., Sandoval-Gil, J. M., Zertuche-González, J. A., Belando-Torrenetes, M. D., Bernardeau-Esteller, J., Rangel-Mendoza, L. K., Ferreira-Arrieta, A., Guzmán-Calderón, J. M., Camacho-Ibar, V. F., Muñoz-Salazar, R., & Ávila-López, M. D. C. (2021). Physiological responses and productivity of the seaweed *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) under changing cultivation conditions in pilot large land-based ponds. *Algal Research*, 56, 102316. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102316>
- Shade, A., & Stopnisek, N. (2019). Abundance-occupancy distributions to prioritize plant core microbiome membership. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.008>
- Saha, M., & Weinberger, F. (2019). Microbial “gardening” by a seaweed holobiont: Surface metabolites attract protective and deter pathogenic epibacterial settlement. *Journal of Ecology*, 107(5), 2255–2265. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13193>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.
- Singh RP, Mantri VA, Reddy CRK & Jha B (2011) Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata*. *Aquat Biol* 12: 13–21
- Singh, R. P., & Reddy, C. A. (2014). Seaweed-microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 213–230. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12297>

- Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Burke, C., Thomas, T., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2009). Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvaceas alga. *The ISME Journal*, 4(2), 301–311. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.107>
- Van der Loos, L. M., Eriksson, B. K., & Falcão Salles, J. (2019). The Macroalgal Holobiont in a Changing Sea. *Trends in Microbiology*, 27(7), 635–650. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.002>
- van der Loos, L. M., D'hondt, S., Engelen, A. H., Pavia, H., Toth, G. B., Willems, A., Weinberger, F., De Clerck, O., & Steinhagen, S. (2022). Salinity and host drive *Ulva*-associated bacterial communities across the Atlantic–Baltic Sea gradient. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.16462>
- Weiss, A., Costa, R., and Wichard, T. (2017a). Morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) induced by *Maribacter* species (Bacteroidetes, Flavobacteriaceae). *Bot. Mar.* 60, 197–206. doi: 10.1515/bot-2016-0083
- Weinberger, F., Beltran, J., Correa, J. A., Lion, U., Pohnert, G., Kumar, N., & Potin, P. (2007). Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. *Journal of Phycology*, 43(2), 235–241. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00329.x>
- Wichard, T., Charrier, B., Mineur, F., Bothwell, J. H., De Clerck, O., & Coates, J. C. (2015a). The green seaweed *Ulva*: A model system to study morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00072>
- Wichard, T. (2015b). Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00086>
- Wichard, T. (2023c). From model organism to application: Bacteria-induced growth and development of the green seaweed *Ulva* and the potential of microbe leveraging in

algal aquaculture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 134, 69–78.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.007>

Zhao, G., He, H., Wang, H., Shao, H., Guo, C., Shao, H., Jiang, Y., & Wang, M. (2022). Variations in marine bacterial and archaeal communities during an *Ulva prolifera* green tide in coastal Qingdao areas. *Microorganisms*, 10(6), 1204. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061204>

Zertuche-González, J. a., Camacho-Ibar, V. F., Pacheco-Ruíz, I., Cabello-Pasini, A., Galindo-Bect, L. a., Guzmán-Calderón, J. M. y Espinoza-Avalos, J. (2009). The role of *Ulva* spp. as a temporary nutrient sink in a coastal lagoon with oyster cultivation and upwelling influence. *Journal of Applied Phycology*, 21, 729–736. doi:10.1007/s10811-009-9408-

Zertuche-González, J.A. (1987). Tank Culture of The Red Seaweed *Eucheuma uncinatum* From the Gulf of California. *Ciencias Mar.* 13:1–18.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de rarefacción

