

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

**PELÍCULAS BACTERIANAS ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE
ADULTOS DE ERIZO MORADO "*Strongylocentrotus purpuratus*", EN
POZAS INTERMAREALES DE LA COSTA OESTE DE BAJA
CALIFORNIA.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:
MONSERRAT SANTIAGO GONZÁLEZ**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

ABRIL 2008

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

**PELÍCULAS BACTERIANAS ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE
ADULTOS DE ERIZO MORADO "*Strongylocentrotus purpuratus*", EN
POZAS INTERMAREALES DE LA COSTA OESTE DE BAJA
CALIFORNIA.**

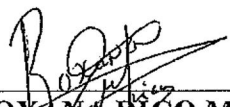
TESIS QUE PRESENTA

MONSERRAT SANTIAGO GONZÁLEZ

APROBADA POR:



DR. EUGENIO CARPIZO ITUARTE
DIRECTOR DE TESIS



DRA. ROXANA RICO MORA
SINODAL



DRA. YOLANDA SCHRAMM URRUTIA
SINODAL

DEDICADA

A mi Madre, Padre y hermanas.

A ellos que me han apoyado y motivado a conseguir mis propósitos

Para ustedes porque este es un logro más que alcanzamos juntos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eugenio J. Carpizo Ituarte por su apoyo a lo largo de este tiempo. Asimismo por compartir su experiencia, conocimientos y por las inquietudes que despierta en cada uno de los que somos sus estudiantes para que sigamos en este camino de la ciencia.

A la Dra. Roxana Rico Mora por las sus valiosas aportaciones en el trabajo, sus consejos, la motivación a lo largo de este tiempo y por ser un ejemplo de dedicación en el trabajo.

A la Dra. Yolanda Schramm Urrutia por sus aportaciones al trabajo, su disponibilidad para ayudarme y por los consejos para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Luís Enríquez Paredes por las contribuciones hechas, en cuanto al material y las técnicas que se emplearon y por su apoyo en la secuenciación de DNA de las muestras.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo: Raquel Pedrín Caballero, Paola Rodríguez Troncoso y Leopoldo Díaz Pérez, por su amistad, consejos y paciencia.

A mis amigos con los que compartí mi estancia en la maestría, por tan gratos momentos: Gabriela Alarcón Arteaga, Constanza Ricaurte Villota, Leslie Aveytua Alcázar, Astrid Montiel Boehringer, Vanesa Torres Delgado, Carlos Peña, Alberto Sánchez González, y muy especialmente a Ada de la Luz Meléndez Sánchez y Francisco J. Flores de Santiago por haber sido mi familia durante estos dos años.

Y a mis amigos y amigas que a pesar de la distancia en estos dos años, no los tengo olvidados como pareciera. Gracias por estar pendientes de mi estancia en la maestría, darme ánimo y seguir contando con su amistad: a Mariana Castillo Vellanoweth, Patricia Meza Cervantes, Sandra Mote Herrera, Silvia Guzmán Beltrán, Susana González, Marco Antonio Sánchez Guerra, Génesis Reynoso Herrera y Abraham Rosas Arellano.

A CONACYT por la beca otorgada, con el número de registro 198822, durante dos años.

A los siguientes proyectos de investigación: 1. Caracterización de películas bacterianas inductoras de la metamorfosis de erizo de mar *Strongylocentrotus* spp. De la costa de Baja California (CONACYT 47658) 2. Ecología Molecular y del Desarrollo de Invertebrados del Pacífico Mexicano y Golfo de California (Interno IIO-UABC No. 533) 3. Caracterización de las poblaciones de *Mytilus californianus* y *Pisaster ochraceus*, especies estructuradas de la comunidad del intermareal rocoso y explotadas a lo largo de la costa Pacífico de Baja California, financiado por la 10 Convocatoria UABC-571, cuyo responsable es Eugenio Carpizo Ituarte.

A la Facultad de Ciencias Marinas y el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, por la formación en ciencias que nos brindan a través de su programa de posgrado.

RESUMEN

El asentamiento y la metamorfosis en larvas de erizo de mar son procesos importantes para el reclutamiento de nuevos individuos a la población. Estos dos procesos pueden estar afectados por variables o claves ambientales: físicas, químicas o biológicas especialmente en escalas pequeñas. Estas señales ambientales estimulan una transformación radical en la morfología, fisiología, ecología y el comportamiento de una larva en su transformación a postlarva y juvenil. Dentro de las variables biológicas, es de gran importancia la formación de biopelículas bacterianas sobre diferentes sustratos en la zona del intermareal, ya que de esta manera afectan el asentamiento de larvas de una gran variedad de especies de invertebrados marinos. El objetivo de este estudio es caracterizar bioquímica y molecularmente las películas bacterianas asociadas a adultos de erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, en pozas intermareales de la costa oeste de Baja California, en donde las poblaciones de erizo morado son abundantes. Así como probar la capacidad de inducción a la metamorfosis de las cepas aisladas de las biopelículas con larvas de erizo morado. Con este objetivo, se realizaron dos muestreos en cinco sitios de la costa oeste de Baja California durante septiembre y diciembre del 2006. En la zona del intermareal se colectaron biopelículas bacterianas de diferentes sustratos, que estaban asociadas a poblaciones de erizo morado y se caracterizaron las pozas de donde fueron recolectadas. Las biopelículas fueron cultivadas en medio marino, transferidas a placas de medio marino sólido y fueron seleccionadas colonias con características morfológicas distintas entre sí. A cada cepa se le aplicaron pruebas bioquímicas básicas. Además, se realizaron pruebas moleculares, a partir de un fragmento de la secuencia del 16S rDNA. También se realizó un ensayo de inducción a la metamorfosis en larvas de erizo con algunas de las cepas ya caracterizadas. Se registró el porcentaje de larvas metamorfoseadas con las diferentes cepas que se probaron. En el muestreo de septiembre (Bajamar y Punta Baja) y diciembre de 2006 (Bajamar, Punta Baja, Eréndira, Playa los Ojitos y Playa la Esmeralda), todas las cepas aisladas a partir de las biopelículas presentaron las siguientes características fenotípicas: Gram negativas, oxidasa positiva, catalasa positiva y en su mayoría anaerobias facultativas. Se pudieron distinguir 33 cepas con características diferentes y 26 comparten características con un grupo bacteriano. Entre las cepas identificadas por pruebas moleculares destacan los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium* y *Paracoccus*, y se encontró una variación espacial en la distribución de especies bacterianas, a lo largo de la costa oeste de Baja California. El 75% de las larvas competentes de erizo morado (*S. purpuratus*), fueron inducidas a la metamorfosis por *Vibrio alginolyticus*, una cepa aislada de mejillón. El 53% de la inducción a la metamorfosis se debió a *Pseudoalteromonas flavipulchra* y otra cepa de *Vibrio alginolyticus*. Estas bacterias están asociadas a las conchas de mejillón y a erizo morado; al parecer parte de la microflora de los mantos de mejillón en la zona del intermareal, intervienen en el proceso de asentamiento y metamorfosis de erizo morado. El presente trabajo muestra, que existe variación en las claves ambientales asociadas a bacterias y que su distribución influye en los patrones de asentamiento del erizo morado a lo largo de la costa de Baja California.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	6
3 Justificación.....	11
4 Objetivos.....	12
5 Hipótesis.....	13
6 Métodos.....	14
6.1 Descripción del área de estudio: Bajamar (BM), Eréndira (ER), Punta Baja (PB), Playa los Ojitos (O) y Playa la Esmeralda (E).....	14
6.2 Recolecta de biopelículas.....	15
6.2.1 Preservación de las muestras.....	16
6.2.2 Aislamiento de cepas bacterianas.....	16
6.2.3 Pruebas bioquímicas.....	17
6.3 Extracción de DNA genómico.....	18
6.3.1 Análisis de DNA.....	18
6.4 Amplificación de 16S rDNA.....	18
6.4.1 Secuenciación de los productos PCR.....	19
6.4.2 Alineamiento de las secuencias.....	20
6.4.3 Construcción del árbol filogenético.....	20
6.5 Bioensayos de inducción a la metamorfosis con larvas de erizo morado, <i>S. purpuratus</i>	21
7 Resultados.....	23
7.1 Descripción del área de estudio.....	23
7.2 Recolecta de biopelículas.....	25

7.2.1 Muestreo en septiembre (BM y PB) y diciembre (BM, PB, ER, O y E) de 2006.....	25
7.3 Pruebas bioquímicas a las cepas aisladas.....	26
7.3.1 Cepas aisladas en septiembre: BM y PB.....	27
7.3.2 Cepas aisladas en diciembre: BM, ER y PB.....	29
7.3.3 Cepas aislada en diciembre: O y R.....	35
7.3.4 Cepas con diferente actividad metabólica.....	37
7.4 Ensayos de inducción a la metamorfosis de erizo morado.....	38
7.5 Análisis genético de las cepas con diferente metabolismo.....	41
7.5.1 Amplificación del 16S rDNA.....	41
7.5.2 Identidad genética de las cepas con secuencias de géneros o especies de bacterias marinas.....	41
7.6 Variación espacio-temporal de las especies bacterianas.....	43
7.7 Metabolismo de las especies bacterianas presentes en las pozas de marea.....	45
8. Discusión.....	48
8.1 Variación espacial de la comunidad bacteriana.....	48
8.1.2 Variación temporal en la composición bacteria.....	53
8.2 Asentamiento de invertebrados marinos mediante biopelículas monoespecíficas..	54
8.3 Distribución del erizo de mar, <i>S. purpuratus</i>	56
8.4 Identificación molecular de bacterias por 16S rDNA.....	59
9 Conclusiones.....	62
10 Anexos.....	64
11 Referencias.....	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras recolectadas en BM y PB durante septiembre de 2006.....	25
Tabla 2. Muestras recolectadas en BM, ER y PB durante diciembre de 2006.....	25
Tabla 3. Muestras recolectadas en E y O en diciembre de 2006.....	26
Tabla 4. Cepas aisladas de biopelículas asociadas al epitelio del erizo morado, <i>S. purpuratus</i>	27
Tabla 5. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a conchas de mejillón, <i>M. californianus</i>	27
Tabla 6. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a superficies rocosas.....	27
Tabla 7. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a superficies de algunas algas....	27
Tabla 8. Grupos bacterianos que se distinguen por la similitud en reacción a las pruebas bioquímicas aplicadas.....	28
Tabla 9. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas al erizo de mar, <i>S. purpuratus</i> , recolectadas en diciembre de 2006, BM, PB y ER.....	31
Tabla 10. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas a las conchas de mejillón, <i>M. californianus</i> , recolectadas en diciembre de 2006, en PB y BM.....	31
Tabla 11. Cepas obtenidas de biopelículas de diferentes algas marinas, recolectadas en diciembre de 2006, en PB, BM y ER.....	32
Tabla 12. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas a Rocas, recolectadas en diciembre de 2006, en BM y ER.....	32
Tabla 13. Grupos de cepas bacterianas, cada grupo posee un metabolismo diferente al resto.....	33
Tabla 14. Cepas aisladas de las muestras de biopelículas recolectadas en diciembre de 2006. Todas estas cepas son completamente distintas entre sí y entre los grupos bacterianos.....	34
Tabla 15. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a erizo negro, <i>A. incisa</i> , y erizo morado, <i>S. purpuratus</i> , encontradas en las pozas de marea de O y E.....	35
Tabla 16. Cepas aisladas a partir de biopelículas asociadas a algas en pozas de marea en O y E.....	35

Tabla 17. Cepas aisladas de arena (Sedimento) recolectada cerca de los erizos en E y O.....	36
Tabla 18. Cepas aisladas a partir de muestras de agua de mar en O.....	36
Tabla 19. Grupos bacterianos que se distinguen de las cepas aisladas de las muestras recolectadas en O y E.....	37
Tabla 20. Cepas aisladas de diferentes sustratos en las dos campañas de muestreo (septiembre y diciembre de 2006).....	38
Tabla 21. Secuencia de cada una de las cepas analizadas molecularmente.....	42
Tabla 22. Especies encontradas en cada uno de los sitios de muestreo en septiembre de 2006.....	44
Tabla 23. Especies encontradas en cada uno de los sitios de muestreo en diciembre de 2006.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio. Sitios de recolecta a lo largo de la costa oeste de Baja California, México.....	14
Figura 2. Método de muestreo en pozas de marea.....	15
Figura 3. Cromatograma de una de las secuencias obtenidas.....	19
Figura 4. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, <i>S. purpuratus</i> ; de mejillón, <i>M. californianus</i> ; a algunas algas y a superficies rocosas, en pozas del intermareal en BM y PB en septiembre de 2006.....	29
Figura 5. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, <i>S. purpuratus</i> ; de mejillón, <i>M. californianus</i> ; a algunas algas y a superficies rocosas, en pozas del intermareal en BM, PB, ER en diciembre de 2006.....	34
Figura 6. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, <i>S. purpuratus</i> y <i>A. incisa</i> ; a algunas algas, sedimento y en agua de mar, en pozas del intermareal en O y E en diciembre de 2006.....	36
Figura 7. Ensayo de inducción a la metamorfosis de larvas competentes del erizo morado, <i>S. purpuratus</i> , a 12, 24 y 48h de exposición a biopelículas mono-específicas.	40

Figura 8. Ensayo de inducción a la metamorfosis del erizo morado, <i>S. purpuratus</i> . Porcentaje de larvas que metamorfosearon en el último periodo de exposición a las 48h.....	40
Figura 9. Árbol filogenético de secuencias 16S rDNA (499 pb), de las cepas aisladas del erizo morado, <i>S. purpuratus</i> , y algunas aisladas de otros sustratos.....	43
Figura 10. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Extracción de DNA genómico.....	67
Figura 11. Electroforesis de agarosa 0.8%. Extracción de DNA genómico de las cepas probadas en el ensayo de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo morado, <i>S. purpuratus</i>	68
Figura 12. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR de las muestras PB1.3 y BM1.1	69
Figura 13. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos PCR de las muestras PB1.3 y BM1.1.....	70
Figura 14. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos PCR purificados de cuatro muestras de BM y una de PB.....	70
Figura 15. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR purificados de cinco muestras de PB y tres de BM.....	71
Figura 16. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR de seis muestras de BM.....	71
Figura 17. Electroforesis al 0.8%. Productos PCR de cuatro muestras de PB y cuatro de ER.....	72
Figura 18. Electroforesis al 0.8%. Productos PCR purificados de dos muestras de PB, dos BM, dos de ER y una de O.....	72

1. INTRODUCCIÓN

La distribución geográfica del erizo de mar comprende desde Alaska, EUA, hasta la isla de Cedros, en Baja California, México. En Baja California existen 4 especies de erizo: *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus*, *Centrostephanus coronatus* y *Lytechinus anamesus* o *Lytechinus pictus*; de ellas sólo las dos primeras son explotadas comercialmente. Aunque la principal especie de captura comercial fue históricamente el erizo rojo (*S. franciscanus*), a partir de 1993 el erizo morado (*S. purpuratus*) se ha ido incorporado también a las capturas comerciales (Palleiro et al., 1995).

La captura del erizo rojo se realiza en la costa oeste de Baja California, desde Playas de Tijuana (frontera con Estados Unidos) hasta Punta Blanca, Baja California. Las áreas de pesca se dividen en 4 zonas con el objeto de facilitar su administración: Zona I que comprende desde Playas de Tijuana al Puerto de Ensenada, Zona II de Punta Banda a Punta Colonet, Zona III de Punta Colonet a El Socorro y la Zona IV desde El Socorro a Punta Blanca (Salgado-Rangel et al., 2004). Se ha observado que en estas zonas el erizo morado compite por el espacio y alimento con el erizo rojo. Debido a que la pesca del erizo ha ejercido mayor presión sobre el erizo rojo, el erizo morado ha modificando su área de distribución y abundancia hacia zonas más profundas. Las poblaciones de erizo en general son influenciadas por cambios ambientales, aunque su fluctuación puede estar acompañada por diferentes factores, tales como depredación, migración, enfermedades, reclutamiento, etc. (Harrold et al., 1991 y Cota et al., 1996).

Un elemento clave en la regulación de las poblaciones de erizo es el reclutamiento de nuevos individuos a la población, vía el asentamiento y metamorfosis. El reclutamiento para muchos invertebrados marinos está compuesto por tres procesos: el aporte de propágulos (larvas), asentamiento y metamorfosis y la consecuente supervivencia y crecimiento de juveniles después del asentamiento y metamorfosis. El aporte de larvas puede culminar con la presencia de una densidad adecuada de larvas competentes en las proximidades de un hábitat adecuado. El asentamiento y metamorfosis en erizos de mar,

es la transición de larva planctónica al estadio postlarval bentónico y finalmente su transición a juvenil. El asentamiento es un proceso que involucra la búsqueda de la larva para adherirse a un sustrato adecuado y finaliza con la metamorfosis (Harrold et al., 1991 y Rodríguez et al., 1993). Esto ocurre en la mayoría de los grupos de invertebrados marinos asociados al bentos, los cuales poseen ciclos de vida complejos con estadios planctónicos y bentónicos, que ocupan hábitats espacialmente distintos (Williamson et al., 2000). Estos ciclos de vida son difásicos, debido a que incluyen una larva planctónica microscópica que es morfogenéticamente distinta a un adulto (Jackson et al., 2002).

Las larvas planctónicas están clasificadas dentro de dos grupos dependiendo de su fuente de nutrición; la larva planctotrófica se alimenta del plancton y larva lecitotrófica que no se alimenta exógenamente y habitualmente permanece en el plancton por periodos cortos. El periodo larvario comprende un estadio precompetente, en donde las larvas no requieren de estímulos para metamorfosearse y un estadio competente en el que responden a éstos (Hadfield et al., 2001). El logro de la competencia puede ocurrir dentro de los primeros minutos, hasta días (muchas larvas lecitotróficas) o pueden requerir de semanas o meses (muchas larvas planctotróficas). A partir del estadio competente, muchas larvas pelágicas retrasan la metamorfosis hasta que encuentran un sustrato adecuado (Pawlink, 1992; Hadfield et al., 2001).

En larvas planctotróficas el desarrollo de la competencia depende en gran parte de la abundancia de alimento particulado y de su edad, aunque el inicio del estadio de competencia puede variar con la estación o con los nutrientes disponibles. Algunas especies de larvas lecitotróficas son competentes al tiempo que emergen del huevo, este patrón es típico en porifera, cnidarios, briozoos, colonias de ascideos y muchos poliquetos; estas larvas se asientan después de liberarse o emerger del huevo y dispersarse en forma limitada. La competencia provee a la larva de la capacidad de permanecer viable en el plancton, por largos periodos de tiempo, sólo hasta asentarse en un sustrato adecuado (Hadfield et al., 2001).

Durante la metamorfosis la larva experimenta la pérdida de características morfológicas propias de su estado larval, así también en el momento emergen o se ponen en función estructuras características que distinguen al estadio juvenil y que son funcionales para la alimentación y movimiento hasta alcanzar la permanencia en el hábitat bentónico que le permiten llegar a adulto (Hadfield et al., 2001).

Durante la metamorfosis, ocurre una reorganización de los tejidos existentes en la larva. La diferenciación de las estructuras de la larva, derivan de células indiferenciadas que se encuentran en un costado de la larva, como es el caso del erizo de mar. En otros casos, en la metamorfosis ocurren un conjunto de eventos morfogenéticos, que incluyen una reorganización de tejidos existentes y una diferenciación de primordios. Ejemplo de ello son las larvas erizos, como ha sido descrito recientemente por Amador-Cano (2007) para el erizo blanco *L. pictus*. En muchos casos, la transición de larva pelágica a juvenil bentónico, está mediada por el constante contacto con señales inductoras ambientales (Jackson et al., 2002). Estas señales ambientales pueden ser físicas, biológicas o químicas y juegan un papel muy importante en el asentamiento y metamorfosis de larvas de invertebrados. Así como para el crecimiento del juvenil y su reproducción. Las señales ambientales son importantes en escalas espacialmente pequeñas, tales como las que se encuentran en áreas específicas o hábitat dentro de un área (Williamson et al., 2000). Estas señales ambientales o inductores, estimulan una transformación radical de la morfología, fisiología, ecología y comportamiento de las larvas a sus fases de postlarva y juvenil (Rahmani y Ueharai, 2001; Amador-Cano et al., 2006).

Las señales químicas son muy importantes para la selección de sustratos por las larvas. En la naturaleza, las señales químicas pueden interactuar con factores físicos o hidrodinámicos para inducir el asentamiento larval. Las señales químicas son moléculas inductoras transmitidas o adsorbidas a superficies y pueden asociarse con individuos específicos o a la superficie de sustratos. La capacidad de discriminar y responder a señales asociadas con diferentes sustratos bentónicos, aparentemente asegura que la

larva se asiente en un hábitat que es adecuado para el crecimiento y supervivencia del juvenil (Jackson et al., 2002).

El crecimiento de microorganismos en sustratos duros o en sedimentos, promueve el asentamiento de muchas especies. Los microorganismos se encuentran en la superficie de diferentes objetos u organismos, formando una biopelícula. Esta biopelícula se desarrolla sobre una capa de materia orgánica (Pawlik, 1992), por eso se le llama biopelícula. Estas biopelículas, inicialmente colonizadas por bacterias, están presentes en aguas marinas incluyendo ecosistemas polares, templados y tropicales, así como en ambientes de agua dulce. La formación de biopelículas tiene lugar cuando una bacteria se fija a una superficie, seguida de su multiplicación y producción de exopolímeros. Los exopolímeros forman una delgada capa de materia orgánica, esta tiene como función atrapar nutrientes de la columna de agua y provee protección para los microorganismos que viven dentro de la biopelícula (Gu et al., 1996 y Harrison et al., 2006).

La inducción a la metamorfosis por biopelículas bacterianas ha sido demostrada para diversos grupos como cnidarios (*Acropora microphthalma*), poliquetos (*Janua brasiliensis*, *Hydroides elegans*), balanos (*Balanus amphitrite*), briozoos (*Bugula neritina*), moluscos (*Phestilla sibogae*) (Carpizo-Ituarte y Hadfield 1998; Gu et al., 1996; Hadfield y Koehl, 2004 y Webster et al., 2004) y equinodermos (*Strongylocentrotus* spp) (Pearce y Scheibling, 1990), incluyendo las especies de erizo de mar que se distribuyen en las costas de Baja California, México (Rico-Mora et al., 2005 y Díaz-Pérez, 2006).

A pesar de que existen muchos trabajos sobre asentamiento y metamorfosis de larvas de invertebrados marinos de diversas especies en condiciones de laboratorio, poco se sabe acerca de las bacterias inductoras y su papel en el medio ambiente marino. ¿Cuáles bacterias están actuando como inductoras en las larvas de erizo morado, *S. purpuratus*?, especie de erizo de mar que tiene una amplia distribución en las costas de Baja California. Esta pregunta es interesante para conocer si hay varias especies bacterianas

inductoras de la metamorfosis en esta especie, que modulen su proceso de reclutamiento, en los diversos sitios a lo largo de la costa oeste de Baja California.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar las biopelículas bacterianas que están asociadas a sitios que presentan gran abundancia de erizo morado. Esto con la finalidad de comparar la composición bacteriana en estos sitios, con las biopelículas que se han obtenido en condiciones de laboratorio. Además de verificar si las cepas que resultan inductoras en condiciones controladas, se asocian con las poblaciones de erizo en el océano.

2. ANTECEDENTES

En ambientes marinos las larvas de muchos invertebrados marinos tienen la capacidad de encontrar sustratos adecuados sobre los cuales se asientan y metamorfosean. Estos procesos complejos están determinados por la interacción de factores bióticos y abióticos que operan a diversas escalas tanto espaciales como temporales (Rodríguez et al., 1993).

El proceso de asentamiento y metamorfosis de las larvas de muchas especies está influenciado por señales físicas, químicas o biológicas. Algunas de las señales físicas son: el flujo de agua, la presión, la temperatura, la intensidad luminosa, relajación de la surgencia, ondas internas, etc; químicas como son: los inductores naturales o inductores artificiales y las biológicas como: bacterias, macrofauna, de comportamiento larval, específicas para las larvas de invertebrados marinos bentónicos. El proceso de asentamiento requiere no sólo que la larva se encuentre en el sitio adecuado, sino que además los patrones espaciales a microescala (en centímetros), conjunten la interacción de procesos físicos, respuestas químicas y señales biológicas, para favorecer y promover la metamorfosis (Morgan et al., 2000; Williamson et al., 2000; Harder et al., 2002 y Jackson et al., 2002).

En diversos estudios se ha encontrado que el asentamiento de larvas de algunos invertebrados marinos, está mediado por consorcios de microorganismos y/o biopelículas. Estas películas bacterianas han sido consideradas como importantes en el asentamiento y metamorfosis de diversos grupos de invertebrados marinos como: poliquetos (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Unabia y Hadfield, 1999), corales escleractíneos (Webster et al., 2004), balanos (Chen et al., 2007), cangrejos (Rodríguez y Epifanio, 2000), briozoarios (Dahms et al., 2004), ascidios (Jackson et al., 2002) y equinodermos (Johnson et al., 1991).

Las biopelículas de ambientes marinos son sistemas dinámicos que exhiben una heterogeneidad espacial y temporal. Éstas están compuestas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, diatomeas, algas) y materia orgánica adsorbida. Los conglomerados de células que integran la biopelícula se organizan en comunidades completas con microcolonias funcionales que llevan a cabo procesos metabólicos complejos. Asimismo, estas comunidades pueden enfrentarse a cambios en su composición y densidad de especies, por las condiciones ambientales que pueden cambiar con la marea, espacial y temporalmente (Shikuma y Hadfield, 2006).

La actividad inductora de las biopelículas bacterianas ha sido atribuida a diferentes compuestos, entre los que se reportan: metabolitos secundarios, exopolímeros bacterianos (glicoproteínas, polisacáridos, glicolípidos, D-glucosa) y aminoácidos disueltos (Harder y Qian, 1999; Hadfield y Paul, 2001; Harder et al., 2002). Aunque también las biopelículas puede ser que indiquen una iniciación de alimento, hábitat preferente para las larvas y probablemente que la superficie pueda estar sumergida el tiempo suficiente para que el organismo madure, lo que estimula al asentamiento larval (Shikuma y Hadfield, 2006).

Hay diversos estudios basados en experimentos, que tienen la finalidad de explicar la respuesta a la señal de inducción dada por biopelículas bacterianas y de qué manera afecta la metamorfosis en las larvas de invertebrados marinos. Una de las especies en la que se ha documentado lo anterior es el poliqueto, *Hydroides elegans*. En diversos experimentos, se observó que las larvas se metamorfosean por completo en superficies con la formación previa de una biopelícula y que la respuesta de inducción al asentamiento se ve afectada por la presencia de ciertas cepas bacterianas presentes en la biopelícula. La mayoría de las bacterias aisladas han resultado ser bacilos Gram negativos. Lo anterior indica que las bacterias Gram negativas, juegan un papel importante en el proceso del asentamiento larval (Unabia y Hadfield, 1999).

En estudios posteriores, de mayor detalle, se confirmó que las bacterias Gram negativas tienen un papel importante como señal de asentamiento larval. Lau y Qian en 2001 realizaron bioensayos de asentamiento con larvas competentes de *H. elegans*, donde observaron que dos biopelículas bacterianas mono-específicas de *Roseabacter* sp. y una α -subclase *Proteobacteria* fueron altamente inductoras. Lo anterior sugiere que la señal para el asentamiento larval está dada por sustancias producidas por las bacterias que pueden tener características en común, siendo los polímeros de alto peso molecular los que pueden estar involucrados.

Por otra parte Shikuma y Hadfield (2006) mostraron un aumento en el porcentaje de larvas de *H. elegans* metamorfoseadas con biopelículas de 2 a 12 días de edad. El 25% de las larvas fueron inducidas a la metamorfosis por una biopelícula de 4 días de edad, incrementando las tasas de metamorfosis a 86% con biopelículas de 6 días de edad y, al 99% con las biopelículas de 6 y 12 días de edad. Estos autores concluyeron que existe una fuerte correlación entre la densidad bacteriana de la biopelícula, el porcentaje de asentamiento de *H. elegans* y la edad de la biopelícula. Este mismo efecto se ha visto en biopelículas desarrolladas en agua de mar filtrada y agua sin filtrar, donde las biopelículas fueron probadas con larvas de *Fistulobalanus albicostatus*. Las biopelículas que se probaron tenían 1, 5, 9 y 15 días de formación. Lo que observaron fue que éstas afectan de diferente manera el asentamiento de las larvas cypri, ya que se obtuvo mayor número de larvas asentadas sobre biopelículas de 15 días de edad (Chen et al., 2007).

Otro componente importante de las biopelículas marinas, son las diatomeas con las que también se ha probado su efecto en el asentamiento de larvas de *H. elegans*. Harder et al. (2002) aislaron de biopelículas naturales, diatomeas bentónicas y a partir de éstas desarrollaron biopelículas mono-específicas, las cuales se probaron con larvas de *H. elegans*. Los porcentajes de asentamiento obtenidos fueron variables, debido a que las biopelículas mono-específicas presentaron contaminación por bacterias. De tal manera

que no pudieron establecer el papel de las diatomeas y su correlación con el porcentaje de asentamiento larval.

Años más tarde, se trató de controlar el crecimiento de la parte bacteriana en las biopelículas de diatomeas y se obtuvieron resultados similares. Este estudio fue realizado por Dahms et al. (2004), donde se probó el efecto de varias biopelículas mono-específicas. Estas fueron tres cepas bacterianas, de diatomeas, una biopelícula natural de 5 días de edad y una con mezcla de bacterias y diatomeas, las cuales se probaron con larvas del briozooario, *Bugula neritina*. Los resultados mostraron que la biopelícula de *Pseudoalteromonas* sp. y la biopelícula natural estuvieron asociadas a un bajo asentamiento (cerca del 50%), mientras que una cepa de α -proteobacteria, *Vibrio* sp. y la diatomea del género *Amphora* sp. inducen altos niveles de asentamiento. Asimismo, las biopelículas bacteria-diatomeas favorecieron cambios en el asentamientos de *B. neritina*, sin embargo, no fue acumulativo el efecto de inducción por parte de los dos componentes de la biopelícula.

En corales escleractíneos son pocos los trabajos en los que se ha probado el efecto de biopelículas naturales. Webster et al. (2004) realizaron un bioensayo donde expusieron larvas competentes del coral, *Acropora microphthalma* a películas bacterianas de diferente edad de formación. En el bioensayo obtuvieron que los porcentajes de larvas metamorfoseadas aumentaban con la edad de la biopelícula, con un máximo de 41% de larvas metamorfoseadas con biopelículas de entre 4 y 8 semanas. Estos autores reportaron, larvas asentadas y metamorfoseadas sobre biopelículas asociadas a algas coralinas calcáreas (ACC), por lo que se infiere que estas ACC pueden jugar un papel importante en desencadenar la metamorfosis. En este sentido, Pearce y Scheibling (1990) encontraron que las algas: *Lithothamnium glaciale*, *Phymatolithon laevigatum*, *P. rugulosum* y *Corallina officinalis*, eran capaces de inducir a la metamorfosis a un porcentaje mayor al 85% de larvas del erizo *Strongylocentrotus droebachiensis*. Este resultado lo obtuvieron utilizando extractos acuosos de algas, lo que indica que el factor

de inducción es químico. Esto debido, a que el tratamiento con *L. glaciale* en presencia de antibióticos no afectó la tasa de metamorfosis de las larvas.

Recientemente Díaz-Pérez (2006) evaluó la capacidad inductora de varios tipos de biopelículas en larvas del erizo blanco, *Lytechinus pictus*. Las biopelículas fueron generadas en presencia de adultos de la misma especie, asociadas a adultos del erizo morado, *S. purpuratus*, asociadas a otros invertebrados y las que se desarrollaron al exponer una superficie en agua de mar filtrada. Sus resultados mostraron que el efecto inductor es específico, puesto que la respuesta más intensa de inducción a la metamorfosis de las larvas se dio en las biopelículas asociadas a sus conoespecíficos (88% de metamorfosis). Asimismo, se observó que las cepas bacterianas aisladas de estas biopelículas, tenían una capacidad inductora diferencial dependiendo de la edad y la especie bacteriana utilizada.

Actualmente, aun se desconoce qué estímulos son los que intervienen en la inducción a la metamorfosis en el océano y qué determina, el reclutamiento de la especie a lo largo de la costa. Esto hace de gran interés entender la dinámica de las claves ambientales, ecológicas y biológicas que están involucradas en este proceso. Por ello, el presente estudio, documenta qué cepas bacterianas están actuando como inductoras en el medio ambiente, cuál es su distribución espacial a lo largo de la costa oeste de Baja California, así como su variabilidad estacional a lo largo de la costa.

3. JUSTIFICACIÓN

El erizo morado es una de las especies que forma parte de muchas comunidades marinas, ellos limitan la biomasa algal y son presa de muchos depredadores. Su importancia radica en que éstos son parte de un delicado balance entre el pastoreo y la productividad de mantos algales. Por ello permiten la alternancia de ambientes donde hay un gran crecimiento de los mantos de macroalgas y sitios donde la proliferación de erizo ha causado la muerte masiva de estos mantos (Pearce, 2006). Es importante conocer las variables ambientales y biológicas, así como las variables espacio temporales que influyen en el asentamiento y la metamorfosis de larvas del erizo morado, *S. purpuratus*. A partir de su conocimiento, se podrán entender mejor los mecanismos que regulan la distribución de esta especie. De tal manera que se pueda realizar un mejor manejo de la actividad pesquera, de los sitios donde las poblaciones de erizo morado son abundantes y pueden ser fuente de larvas y sin que el reclutamiento de juveniles se vea afectado por la actividad pesquera en la zona. Un claro ejemplo donde se puede llevar a cabo esta actividad, es en los extensos mantos de *Macrocystis pyrifera*, su principal fuente de alimento de esta especie. El erizo morado se alimenta del estipe de esta alga parda, provocando que éste se desprenda. De manera que si hay una sobrepoblación de erizo morado, *S. purpuratus*, en poco tiempo estos mantos de *Macrocystis pyrifera* se verán afectados y con ello otros organismos que se alimenten de ella, como es el caso de abulón y el erizo rojo, *S. franciscanus*.

Si existe una pesca controlada de erizo morado, es probable que las poblaciones de erizo rojo, *S. franciscanus*, se vean favorecidas y que éste recupere espacio. Pues desde hace años sus poblaciones se vieron desplazadas por el erizo morado debido a la sobrepesca. El que el erizo rojo aumente su población, ayudaría a que esta especie vuelva ser un recurso pesquero de gran importancia económica en Baja California, para la exportación a Japón. Pues es en este país oriental, donde la gónoda del erizo es muy apreciada por su sabor. Por último, es posible que se pueda sugerir una pesca alterna del erizo morado y erizo rojo en determinadas épocas del año, tomando en cuenta los

sitios de su mayor distribución. Lo que permitirá que no sean afectas ambas poblaciones por su pesca, durante la temporada de reproducción ambas especies.

4. OBJETIVOS

General:

Caracterizar bioquímica y molecularmente las películas bacterianas asociadas a sustratos donde se encuentran en abundancia adultos de erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, a lo largo de la costa oeste de Baja California.

Particulares:

1. Caracterizar las pozas intermareales del área de estudio: descripción biótica y abiótica.
2. Aislar películas bacterianas de diferentes sustratos en cinco lugares de la costa oeste de Baja California.
3. Identificar por medio de pruebas bioquímicas las cepas bacterianas obtenidas de los cultivos.
4. Identificar cada cepa bacteriana por el análisis del 16S rDNA.
5. Probar la capacidad de inducción con larvas de erizo morado de las cepas aisladas de biopelículas obtenidas en el campo.
6. Comparar la capacidad de inducción a la metamorfosis de las cepas aisladas en campo, con las que se han reportado como inductoras de la metamorfosis, en condiciones de laboratorio y se mantienen en el cepario de bacterias del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO-UABC.

5. HIPÓTESIS

Dado que en la costa oeste de Baja California, donde el erizo morado es abundante y debido a las diferencias en características (físicas, químicas y biológicas) de la zona intermareal y/o submareal, es posible que exista una variación espacial y temporal en la composición de bacterias en esta zona que influya en la distribución espacial de los reclutas de erizo morado a nivel de microescala, a lo largo de la costa oeste de Baja California.

Es posible que las mismas especies de bacterias inductoras de la metamorfosis del erizo morado que han sido aisladas en condiciones de laboratorio estén presentes en el campo, debido a que la señal de inducción a la metamorfosis proviene de especies bacterianas específicas para las larvas de esta especie de erizo.

6. MÉTODOS

6.1 Descripción del área de estudio

Se realizaron dos muestreos en cinco sitios de la costa oeste de Baja California, México: Bajamar (**BM**) ($31^{\circ}58'49''\text{N}$, $116^{\circ}47'38''\text{W}$), Ejido Eréndira (**ER**) ($31^{\circ}16'41''\text{N}$, $116^{\circ}22'16''\text{W}$), Punta Baja (**PB**) ($29^{\circ}57'15''\text{N}$, $115^{\circ}48'35''\text{W}$), Playa los Ojitos (**O**) ($28^{\circ}31'16''\text{N}$, $114^{\circ}04'43''\text{W}$) y Playa la Esmeralda (**E**) ($28^{\circ}30'54''\text{N}$, $114^{\circ}04'31''\text{W}$) (**Figura 1**). El primer muestreo se llevó a cabo en septiembre de 2006, este fue de prospección, en los sitios fueron **BM** y **PB**. El segundo muestreo se realizó en diciembre del mismo año en los cinco sitios (**BM**, **ER**, **PB**, **O** y **E**).

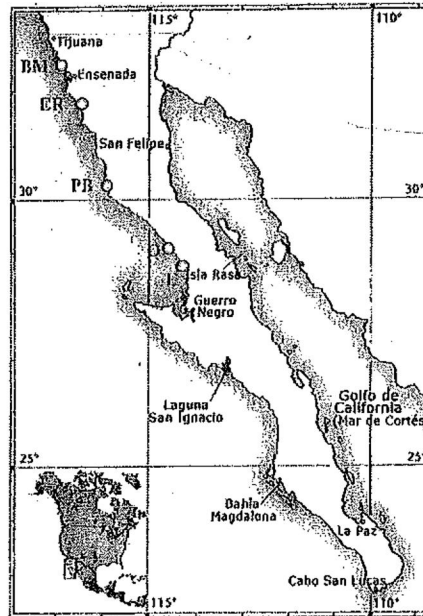


Figura 1. Área de estudio. Sitios de recolección a lo largo de la costa oeste de Baja California, México. Los sitios están ubicados con un punto color rojo, estos son: **BM**, **ER**, **PB**, **O** y **E**.

En cada uno de los sitios se realizaron mediciones puntuales de parámetros físico-químicos incluyendo pH, temperatura y salinidad. Para lo cual se utilizaron un potenciómetro, un termómetro y un refractómetro (vital sine modelo SR-6) respectivamente. Asimismo, se tomaron mediciones del largo, ancho y profundidad de cada una de las pozas para hacer una aproximación de sus dimensiones en cada uno de los sitios de muestreo. En estas pozas se recolectaron muestras de diversos sustratos.

Además, se estimó la densidad de erizo morado, mejillón, algas marinas y sustrato rocoso, utilizando cuadrantes (50 cm x 50 cm) dentro de las pozas de marea. Para realizar dicha estimación se tomaron en cuenta algunas de las especificaciones mencionadas por Murray et al. (2002) para el estudio de intermareal rocoso. Estas especificaciones consistieron en utilizar una combinación de líneas-transecto y cuadrantes para evaluar densidad y cobertura de especies en cada una de las pozas. Las pozas se dividieron por líneas-transecto a lo largo y a lo ancho cada 2 m, de tal manera que la poza quedara dividida en cuadrantes de 2 x 2 m. Por medio de números al azar se ubicaron cuatro cuadrantes de 50 x 50 cm, para así referir a 1 m² los datos de densidad y cobertura obtenidos (**Figura 2**).

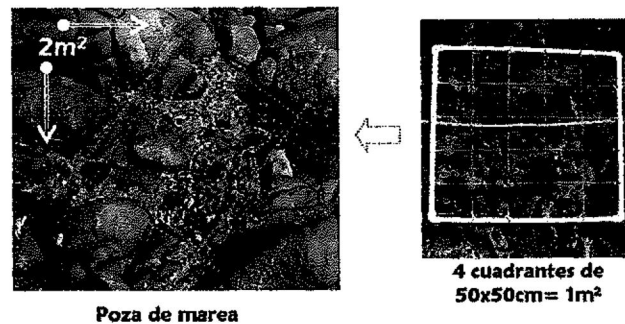


Figura 2. Método de muestreo en pozas de marea. Se dividió cada poza mediante líneas-transecto de 2 x 2 m a lo largo y ancho; por cada poza se tomaron datos de cuatro cuadrantes de 50 x 50 cm.

6.2 Recolecta de biopelículas

En los sitios de muestreo (**BM, ER, PB, E y O**), se recolectaron muestras de biopelículas naturales asociadas a diferentes sustratos. La finalidad de que se recolectaran muestras en sitios al norte de la costa (**BM, ER y PB**) y en sitios al sur (**O y E**), fue para conocer la variabilidad espacial de especies bacterianas a lo largo de la costa de Baja California.

Los sustratos muestreados fueron el epitelio del erizo morado, *S. purpuratus*, del erizo rojo, *S. franciscanus* y del erizo negro, *Arbacia incisa*, la superficie de diferentes algas

marinas, agua de mar, sedimento y rocas; todos estos se encontraban dentro de las pozas de marea. Estas muestras fueron tomadas con ayuda de un hisopo estéril, haciendo un raspado de la superficie del organismo, alga o roca. Previo a la toma de la muestra se realizó una limpieza de la superficie a muestrear con agua de mar esterilizada para eliminar los restos de materia orgánica de su superficie. Una vez tomada la muestra se depositó sólo la punta del hisopo dentro de un tubo de centrifuga de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo caldo marino (Difco), a pH 7.6. Para la recolecta de sedimento se tomó un poco del fondo de la poza, con una espátula previamente desinfectada con etanol, y éste se depositó dentro del tubo con medio de cultivo marino. Para el caso en el que se recolectaron muestras de agua de mar, se tomó aproximadamente 1 mL con ayuda de una pipeta Pasteur (previamente esterilizada) y al igual que las demás muestras, se depositó en el tubo con medio de cultivo marino. Todas las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente, hasta ser transportadas al laboratorio de Ecología y Biología y del Desarrollo de Organismos Marinos del IIO-UABC.

6.2.1 Preservación de las muestras

Una vez en el laboratorio, los cultivos bacterianos fueron preservados en glicerol, a una concentración final del 70%. Las muestras fueron almacenadas por duplicado a -20°C . Con este método se criopreservaron los cultivos de biopelículas naturales recolectadas en pozas de marea y de cada una de las cepas que se aislaron de dichos cultivos.

6.2.2 Aislamiento de cepas bacterianas

Para aislar las cepas, se tomaron 100 μL del cultivo criopreservado, con los que se inocularon 10 mL de medio de cultivo caldo marino a pH 7.6. Este inóculo fue incubado en agitación continua a 150 rpm y a temperatura ambiente (25°C). Después de 12 h se realizaron diluciones del cultivo a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en agua de mar esterilizada. De cada dilución se sembraron 100 μL en placas de medio agar marino, y también se incubaron a temperatura ambiente por 12 h.

De los cultivos generados, se seleccionaron las colonias diferentes, distinguiéndolas con base en la forma de la colonia, color y tamaño. Estas colonias se traspasaron a una nueva placa de medio agar marino a pH 7.6, con la ayuda de un asa de siembra en forma de estría, para verificar que las cepas estuvieran puras. La asignación de claves para cada una de las muestras recolectadas en septiembre fue dada de la siguiente manera: Primero se hace referencia al sitio de muestreo (Bajamar, **BM**; Punta Baja, **PB**), el número uno hace referencia al primer muestreo en estos sitios y el siguiente número 1-10 es el número de cepa aislada. En el caso del muestreo de diciembre, las claves fueron asignadas del siguiente modo: Primero se tiene el sitio de muestreo (Bajamar, **BM**; Punta Baja, **PB**; Eréndira, **E**; Playa los Ojitos, **O** y Playa la Esmeralda, **E**), a continuación se tiene el número de poza de la cual se tomó la muestra (uno al cuatro), posteriormente el número de muestra tomada en esa poza y por último el número de colonia aislada de esa muestra (uno al seis).

6.2.3 Pruebas bioquímicas

Una vez purificadas, las cepas se caracterizaron fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas convencionales que incluyeron: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, movilidad, oxidación/fermentación, producción de indol, requerimientos de NaCl de 0, 6 y 8%, Rojo de Metilo (MR) y Voges Proskauer (VP), utilizando como medio basal caldo marino a pH 7.6 (Hansen y Sørheim, 1991). Asimismo, se realizaron pruebas de crecimiento en medios TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) y Mc Conkey (indicador de pruebas entéricas). Posteriormente, se hizo la descripción del metabolismo bacteriano con base en su actividad enzimática, en referencia de los diferentes sustratos a que fueron expuestas las bacterias (*Ver anexo A*). Por último, las cepas que resultaron con diferente actividad metabólica, así como las que formaron parte de un grupo de cepas con las mismas características fenotípicas fueron consideradas para su posterior análisis genético.

6.3 Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA, las cepas se cultivaron en medio caldo marino a pH 7.6 y se incubaron 12 h aproximadamente a 150 rpm. Posteriormente, el DNA genómico se extrajo mediante el método descrito por Marmur (1961), con algunas modificaciones (*Ver anexo B*).

6.3.1 Análisis de DNA

El DNA extraído se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, las muestras se dejaron migrar a través del gel durante 1.5 h a 80 V. Posteriormente, el gel fue inmerso en una solución con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. El DNA fue visualizado con ayuda de un transiluminador de luz UV. En el caso de los productos de PCR, se utilizaron marcadores de peso molecular (Invitrogen) que corrieron en la electroforesis paralelos a las muestras, con el objetivo de estimar el tamaño de los fragmentos de DNA.

6.4 Amplificación de 16S rDNA

La amplificación del gen 16S rDNA se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando DNA genómico de las cepas bacterinas que resultaron de interés por sus características fenotípicas. Las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes: la desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos consistentes de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min, y 72°C por 1 min; con una extensión del último paso consistente de 72°C por 7 min. Los primers utilizados son complementarios al 16S rRNA de *Escherichia coli*: 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3') posición 27-46, 1522R (5'-AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA- 3') posición 1502-1522 y 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3') posición 518-534 (Lee et al., 2003) (*Ver anexo C*). El juego de primers 27F y 1522R amplifican un fragmento de 1500 pb aproximadamente, el juego 27F y 518R amplifican un

fragmento de 500 pb. Para la purificación de los productos PCR se utilizó el kit “rapid PCR Purification Systems” (Merligen bioscience, Inc).

6.4.1 Secuenciación de los productos PCR

La reacción de secuenciación se preparó según las especificaciones de SeqXcel DNA sequencing service (<http://www.seqxcel.com/>). En un volumen de 12 μ L, la concentración del producto de PCR fue de 20 a 30 ng por 100 pb. Las muestras se procesaron con un kit para secuenciación (BigDye® Terminador cycle sequencing kit) y se purificaron de acuerdo a los protocolos de “Biosystems DNA sequencing” (de Biosystem).

De cada uno de los productos de PCR obtenidos, sólo se secuenció la cadena directa utilizando el primer 27F. Se secuenciaron la cadena directa y la reversa de dos productos PCR, para verificar la limpieza de la secuencia. Los cromatogramas presentaron bases ambiguas (N) sólo en los extremos de la secuencia, y éstos se eliminaron antes de su análisis. Por lo tanto, sólo se secuenció una de las cadenas del resto de los productos PCR (*Ver anexo D*).

Una vez obtenidas las secuencias de los productos PCR, se analizaron sus cromatogramas para verificar que en la señal de cada uno de los nucleótidos se observara un pico bien definido (**Figura 3**).

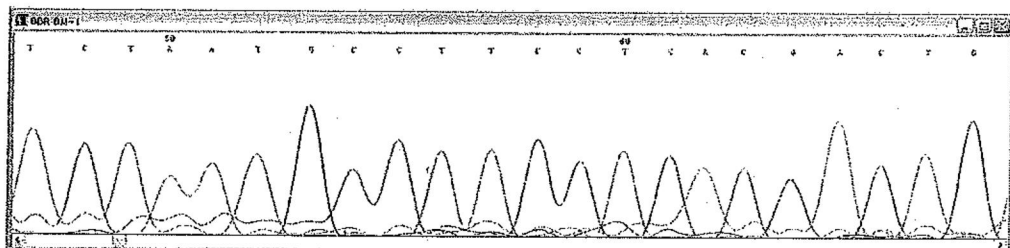


Figura 3. Cromatograma de una de las secuencias obtenidas.

6.4.2 Alineamiento de las secuencias

Una vez que se tuvo la secuencia de los productos de PCR, se prosiguió a realizar un alineamiento o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de esta secuencia con una base de datos de secuencias nucleotídicas. Este alineamiento se realizó en la página web de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y para ello se usó la opción “nucleotide Blast” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se seleccionaron las secuencias que presentaron mayor porcentaje de identidad con el gen 16S rDNA de bacterias. Los resultados permitieron establecer la identidad de las cepas a nivel de género y/o especie, incluyendo el número de acceso a esa secuencia nucleotídica, descripción general sobre la secuencia y porcentaje de identidad. Una vez obtenida la identidad de las cepas al nivel de género o especie, información que se adquirió previamente en el GenBank, se procedió a hacer un alineamiento de todas las secuencias objetivo, con secuencias conocidas del 16S de rRNA de especies y/o géneros de bacterias marinas, por medio del programa UltraEdit-32 Professional Tex/HEX editor versión 4.10 (<http://www.idmcomp.com/>).

6.4.3 Construcción de árboles filogenéticos

Para construir los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (<http://www.megasoftware.net/>), para lo cual se abrió en este programa el archivo realizado en el programa ultraEdith-32. Una vez que se tuvo el alineamiento en este programa se usó la característica “maximum composite likelihood method”, para estimar la sustitución nucleotídica. Posteriormente se utilizó la opción “bootstrap test the phylogeny” (remuestreo) aplicando un “Neighbor-Joining, model: “Nucleotide maximum composite likelihood”, en donde las relaciones más cercanas entre las secuencias objetivo y secuencias de especies bacterianas se muestran por la formación de grupos o cluster de acuerdo con Tamura et al. (2007).

6.5 Bioensayos de inducción a la metamorfosis con larvas de erizo morado

Se realizó un ensayo para evaluar la capacidad inductora de la metamorfosis de las cepas aisladas. Para este ensayo se utilizaron 15 cepas bacterianas, las cuales fueron cultivadas en medio caldo marino (Difco) a pH 7.6 y se incubaron por 12 h a 25°C en agitación continua (150 rpm). Pasado el tiempo de incubación de los cultivos se midió la DO (densidad óptica) a 260 nm, para medir la concentración de células/mL, hasta que la concentración fuera de 10^8 células/mL. Esta concentración fue utilizada como estándar para formar las películas bacterianas en las cajas de pozos múltiples (multiwell, Falcon) donde se realizó el experimento.

Con cada uno de estos cultivos bacterianos se inocularon 5 mL de medio caldo marino por triplicado, a una concentración final de 10^7 células/ml en suspensión. Para este procedimiento se usaron cajas de pozos múltiples. Los cultivos se incubaron por 12 h a 25°C sin agitación, para permitir la formación de la biopelícula monoespecífica. Después del tiempo de incubación se retiraron los 5 mL de medio caldo marino y se sustituyeron por 5 mL de agua de mar previamente esterilizada, como lo indican Unabia y Hadfield (1999). Posteriormente, en cada uno de los pozos se colocaron de 15-20 larvas competentes de erizo morado, *S. purpuratus* de 23 días de edad, las cuales fueron expuestas a las diferentes biopelículas monoespecíficas. En el experimento se incluyeron dos controles, uno con agua de mar filtrada y esterilizada y otro con KCl (100 mM). El primero se utilizó como control negativo para evaluar metamorfosis espontánea de las larvas y el segundo, como control positivo para evaluar su capacidad de respuesta a estímulos para metamorfosearse. En este último, se mantuvieron las larvas por 15 min, para después substituir la solución de KCl por agua de mar filtrada de acuerdo con lo descrito por Carpizo-Ituarte et al. (2002). Por último, se evaluó el porcentaje de larvas metamorfoseadas a las 12, 24 y 48 h de exposición a las biopelículas monoespecíficas. Las larvas se consideraron metamorfoseadas cuando presentaron la morfología característica del organismo juvenil, que se distingue por la

presencia de las espinas y los pies ambulacráles, como lo señalan Carpizo-Ituarte et al. (2002).

7. RESULTADOS

7.1 Descripción del área de estudio

La zona del intermareal en la costa oeste de Baja California se caracteriza por la formación de pozas de marea, en donde se puede encontrar una gran variedad de invertebrados marinos, microalgas, macroalgas y peces.

A lo largo de la costa norte se puede observar en la zona del intermareal rocoso, bancos de mejillón, *Mytilus californianus* y en ellos se pueden encontrar erizos de mar de la especie *S. purpuratus* y en menor abundancia de *S. franciscanus*. También se encontraron estrellas de mar, *Pisaster ochraceus*; anémonas, *Anthopleura xanthogrammica* y *A. elegantísima*; moluscos como *Lottia gigantea* y *Acantina lugubris*; diversas especies del género *Littorina*, el depredador de mejillón *Nucella* sp. y varias especies de cirripedios que incluyen grupos de *balanos* y *percebes*. Entre las algas marinas más comunes se encuentran *Lithophyllum proboscideum*, *Lithothamnium californicum*, *Corallina vancouveriensis*, *Silvetia compressa*, *Sargassum muticum*, *Bociella plumosa*, *Egrelia menziensis*, *Ulva lactuca*, *Padina durviade*, *Giffordia* sp. y el pasto marino del género *Phylospadix* spp.

En los sitios ubicados al norte de Baja California, la mayor densidad de erizo morado se encontró en Punta Baja, donde se cuantificaron hasta 280 erizos por m². El segundo sitio con mayor abundancia del erizo morado fue el Ejido Eréndira, con densidades de 170 m² y por último en Bajamar con 70 organismos por m². En los sitios al sur no es abundante pues raramente se observan de tres a cinco organismos de esta especie.

En cuanto a la temperatura dentro de las pozas de marea ésta fue de 17°C en Bajamar, 19°C en Ejido Eréndira y 20°C en Punta Baja, Playa los Ojitos y Playa la Esmeralda. El pH también varío, en Bajamar y Eréndira éste fue de 8.3 con salinidad de 34 ppm en ambos sitios. Mientras que en las pozas de marea en Punta Baja el pH fue de 7.8 con

una salinidad de 34.6 ppm. En las pozas de marea en Playa los Ojitos y Playa la Esmeralda, el pH fue de 8.1 con salinidad de 34 y 35.5 ppm, respectivamente.

Las pozas de marea en Bajamar estuvieron formadas en un 100% de sustrato rocoso y las rocas están cubiertas principalmente por algas rojas calcáreas, entre las que destacaron *L. proboscideum* y *C. vancouveriensis*. En menor abundancia se encontró *B. plumosa*. Para Punta Baja, las pozas de marea están conformadas en un 30% aproximadamente de sustrato rocoso y 70% de sustrato arenoso, el cual se deposita en el fondo de la poza. Las algas predominantes en las pozas de este sitio fueron *L. proboscideum* y *L. californicum*. En el caso del Ejido Eréndira las pozas están constituidas en un 40% de sustrato rocoso, aunque en algunas llega a ser el 100%, y con la mayor abundancia de *L. proboscideum*. Las pozas que se encontraron más cercanas a sitios donde la arena es abundante, mostraron un mayor depósito de arena en el fondo de las mismas. En estos casos los erizos, cuando estuvieron presentes, se encontraron adheridos a las paredes de las pozas y rodeados de algas rojas costrosas como *L. proboscideum* y *L. californicum*.

En los sitios localizados más al sur de la costa oeste de Baja California, que incluyen Playa los Ojitos y Playa la Esmeralda, las pozas se encontraron asociadas a sitios donde era más abundante la arena y por lo tanto una mayor superficie de las mismas, se encontraba cubierta por arena. En estos sitios no se encontraron poblaciones abundantes de erizo morado, y aparentemente empieza a ser desplazado por el erizo negro *A. incisa*. Sin embargo, el erizo negro tampoco es abundante pues sólo se encontraron 4 erizos negros en playa los Ojitos y 16 organismos en Playa la Esmeralda. En estas dos últimas zonas, las pozas se caracterizaron por la presencia de pastos marinos del género *Phylospadix* spp., que rodea el borde de las pozas. Además, los bancos de mejillón no son tan grandes como los que se encuentran en las poblaciones más al norte, a partir de Punta Baja.

7.2 Recolección de biopelículas

7.2.1 Muestreo en septiembre (BM y PB) y diciembre (BM, PB, ER, O y E) de 2006

Los sustratos de los cuales se obtuvieron las muestras de bacterias se presentan en dos tablas: en la **Tabla 1** se integran los datos del muestreo de septiembre y en la **Tabla 2** los de diciembre. Estas contienen la información sobre los sitios de muestreo, pozas en las que se muestrearon las biopelículas y el sustrato del cual fueron tomadas las muestras, así como el código de cada cepa aislada en cada muestra.

Tabla 1. Muestras recolectadas en BM y PB durante septiembre de 2006. Las claves utilizadas indican el primer muestreo (primer número) y número de colonia aislada de esa muestra recolectada (segundo número).

Poza	Bajamar	Sustrato	Cepas aisladas
1		Erizo juvenil	BM1.1
		Erizo adulto	BM1.2
		Erizo adulto	BM1.3, BM1.4
		Roca	BM1.5
2		Roca	BM1.6
		<i>B. plumosa</i>	BM1.7
Punta Baja			
1		Roca	PB1.1
		<i>S. compressa</i>	PB1.2
		Erizo adulto	PB1.3
		Mejillón	PB1.4, PB1.5, PB1.6
2		Roca	PB1.7
		<i>S. muticum</i>	PB1.8
		Mejillón	PB1.9, PB1.10

Tabla 2. Muestras recolectadas en BM, ER y PB durante diciembre de 2006. Segundo muestreo en BM, PB y primer muestreo en ER. La claves utilizadas indican la poza donde se recolectó (primer número), número de muestra recolectada en la poza (segundo número) y la colonia aislada de esa muestra (tercer número).

Poza	Punta Baja	Sustrato	Cepas aisladas
1	PB11	Erizo morado juvenil	PB11.1, PB11.2, PB11.3
	PB12	<i>S. muticum</i>	PB12.1, PB12.2, PB13.3
	PB13	Mejillón	PB13.1, PB13.2
	PB14	Erizo morado adulto	PB14.1, PB14.2
2	PB21	Erizo morado juvenil	PB21.1, PB21.2
	PB22	Erizo morado adulto	PB22.1, PB22.2
	PB23	<i>C. vancouveriensis</i>	PB23.1, PB23.2
	PB24	Mejillón	PB24.3
	PB25	<i>L. californicum</i>	PB25.1, PB25.2
3	PB31	Erizo rojo adulto	PB31.1, PB31.2
	PB32	Erizo morado adulto	PB32.1, PB32.2
	PB33	Mejillón	PB33.1, PB33.2
	PB34	<i>S. muticum</i>	PB34.1, PB34.2
2	BM21	Erizo morado adulto	BM21.1, BM21.2
	BM22	<i>L. proboscideum</i>	BM22.1, BM22.2
	BM23	<i>C. vancouveriensis</i>	BM23.1, BM23.2
	BM24	Roca	BM24.1, BM24.2

3	BM31	Erizo morado juvenil	BM31.1, BM31.2, BM31.3, BM31.4,
	BM32	Erizo morado adulto	BM32.1, BM32.2,
	BM33	Roca	BM33.1, BM33.2
4	BM41	Erizo morado juvenil	BM 41.1, BM 41.2, BM 41.3
	BM42	Erizo adulto	BM42.1, BM42.2, BM42.3, BM42.4, BM42.4,
	BM43	<i>L. proboscideum</i>	BM42.5, BM42.6
	BM44	Mejillón	BM 43.1, BM 43.2
	BM45	<i>E. menziense</i>	BM 44.1, BM 44.2, BM44.3, BM 44.4, BM 44.5 BM 45.1, BM45.2
1	ER11	Erizo morado juvenil	ER11.1, ER11.2, ER11.3
	ER12	Erizo morado adulto	ER12.1, ER12.2, ER12.3
	ER13	<i>L. proboscideum</i>	ER13.1, ER13.2, ER13.3
	ER14	<i>C. vancouveriensis</i>	ER14.1, ER14.2, ER14.3
	ER15	Erizo morado adulto	ER15.1, ER15.2
	ER16	<i>L. proboscideum</i>	ER16.1, ER16.2
2	ER21	<i>L. proboscideum</i>	ER21.1, ER21.2, ER21.3, ER21.4
	ER22	<i>C. vancouveriensis</i>	ER22.1, ER22.2, ER22.3, ER22.4
	ER23	Roca	ER23.1, ER23.2, ER23.3

Tabla 3. Muestras recolectadas en E y O en diciembre de 2006. Las claves indican la poza en el que se recolectó (el primer número), de la muestra (el segundo el número) y es el número de colonia aislada de esa muestra (tercer número).

Poza	Esmeralda	Sustrato	Cepas aisladas
1	E11	Erizo adulto negro	E11.1, E11.2
	E12	Erizo adulto negro	E12.1
	E13	<i>C. vancouveriensis</i>	E13.1, E13.2
	E14	<i>Gelidium robustum</i>	E14.1, E14.2
	E15	Sedimento (arena)	E15.1, E15.2
	E16	<i>Padina durvillaei</i>	E16.1, E16.2
	Los Ojitos		
1	O11	Erizo adulto morado	O11.1, O11.2
	O12	Erizo adulto morado	O12.1
	O13	Erizo negro	O13.1, O13.2
	O14	Roca <i>c/Lithophyllu c.</i>	O14.1
	O15	<i>C. vancouveriensis</i>	O15.1, O15.2
	O16	Agua de mar	O16.1, O16.2
	O17	Sedimento (arena)	O17.1, O17.2

7.3 Pruebas bioquímicas a las cepas aisladas

La aplicación de cada una de las pruebas bioquímicas convencionales se realizó con la finalidad de buscar metabolismos similares en las cepas aisladas y para establecer grupos bacterianos que compartan las mismas características fenotípicas. Para ello se hizo una selección entre las pruebas bioquímicas aplicadas a las que resultaron positivas y/o negativas, así como crecimiento o inhibición de su crecimiento en los distintos medios utilizados.

7.3.1 Cepas aisladas en septiembre: BM y PB

En las Tablas 4, 5, 6 y 7 se presentan las cepas aisladas de las muestras recolectadas en BM y PB. Cada tabla corresponde al conjunto de cepas obtenido de una biopelícula de un determinado sustrato.

Tabla 4. Cepas aisladas de biopelículas asociadas al epitelio del erizo morado, *S. purpuratus*. Las muestras fueron recolectadas en septiembre de 2006, en BM y PB.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	Mov	Oxi	Ferm	MR	VP	Indol	TCBS	MC	0%	6%	8%
PB1.3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
BM1.1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
BM1.2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BM1.3	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BM1.4	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+

Tabla 5. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a conchas de mejillón, *M. californianus*. Las muestras fueron recolectadas en septiembre de 2006, en PB.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	Mov	Oxi	Ferm	MR	VP	Indo	TCBS	MC	0%	6%	8%
PB1.4	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
PB1.5	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PB1.6	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PB1.9	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PB1.10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 6. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a superficies rocosas. Las muestras fueron recolectadas en septiembre de 2006, en BM y PB.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	Mov	Oxi	Ferm	MR	VP	Indo	TCBS	MC	0%	6%	8%
PB1.7	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
PB1.1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BM1.5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM1.6	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 7. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a superficies de algunas algas. Las muestras fueron recolectadas en septiembre de 2006, en BM y PB.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	Mov	Oxi	Ferm	MR	VP	Indo	TCBS	MC	0%	6%	8%
PB1.2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PB1.8	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BM1.7	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

De manera general y con base en las pruebas bioquímicas que se aplicaron, resultó que todas las cepas aisladas en muestras recolectadas en septiembre, fueron bacterias Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas, movilidad positiva y crecieron en medio con 0, 6 y 8% de NaCl. Con la similitud que presentaron en otras pruebas bioquímicas, éstas se

podieron clasificar en tres grupos, los cuales se muestran en la **Tabla 8**. En cada uno de estos grupos se relacionan cepas aisladas de diferentes sustratos.

Tabla 8. Grupos bacterianos que se distinguen por la similitud en reacción a las pruebas bioquímicas aplicadas.

Grupo	Cepas	Sustrato	Características metabólicas del grupo
1	BM1.2	Erizo morado,	Bacterias anaerobias facultativas, crecen en medio TCBS, medio Mc Conkey, producen indol y acetofna, este último se acumula por la fermentación de glucosa a alcohol (butanadiol).
	PB1.5	Mejillón	
	PB1.6	Mejillón	
	PB1.9	Mejillón	
	PB1.1	Roca	
	BM1.6	Roca	
	PB1.2	<i>S. compressa</i>	
	PB1.8	<i>S. muticum</i>	
	BM1.7	<i>B. plumosa</i>	
2	PB1.10	Mejillón	La única diferencia con el grupo 1 es que éste sí produce ácido desde el metabolismo de glucosa.
	BM1.5	Roca	
3	PB1.4	Mejillón	Bacterias anaerobias, no crece en medio TCBS y en medio McConkey, no producen indol, ácido, ni acetofna.
	PB1.7	Roca	

En la **Figura 4** se muestran los grupos bacterianos conformados por las cepas, de acuerdo con las similitudes en su metabolismo. En la parte central de la figura se enlistan las características metabólicas que comparten todas las cepas analizadas, en los extremos se ubican los grupos bacterianos y las cepas que fueron diferentes en su metabolismo. Cabe resaltar que las cepas aisladas de erizo morado, *S. purpuratus*, en las estaciones de **BM** y **PB**, fueron cepas completamente diferentes, puesto que presentaron un metabolismo único comparado con el resto de las cepas, excepto una cepa que se encuentra dentro de un grupo bacteriano.

De acuerdo al análisis de las cepas obtenidas durante este muestreo, las cepas: PB1.3, BM1.1, BM1.3, BM1.4 (asociadas a *S. purpuratus*); PB1.4, PB1.5 (asociadas a conchas de mejillón); PB1.2 (*Silvetia compressa*) y BM1.5 (sustrato rocoso), fueron completamente diferentes en su metabolismo.

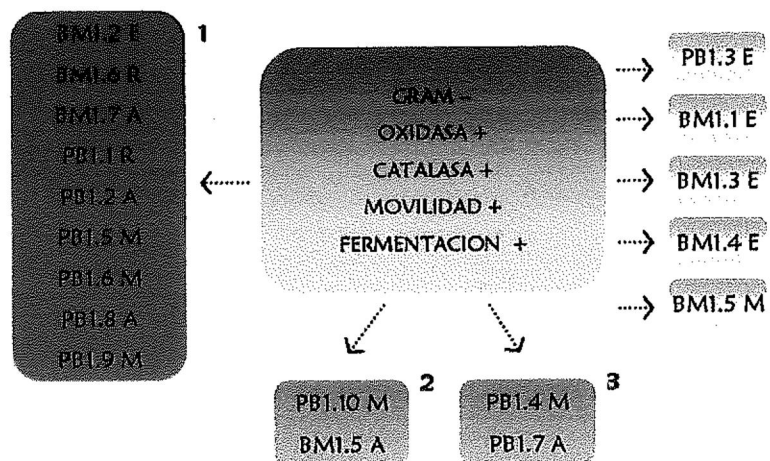


Figura 4. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, *S. purpuratus*; de mejillón, *M. californianus*; de algunas algas y a superficies rocosas, en pozas del intermareal en BM y PB en septiembre de 2006. En la parte central representa las características fenotípicas que comparten todas las cepas, mientras que los extremos se ubican los grupos metabólicos que predominaron entre las cepas aisladas y cepas con diferente metabolismo. Para el código utilizado en cada cepa bacteriana, refiérase al texto del escrito.

7.3.2 Cepas aisladas en diciembre: BM, PB y ER

En las **Tablas 9, 10, 11 y 12** se agrupan las cepas de acuerdo al sustrato del cual fueron aisladas, de las diferentes biopelículas recolectadas en pozas de marea de los diferentes sitios de muestreo. En cada una de estas tablas se pueden ubicar las diferencias que tuvo cada cepa con respecto a las demás, que también fueron aisladas del mismo sustrato. La diferencia más marcada en las cepas aisladas fue que no todas crecieron en medio TCBS, en medio Mc Conkey, en medio al 0, 6 y 8% de NaCl, y en movilidad.

En la **Tabla 10** se muestran sólo las cepas aisladas de biopelículas asociadas a conchas de mejillón, recolectadas en **BM y PB**, sitios donde los bancos de mejillón son muy abundantes. Asimismo, se muestra la respuesta metabólica que presentaron en las diferentes pruebas bioquímicas a las que se sometieron las distintas cepas.

De la misma forma en la **Tabla 11** se muestran las cepas aisladas de diferentes algas marinas, obtenidas de biopelículas naturales colectadas en tres sitios de muestreo. Estas

cepas mostraron diferencias en su actividad metabólica. Mientras que para el caso de las cepas asociadas a sustrato rocoso (**Tabla 12**), sólo se contó con muestras de **BM** y **ER**, donde la cobertura de la roca fue cercana al 100% en las pozas. Independientemente del sustrato del cual fueron recolectadas, hay que resaltar que todas las cepas aisladas de las biopelículas recolectadas en diciembre de 2006 resultaron ser Gram negativas, catalasa y oxidasa positivas, como se especifica en la parte central de la **Figura 5**. En la parte inferior y a los costados de la **Figura 5**, se encuentran los grupos bacterianos. En cada uno de estos grupos bacterianos hay cepas que fueron aisladas de diferentes sustratos y que además fueron recolectadas en diferentes sitios **BM**, **ER** y **PB**. Por las características metabólicas que presentaron se distinguen 17 grupos bacterianos, éstos se muestran a detalle en la **Tabla 13**. En la parte superior de la **Figura 5** se encuentran ubicadas las 20 cepas que no presentaron ninguna similitud en su respuesta metabólica con el resto, y en la **Tabla 14** se puede apreciar con mayor facilidad las diferencias en el metabolismo que presentaron. De **PB** fueron siete cepas completamente diferentes: PB11.2, PB14.2, PB32.1, las que estuvieron asociadas a *S. purpuratus* y PB31.2 a *S. franciscanus*; PB33.1 aislada de *M. californianus*; PB12.3 y PB34.1 aislada de alga *S. muticum*. Para **ER** fueron sólo tres cepas: ER11.3 asociada a *S. purpuratus*, ER14.2 a *C. vancouveriensis* y ER13.3 a *L. proboscideum*. En **BM** fueron 11 cepas diferentes: BM22.1 y BM22.2 aisladas de *L. proboscideum*, BM23.1 y BM23.2 asociadas a una alga coralina calcárea *C. vancouveriensis*, BM24.1 y BM24.2 de rocas, BM31.1 de *S. purpuratus* juvenil, BM32.2, BM32.3 y BM42.3 de *S. purpuratus* adulto y BM44.2 de *M. californianus*.

Tabla 9. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas al erizo de mar (*S. purpuratus*), recolectadas en diciembre de 2006, BM, PB y ER.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxid	Ferm	Indol	MR	YP
PB11.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB11.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB11.3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB14.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB14.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB21.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PB21.2	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
PB22.1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
PB22.2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
PB31.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB31.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
PB32.1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
PB32.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
BM21.1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BM21.2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BM31.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
BM31.2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BM31.3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BM31.4	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
BM32.1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
BM32.2	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
BM32.3	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
BM41.1	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
BM41.2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
BM41.3	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
BM42.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM42.2	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM42.3	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM42.4	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM42.5	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BM42.6	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ER11.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ER11.2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ER11.3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ER12.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ER12.2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ER12.3	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ER15.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
ER15.2	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-

Tabla 10. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas a las conchas de mejillón (*M. californianus*), recolectadas en diciembre de 2006, en PB y BM.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxid	Ferm	Indol	MR	YP
PB13.1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
PB13.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PB24.3	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
PB33.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PB33.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
BM44.1	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM44.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM44.3	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM44.4	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
BM44.5	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-

Tabla 11. Cepas obtenidas de biopelículas de diferentes algas marinas, recolectadas en diciembre de 2006, en PB, BM y ER.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxid	Ferm	Indol	MR	VP
PB12.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
PB12.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PB12.3	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
PB23.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PB23.2	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
PB25.1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
PB25.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
PB34.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
PB34.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
PB34.3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
BM22.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
BM22.2	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
BM23.1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
BM23.2	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
BM43.1	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
BM43.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM45.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BM45.2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER13.1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ER13.2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ER13.3	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
ER14.1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ER14.2	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
ER14.3	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER16.1	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ER16.2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER21.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ER21.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ER21.3	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER21.4	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
ER22.1	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER22.2	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
ER22.3	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER22.4	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

Tabla 12. Cepas obtenidas de biopelículas asociadas a Rocas, recolectadas en diciembre de 2006, en BM y ER.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catal	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxid	Ferm	Indol	MR	VP
BM24.1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
BM24.2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BM33.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BM33.2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ER23.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ER23.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ER23.3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 13. Grupos de cepas bacterianas, cada grupo posee un metabolismo diferente al resto.

Grupo	Cepas	Sustrato	Características metabólicas del grupo
1	PB11.1 PB11.3 PB13.1 ER11.1 ER12.1	Erizo morado juvenil Erizo morado juvenil Mejillón Erizo morado juvenil Erizo morado adulto	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey y en medio con 0, 6 y 8% de NaCl, excepto PB13.1 que no creció en medio al 0% de NaCl y tiene como característica particular que es una bacteria asociada a conchas de mejillón, <i>M. californianus</i> . El resto de las cepas fueron aisladas de erizo morado, <i>S. purpuratus</i> . Todas produjeron indol, no producen acetoina lo que implica que no fermentan la glucosa a alcohol (butanadiol), así también producen ácido desde su metabolismo de glucosa.
2	PB12.2 PB13.2 PB21.1 PB33.2 PB34.2 BM33.1 BM45.1 BM43.2	<i>S. muticum</i> Mejillón Erizo morado juvenil Mejillón <i>S. muticum</i> Roca <i>E. menziense</i> <i>L. proboscideum</i>	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey y en medio con 0,6 y 8% de NaCl, a excepción de dos cepas PB33.2 y PB34.2 que no crecieron en 0% NaCl. Producen indol y ácido a partir de glucosa, pero no producen acetoina.
3	PB14.1 PB22.1 PB22.2 ER21.1 ER21.2 BM42.6	Erizo morado adulto Erizo morado adulto Erizo morado adulto <i>L. proboscideum</i> <i>L. proboscideum</i> Erizo morado adulto	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey, no crecen en medio con 6 y 8% de NaCl sólo crecen en 0% de NaCl. La cepa PB22.1 no creció a ninguna concentración de NaCl. Producen indol y ácido a partir de glucosa pero no acetoina.
4	PB25.1 PB25.2 PB31.1 PB32.2	<i>L. californicum</i> <i>L. californicum</i> Erizo rojo adulto Erizo morado adulto	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey y en medio con 6 y 8% de NaCl, pero ninguna crece a 0%. Producen indol, ácido pero no producen acetoina.
5	PB21.2 PB23.2 PB24.3 BM31.3	Erizo morado juvenil <i>C. vancoveriensis</i> Mejillón Erizo morado juvenil	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, no crecen en TCBS pero si en medio Mc Conkey. Crecen en medio al 6 y 8% de NaCl, BM31.3 creció a las tres concentraciones, mientras que PB21.2, PB23.2 y PB24.3 no crecieron en 0% de NaCl. No producen indol, acetoina y tampoco ácido a partir de glucosa.
6	PB34.3 BM21.1 BM21.2	<i>S. muticum</i> Erizo morado adulto Erizo morado adulto	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey, no crecen al 0, 6 y 8% de NaCl, producen indol y ácido desde el metabolismo de glucosa y no producen acetoina.
7	BM41.1 BM41.2	Erizo morado juvenil Erizo morado juvenil	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey, y en 0% de NaCl y no a concentraciones del 6 y 8%, producen indol, ácido de la degradación de glucosa y no producen acetoina. La única diferencia con el grupo 3, es que éstas son no móviles y las otras son bacterias móviles.
8	BM31.4 BM32.1	Erizo morado juvenil Erizo morado adulto	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, no crecen en Mc Conkey, crecen solo en medio al 0% NaCl, producen indol, ácido del metabolismo de glucosa y no producen acetoina.
9	PB12.1 PB23.1 ER22.4	<i>S. muticum</i> Roca <i>C. vancoveriensis</i>	bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, Mc Conkey en 0 y 6% de NaCl y no crecen en medio al 8%, producen indol, ácido del metabolismo de glucosa y no producen acetoina.
10	ER15.2 ER22.2	Erizo morado adulto <i>C. vancoveriensis</i>	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS y no en Mc Conkey. Crecen en 0 y 6% de NaCl y no al 8%, producen indol, ácido y no producen acetoina. La diferencia una diferencia con el grupo 7 es que estas son bacterias móviles.
11	BM41.3 BM42.1 BM44.4 ER14.3 ER16.2 ER22.1	Erizo morado juvenil Erizo morado adulto Mejillón <i>C. vancoveriensis</i> <i>L. proboscideum</i> <i>C. vancoveriensis</i>	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, no crecen en TCBS y Mc Conkey, aunque si crecieron en medio con 0,6 y 8% de NaCl, no producen indol, ácido a partir de glucosa y acetoina. La diferencia con el grupo 5 radica en que estas no crecieron en medio Mc Conkey y aquellas sí.
12	BM42.2 BM42.4 BM42.5 BM43.1 BM44.1 BM44.3 BM44.5 ER15.1 ER16.1 ER21.4	Erizo morado adulto Erizo morado adulto Erizo morado adulto <i>L. proboscideum</i> Mejillón Mejillón Mejillón Erizo morado adulto <i>L. proboscideum</i> <i>L. proboscideum</i>	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS, no crecen en medio Mc Conkey, crecen solo en 0% NaCl, producen indol, ácido y no producen acetoina. La diferencia con el grupo 8 radica en que estas cepas bacterianas son móviles y las del grupo 8 no lo son.
13	ER12.2 ER12.3 ER13.2 BM33.2 BM45.2	Erizo morado adulto Erizo morado adulto <i>L. proboscideum</i> Roca <i>E. menziense</i>	Bacterias no móviles, anaerobias (no oxidan solo fermentan), único grupo con tal característica, además de que no crecen en TCBS, Mc Conkey. No producen indol, acetoina y ácido.
14	ER23.1 ER23.2 ER23.3	Roca Roca Roca	Bacterias móviles, anaerobias facultativas. Crecen en TCBS, Mc Conkey y en 0, 6 y 8 % de NaCl, producen indol, ácido y acetoina a diferencia del resto de los grupos.
15	ER11.2 ER14.1	Erizo morado juvenil <i>C. vancoveriensis</i>	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, no crecen en TCBS y Mc Conkey si en 0, 6 y 8% de NaCl. No producen indol, ácido y acetoina. La diferencia de este grupo con el grupo 11 es que éstas son móviles y con el grupo 13 es que además de ser móviles también oxidan, pues las del grupo trece son anaerobias (fermentadoras).
16	BM31.2 ER13.1	Erizo morado juvenil <i>L. proboscideum</i>	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en TCBS y no en Mc Conkey, crecen en 0, 6 y 8%, producen indol, ácido y no producen acetoina.
17	ER21.3 ER22.3	<i>L. proboscideum</i> <i>C. vancoveriensis</i>	Bacterias no móviles, anaerobias facultativas, no crecen en TCBS, crecen en medio Mc Conkey y en 0, 6 y 8% de NaCl, no producen indol, acetoina ni ácido.

Tabla 14. Cepas aisladas de las muestras de biopelículas recolectadas en diciembre de 2006. Todas estas cepas son completamente distintas entre sí y entre los grupos bacterianos.

Cepas	Sustrato	Oxidasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxid	Ferm	Indol	MR	VP
PB11.2	Erizo morado	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
PB12.3	<i>S. muticum</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
PB34.1	<i>S. muticum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
ER13.3	<i>L. proboscideum</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
ER14.2	<i>C. vancouveriensis</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
BM32.3	Erizo morado	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
PB32.1	Erizo morado	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
BM24.1	Roca	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
PB33.1	Mejillón	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
BM22.2	<i>L. proboscideum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
PB14.2	Erizo morado	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ER11.3	Erizo morado	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PB31.2	Erizo rojo	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
BM44.2	Mejillón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM22.1	<i>L. proboscideum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
BM24.2	Roca	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BM23.1	<i>C. vancouveriensis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
BM42.3	Erizo morado	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
BM23.2	<i>C. vancouveriensis</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
BM31.1	Erizo morado	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
BM32.2	Erizo morado	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

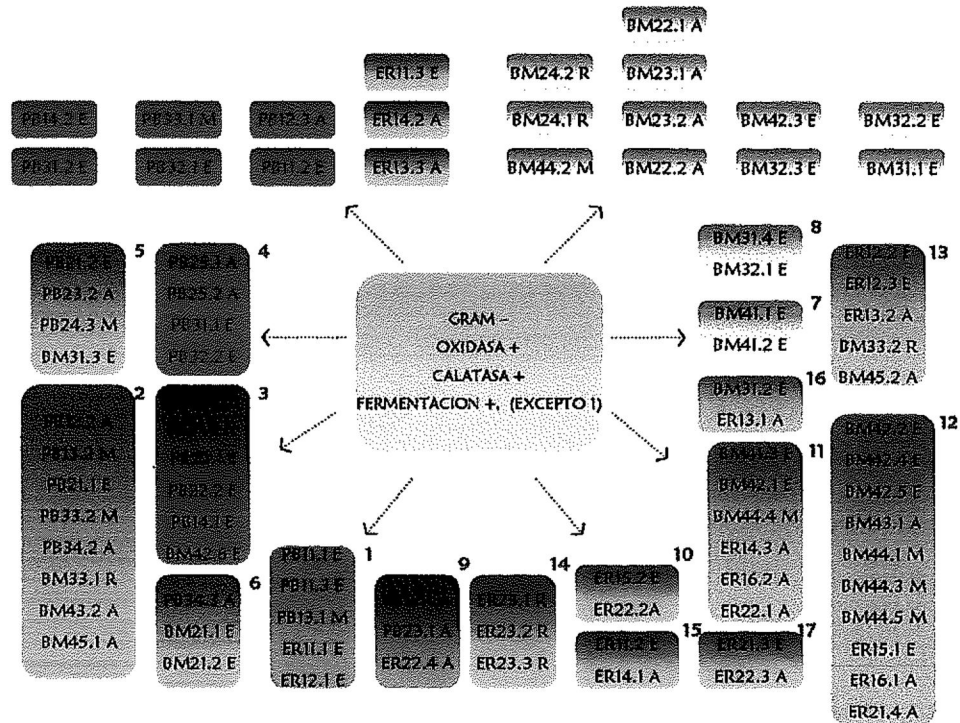


Figura 5. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, *S. purpuratus*, de mejillón, *M. californianus*; algunas algas y a superficies rocosas, en pozas del intermareal en BM, PB, ER en diciembre de 2006. En la parte central representa las características fenotípicas que comparten todas las cepas, mientras que los extremos se ubican los grupos metabólicos que predominaron entre las cepas aisladas y cepas con diferente metabolismo. Para el código utilizado en cada cepa bacteriana, refiérase al texto del escrito.

7.3.3 Cepas aisladas en diciembre: O y E

Se consideró importante recolectar biopelículas naturales asociadas a las pozas de marea al suroeste de la costa de Baja California a la altura de isla Cedros, región hasta donde se distribuye el erizo morado (*S. purpuratus*), debido a la influencia de la corriente de California que puede transportar larvas hasta esa zona. Las muestras de biopelículas recolectadas de los sitios: **O** y **E**, se analizaron por separado de las cepas aisladas de muestras recolectadas en **BM**, **PB** y **ER**, sitios ubicados más al norte del Estado. En estas pozas también se recolectaron muestras de biopelículas asociadas a sustratos rocosos, a algas marinas, erizo morado (*S. purpuratus*) y erizo negro (*Arbacia incisa*) (Tablas 15, 16, 17 y 18). Pero sólo en **O** se colectaron biopelículas naturales asociadas a erizo morado, siendo el lugar más sureño en donde se encontró esta especie en el intermareal rocoso. En cada una de estas tablas se muestra la respuesta metabólica que presentó cada una de las cepas a las pruebas bioquímicas que se le aplicaron.

Tabla 15. Cepas aisladas de biopelículas asociadas a erizo negro, *A. incisa*, y erizo morado, *S. purpuratus*, encontradas en las pozas de marea de O y E.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxd	Ferm	Indol	MR	VP
E11.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
E12.1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E12.2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
O11.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
O11.2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
O12.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
O13.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
O13.2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

Tabla 16. Cepas aisladas a partir de biopelículas asociadas a algas en pozas de marea en O y E.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxd	Ferm	Indol	MR	VP
E13.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
E13.2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
E13.3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E14.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
E14.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E16.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
E16.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O14.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
O15.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
O15.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 17. Cepas aisladas de arena (Sedimento) recolectada cerca de los erizos en E y O.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxd	Ferm	indol	MR	VP
E15.1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
E15.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O17.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
O17.2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 18. Cepas aisladas a partir de muestras de agua de mar en O.

Cepas	Gram	Oxidasa	Catalasa	TCBS	MC	0%	6%	8%	Mov	Oxd	Ferm	indol	MR	VP
O16.1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
O16.2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

En la **Figura 6** se presentan los grupos bacterianos y cepas, de diferente metabolismo, aisladas de muestras colectadas en **O** y **E** en diciembre de 2006. En la parte central de la figura se muestran las características generales de todas las cepas, éstas fueron: Gram negativas, móviles, anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa positivas, crecieron en medio TCBS y en medio Mc Conkey. Estas características, también las presentaron las cepas aisladas y caracterizadas en **BM**, **ER** y **PB**. Además, se distinguieron cuatro cepas que fueron diferentes en su metabolismo entre ellas (E12.1, E12.2, E13.3, E14.2, O15.2 y O17.2) y entre los cuatro grupos bacterianos caracterizados. En cada uno de los grupos bacterianos se encuentran cepas que fueron aisladas de diferente sustrato y en diferente sitio de colecta (**Tabla 19**).

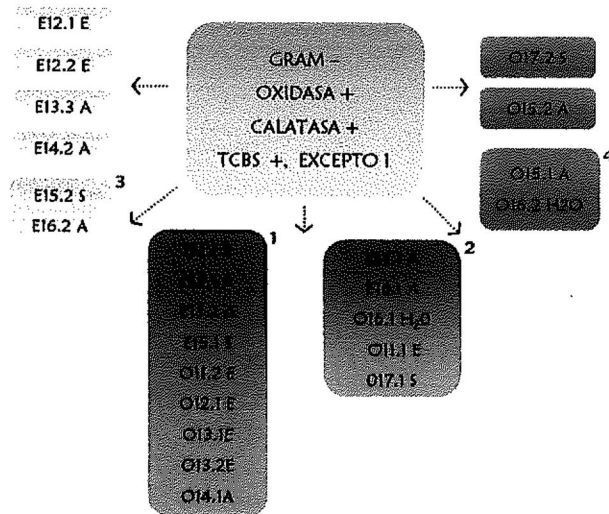


Figura 6. Grupos de cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar (*S. purpuratus* y *A. incisa*), a algunas algas, sedimento y en agua de mar, en pozas del intermareal en O y E en diciembre de 2006. En la parte central representa las características fenotípicas que comparten todas las cepas, mientras que los extremos se ubican los grupos metabólicos que predominaron entre las cepas aisladas y cepas con diferente metabolismo. Para el código utilizado en cada cepa bacteriana, refiérase al texto del escrito.

Tabla 19: Grupos bacterianos que se distinguen de las cepas aisladas de las muestras recolectadas en O y E.

Grupo	Cepas	Sustrato	Características metabólicas del grupo
1	E11.1	Erizo negro	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en medio con 0% de NaCl, no crecen en medio donde las concentraciones de NaCl son de 6 y 8% de NaCl. Producen indol, ácido del metabolismo de glucosa pero no producen acetoina.
	O11.2	Erizo morado adulto	
	O12.1	Erizo morado adulto	
	O13.1	Erizo negro	
	O13.2	Erizo negro	
	E13.1	<i>C. vancouveriensis</i>	
	E13.2	<i>C. vancouveriensis</i>	
2	O14.1	<i>Roca/L. californicum</i>	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en medio con 0 y 6% de NaCl pero no el 8%, característica que las diferencia del grupo 1. También producen indol, ácido de la degradación de glucosa y no producen acetoina.
	E15.1	Sedimento	
	E12.2	Erizo negro	
	O11.1	Erizo morado	
	E14.1	<i>Gelidium robustum</i>	
	E16.1	<i>Padina durvidae</i>	
3	O17.1	Sedimento	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en medio con 0, 6 y 8% de NaCl, producen indol, ácido y acetoina.
	O16.1	Agua de mar	
	E16.2	<i>P. durvidae</i>	
4	E15.2	Sedimento	Bacterias móviles, anaerobias facultativas, crecen en medio con 0, 6 y 8% de NaCl, producen indol, ácido y no producen acetoina, esta última característica las diferencia del grupo 3.
	O15.1	<i>C. vancouveriensis</i>	
	O15.2	<i>C. vancouveriensis</i>	
	O16.2	Agua de mar	

7.3.4 Cepas con diferente actividad metabólica

Para todas las cepas se realizó una comparación de sus características fenotípicas. En total fueron 130 cepas aisladas, de las cuales, aquellas que compartieron las mismas características se agruparon, pero hubo otras que presentaron un metabolismo completamente diferente. Estas fueron de un mayor interés puesto que son las únicas que no comparten alguna similitud con alguna otra cepa y/o grupo bacteriano. En la **Tabla 20** se aprecian las 59 cepas que resultaron de interés por tener un metabolismo completamente diferente, único o porque representaron a un grupo con el cual comparten las mismas características metabólicas, como ya se explicó anteriormente en las **Tablas 8, 13 y 19**.

Tabla 20: Cepas aisladas de diferentes sustratos en las dos campañas de muestreo (septiembre y diciembre de 2006). Las claves que están marcadas en letras negritas, son aquellas cepas que son completamente diferentes a todas las demás y las que no están marcadas en letras negritas son aquellas cepas que comparten características fenotípicas con otras (forman un grupo bacteriano).

Cepas de diferente metabolismo						
Muestreo de Septiembre		Muestreo de Diciembre				
Bajamar	Punta Baja	Bajamar	Punta Baja	Erendira	P. Ojitos	P. Esmeralda
BM1.1 E	PB1.2 A	BM21.1 E	PB11.2 E	ER11.2 E	O11.2	E12.1 E
BM1.3 E	PB1.3 E	BM22.1 A	PB12.2 A	ER11.3 E	O13.1 E	E12.2 E
BM1.4 E	PB1.4 M	BM22.2 A	PB12.3 A	ER12.1E	O14.1A	E13.3 A
BM1.5 R	PB1.5 M	BM23.1 A	PB13.2 M	ER13.1 A	O15.2 A	E14.2 A
		BM23.2 A	PB14.2 E	ER13.3 A	O16.2 H ₂ Omar	E15.2 S
		BM24.1 R	PB24.3M	ER14.2 A	O17.2 S	E16.1A
		BM24.2 R	PB25.2A	ER15.2 E		
		BM31.1 E	PB31.2 E	ER16.2 A		
		BM31.4 E	PB32.1 E	ER21.2 A		
		BM32.2 E	PB33.1 M	ER21.3 A		
		BM32.3 E	PB34.1 A	ER22.4 A		
		BM41.1 E		ER23.3 R		
		BM42.3 E				
		BM42.5 E				
		BM44.2 M				
		BM45.2 A				

7. 4 Bioensayos de inducción a la metamorfosis con larvas de erizo morado

Se evaluó el efecto de la inducción a la metamorfosis en larvas de erizo morado, *S. purpuratus*, de algunas cepas seleccionadas que incluyeron seis aisladas de erizo morado (PB1.3, BM1.1, BM1.3, BM1.4, PB11.1 y BM21.1), tres cepas asociadas a algas marinas (PB1.2, PB12.2 y BM22.1), tres cepas asociadas a conchas de mejillón (PB1.4, PB1.5 y PB13.2) y tres asociadas a sustratos rocosos (BM1.5, BM24.1 y BM24.2).

Los porcentajes de larvas metamorfoseadas obtenidos a los diferentes tiempos de exposición a las biopelículas se muestran en la **Figura 7**. Las cepas PB12.2, BM1.5, PB13.2, BM21.1, BM22.1 y BM24.1 no promovieron cambios morfológicos en las larvas a las 12 h, mientras que la biopelícula en que se presentó mayor porcentaje de larvas metamorfoseadas fue BM1.4 con un 49.03%, seguida de la cepa PB1.4 con un 33.55%. A las 24 h de exposición a la biopelícula, la cepa BM1.4 se mantuvo con el porcentaje de larvas metamorfoseadas inicialmente. Sin embargo, la cepa PB1.4 aumentó a un 38.89%. Con la cepa BM22.1 fue hasta este tiempo que se alcanzó un 35.55%. Y a las 48 h, el porcentaje de metamorfosis con la cepa BM1.4 aumentó a un

53.19%, al igual que con la cepa PB1.4 que llegó hasta 42.44%. Con la cepa PB13.2 el porcentaje de larvas metamorfoseadas aumentó de un 11.11% a las 24 h a un 53.33% a las 48 h. En presencia de la cepa BM22.1 el porcentaje de larvas metamorfoseadas aumentó a 44.44% y con la cepa PB1.5 alcanzó hasta un 75.55% de un 8.88% que se registro a las 24 h.

En la **Figura 8** se puede observar con mayor detalle que la cepa que tuvo un mayor efecto como inductora de la metamorfosis fue la cepa PB1.5 con un 75.55% de larvas metamorfoseadas, esta cepa se aisló de una biopelícula asociada a conchas de mejillón (*M. californianus*). En segundo lugar en importancia fueron las cepas PB13.2 y BM1.4 que indujeron un 53.33 y 53.19%, respectivamente; estas dos cepas fueron aisladas también de conchas de mejillón (*M. californianus*) y erizo morado (*S. purpuratus*), respectivamente. En el caso de la cepa PB1.2, que indujo a un 45.28% a las larvas competentes, esta cepa fue aislada de la superficie de una alga parda (*Silvetia compressa*). Por otro lado, la cepa BM22.1, con la cual se obtuvo un 44.44% de inducción a la metamorfosis, fue aislada de una alga roja calcárea (*Lithophyllum proboscideum*). Asimismo, la cepa PB1.4 que indujo un 42.4% de metamorfosis fue aislada de conchas de mejillón. Con las cepas restantes se tuvo un efecto del 40% o menor de inducción a la metamorfosis.

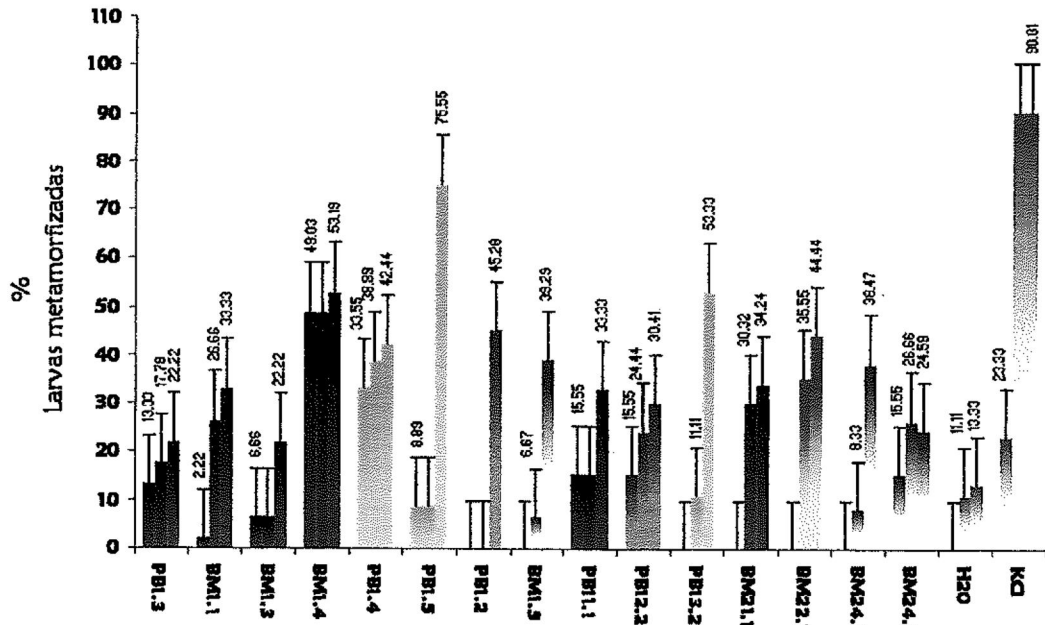


Figura 7. Ensayo de inducción a la metamorfosis de larvas competentes del erizo morado, *S. purpuratus*, a 12, 24 y 48 h de exposición a biopelículas mono-específicas. La primera barra indica el porcentaje de larvas metamorfoseadas a las 12 h, la segunda barra a 24 h y la tercera a las 48 h (n = 3 réplicas por tratamiento y las líneas verticales sobre las barras indican error estándar).

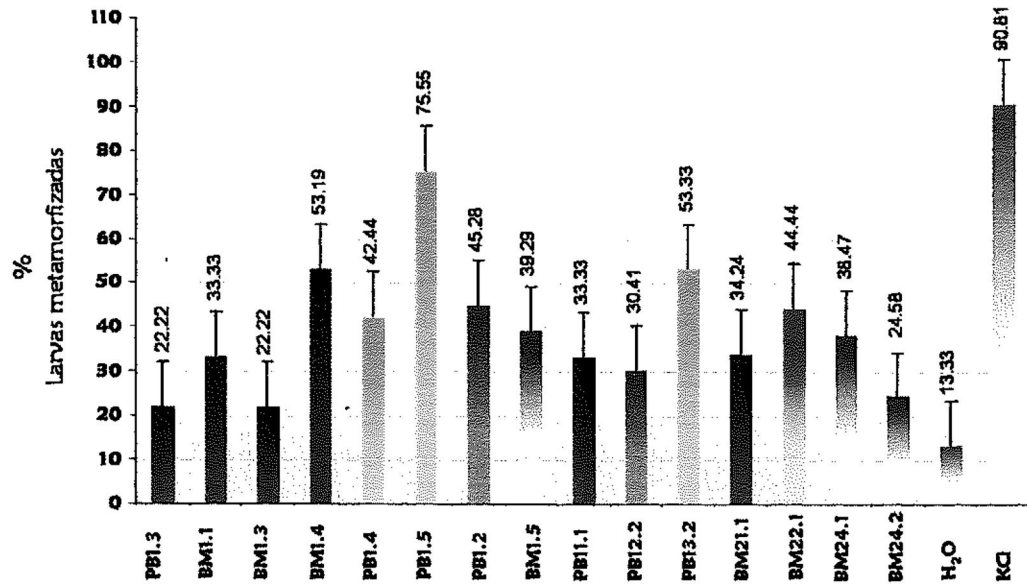


Figura 8: Ensayo de inducción a la metamorfosis del erizo morado, *S. purpuratus*. Porcentaje de larvas que metamorfosearon en el último periodo de exposición a las 48 h (n = 3 réplicas por tratamiento y las líneas verticales sobre las barras indican error estándar).

7.5 Análisis genético de las cepas con diferente metabolismo

El análisis incluyó, las 15 cepas utilizadas en el ensayo de inducción a la metamorfosis y de todas aquellas cepas obtenidas a partir de biopelículas asociadas a erizo de mar, *S. purpuratus* (Tabla 20). Las extracciones de DNA genómico que se obtuvieron de estas cepas caracterizadas como diferentes fenotípicamente se muestran en el *anexo E*. De todas las muestras fue extraído el DNA genómico utilizando las mismas condiciones.

7.5.1 Amplificación del 16S rDNA

Las condiciones de los ciclos PCR que se probaron para todas las muestras, se estandarizaron a partir de el método descrito por Lee et al. (2003), realizando algunas modificaciones (*Ver anexo F*).

7.5.2 Identidad genética de las cepas con secuencias de géneros o especies de bacterias marinas

En la **Tabla 21** se muestran los datos del género o especie con la que tuvieron un 99 o 100% de identidad con las secuencias objetivo (productos de PCR). Así también se tiene el número de acceso correspondiente para cada una de ellas en el sitio NCBI.

En la **Figura 9** se muestra el resultado de los cluster que definen el árbol filogenético, de todas las secuencias objetivo. En esta figura se puede apreciar la formación de seis grupos y cuatro cepas que no se integran en ningún de estos, ya que son especies diferentes. El grupo formado por las cepas de *Vibrio cyclotrophicus*: ER12.1, PB11.1, O11.2, PB32.1 y BM21.1; el siguiente está formado por la cepa BM32.3 que es *V. splendidus*: ER11.1 y ER15.1 que son *V. cyclotrophicus*; posteriormente el grupo de cepas de *V. splendidus*: BM41.1, BM1.3, BM31.4 y BM42.5; seguido de cepas *V. alginolyticus*: PB12.2, PB1.5, PB13.2, BM24.2, PB1.2, BM1.5, BM22.1 y PB31.2; y el grupo de *Pseudoalteromonas* sp: BM1.4, PB1.4, ER11.2, PB1.3, E12.1, BM31.1, BM32.2 y un último grupo formado por PB11.2 y PB14.2 resultaron en el BLAST

poseer un 75 y 86% de identidad, respectivamente, con la secuencia de *Pseudoalteromonas* sp.

Tabla 21. Secuencia de cada una de las cepas analizadas molecularmente. Datos del género o especie con la que alinearon y tuvieron el mayor porcentaje de identidad, con respecto a la base de datos del GeneBank.

Cepa	Acceso	Genero o especie	% de identidad
BM1.5	DQ513192.1	<i>Vibrio</i> sp Maj4	100
PB1.2	AF537959.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99
BM22.1	AF537959.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99
PB31.2	DQ513192.1	<i>Vibrio</i> sp Maj4	99
O11.2	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	100
PB11.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	99
ER12.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	99
PB32.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	98
BM21.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	99
ER11.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	100
ER15.1	DQ481610.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	99
BM31.4	AY620972.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99
BM42.5	AY620972.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99
PB12.2	AF513447.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99
PB1.5	AY967727.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98
BM1.4	AF297958.1	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99
PB1.4	AF297958.1	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99
ER11.2	AB106189.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	100
PB1.3	AB106189.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	99
BM31.1	EU100393.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp B4	98
BM32.2	EU100393.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp B4	98
PB14.2	DQ520891.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	86
PB11.2	DQ520891.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	75
BM1.1	DQ090766.1	<i>Vibrio halioticoli</i>	99
BM32.3	AM422804.1	<i>Vibrio splendidus</i>	100
BM41.1	AY620972.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99
BM42.3	AB264129.1	<i>Paracoccus</i> sp TDMA	96
E12.1	AB106189.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	98
E12.2	EU340847.1	<i>Vibrio</i> sp DSII	99
BM24.2	DQ642836.1	<i>Vibrio</i> sp 34	99
PB13.2	EF114182.1	<i>Vibrio</i> sp W099	99
BM1.3	AY620972.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99
BM24.1	AM422803.1	<i>Photobacterium aphysiae</i>	99

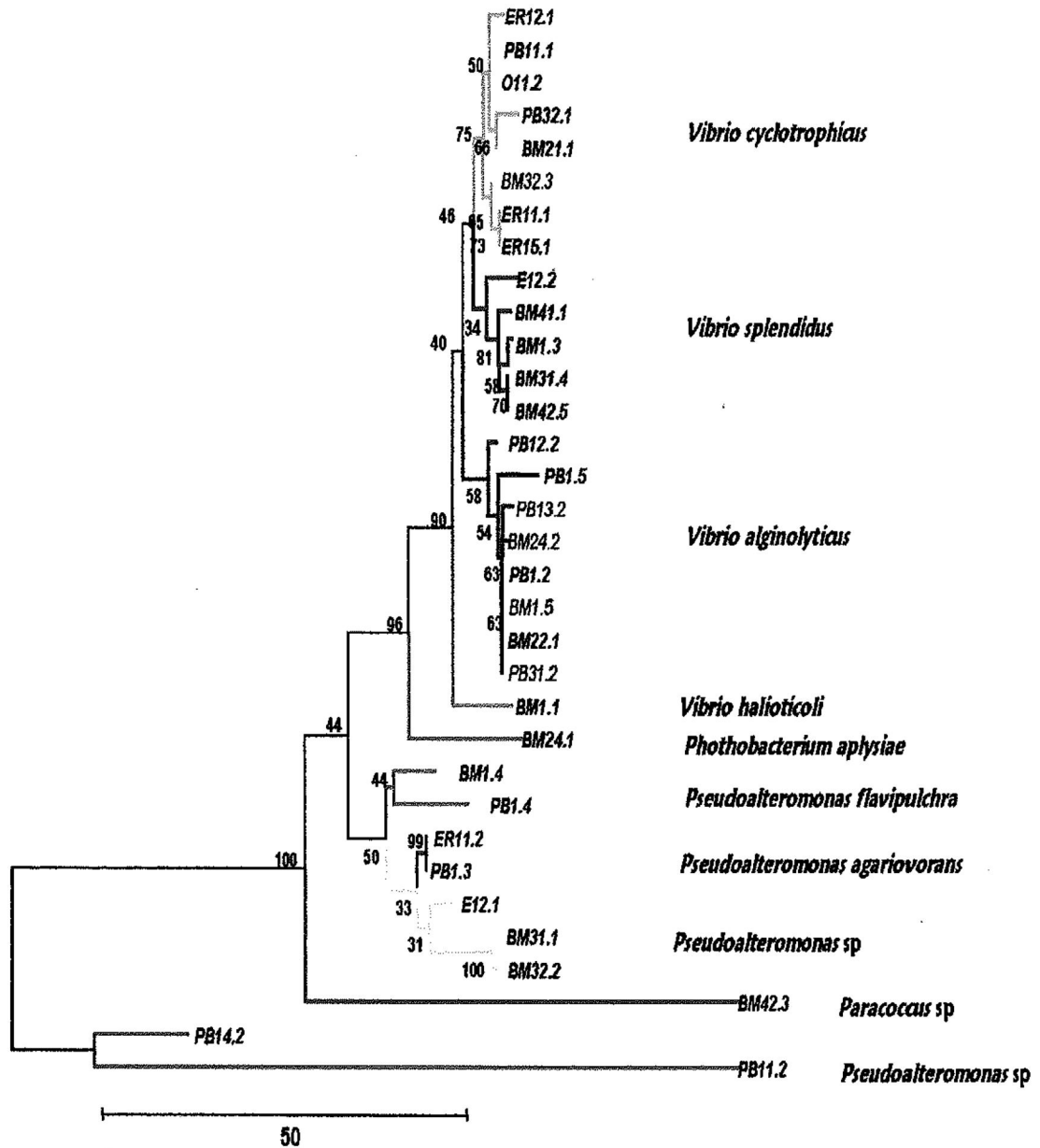


Figura 9. Árbol filogenético de secuencias 16S rDNA (499pb), de las cepas aisladas de erizo morado, *S. purpuratus*, y algunas aisladas de otros sustratos. Construido por el método Neighbour-joining. El bootstrap muestra los valores de remuestreo, en cada nodo, resultado de 500 réplicas.

7.6 Variación espacio-temporal de las especies bacterianas

De las 33 cepas caracterizadas molecularmente se observó una variabilidad de especies bacterianas, cuatro especies de *Vibrio*: *V. cyclitrophicus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus* y *V. haliotocoli*; dos especies de *Pseudoalteromonas*: *P. flavipulchra* y *P. agarivorans*;

una cepa que pertenece al género *Photobacterium* y un al género de *Paracoccus*. Pero ¿Cómo es que se distribuyen estas poblaciones bacterianas a lo largo de la costa oeste de Baja California?

La variabilidad espacial de cepas bacterianas en los sitios de muestreo en: **BM** y **PB** en septiembre de 2006, fue muy clara, ya que en **BM** se identificaron dos especies de *Vibrio* (*V. halioticoli* y *V. splendidus*) que no se entraron en **PB**, mientras que en **PB** fue encontrada *P. agarivorans*, especie que no se encontró en **BM**. Lo interesante para esta temporada es que también se hallaron dos especies bacterianas, ambas presentes en los dos sitios, éstas fueron *V. alginolyticus* y *P. flavipulchra* (Tabla 22).

Tabla 22. Especies encontradas en cada uno de los sitios de muestreo en septiembre de 2006

SEPTIEMBRE 2006	
Bajamar	Punta Baja
<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. alginolyticus</i>	<i>P. flavipulchra</i>
<i>V. halioticoli</i>	<i>P. agarivorans</i>
<i>P. flavipulchra</i>	

En el muestreo de diciembre de 2006 fueron aisladas bacterias del género *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Paracoccus* y *Photobacterium*. Como se puede observar en la **Tabla 23**, *V. cyclitrophicus* se encontró en cuatro sitios: **BM**, **PB**, **ER** y la estación sureña de los **O**, mientras que *V. splendidus* fue aislada en muestras de **BM** y **E**. Del género *Pseudoalteromonas* se identificó claramente la especie *P. agarivorans*, la cual fue aislada en **ER** y también en **E**. Además de una especie no identificada de *Pseudoalteromonas* sp. (EU100393.1/). La especie de *Photobacterium* sp. fue la única aislada de un sustrato rocoso en **BM** y *Paracoccus* sp. de erizo morado, *S. purpuratus*.

Tabla 23. Especies encontradas en cada uno de los sitios de muestreo en diciembre de 2006.

DICIEMBRE 2006				
Bajamar (BM)	Punta Baja (PB)	Eréndira (ER)	Ojitos (O)	Esmeralda (E)
<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. splendidus</i>
<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>P. agarivorans</i>		<i>P. agarivorans</i>
<i>V. alginolyticus</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.			
<i>Photobacterium aplysiae</i>				
<i>Paracoccus</i> sp.				
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.				

7.7 Metabolismo de las especies bacterianas presentes en las pozas de marea

El género *Vibrio* se caracteriza por bacterias Gram negativas, oxidasa positiva, anaerobias facultativas y crecen en medio selectivo TCBS (tiosulfato-citrato-sales biliares-sucrosa), considerando que hay otras pruebas bioquímicas en donde los resultados son variables (Alsina y Blanch, 1994). *Vibrio halioticoli*, además de las características generales antes mencionadas para la especie, se distinguió por ser una bacteria en forma de bacilo no flagelada, inmóvil; donde el ion Na⁺ es esencial para su crecimiento, produce indol, no produce acetofina (VP-), produciendo gas a partir de la glucosa (MR+) y también puede crecer en 1 y 6% de NaCl. Aunque esta especie puede presentar ciertas diferencias en movilidad (+), producción de indol (-) y no crecer en 1 y 6% NaCl de acuerdo con la descripción de Sawabe et al. (1998), como el caso de la cepa BM1.1 que fue caracterizada como perteneciente a esta especie y la cual fue aislada de un erizo morado juvenil.

En el caso de *Vibrio cyclotrophicus*, ésta es una bacteria en forma de bacilos, Gram negativa, móvil con uno o dos flagelos subpolares o polares, anaerobia facultativa, oxidasa y catalasa +, producción de indol negativa y requieren al menos 1.75% de NaCl para crecer de acuerdo con lo descrito por Hedlund y Stanley (2001). Las cepas que resultaron compatibles a esta especie fueron: O11.1, PB11.1, ER12.1, PB32.1, BM21.1, ER11.1 y ER15.1, que tienen la capacidad crecer en medio TCBS, producen ácido a partir de glucosa (MR+) y no producen acetofina (VP-), habiendo diferencias marcadas de las siete cepas, pues en dos de ellas no se detectó movilidad (PB32.1 y BM21.1), y en las siete hay diferencias en el crecimiento NaCl (**Tablas 13 y 15**). *Vibrio splendidus* se caracteriza por presentar células en forma de bacilo curvado, Gram negativas y oxidasa positiva, no produce acetofina (VP-), utiliza la glucosa (MR+), su crecimiento óptimo fue en 30% NaCl y es sensible al vibriostático 0/129 de acuerdo a lo descrito por Jensen et al. (2003). Las cepas que resultaron ser de esta especie mostraron como características crecer en medio TCBS y McConkey, ser anaerobias facultativas y producir indol, aunque BM31.4 y BM32.3 no fueron móviles mientras que BM42.5 y BM1.3 si lo fueron, BM41.1 si creció en medio Mc Conkey. Cabe mencionar que todas

estas cepas que se mencionan arriba fueron aisladas de erizo morado *S. purpuratus* tanto de juveniles como de adultos.

Las cepas que tuvieron similitud con la secuencia genética de *Vibrio alginolyticus* coinciden con las características bioquímicas que están reportadas para esta especie, producen acetoina (VP+) e indol, excepto la cepa BM22.2 que resultó negativa para estas dos pruebas. En cuanto a la prueba de O/F resultaron ser anaerobias facultativas, excepto la cepa BM22.1, que resultó positiva en la prueba de fermentación, tales diferencias en esta prueba fueron reportadas por Rubin y Milton (1975). Molitoris et al. (1985) mencionan que puede haber variaciones debido a las diferencias del medio basal, condiciones de esterilización o a los indicadores usados. Por otra parte todas estas cepas crecieron sobre medio TCBS y en medio NaCl al 0, 6 y 8%, habiendo diferencia en las cepas BM22.2 y PB31.2 que no crecieron en 0% NaCl, lo cual altera la ubicación taxonómica establecida, pues la especie crece a concentraciones de NaCl entre 8-10%.

Al igual que *Vibrios*, el género *Photobacterium* sp. comprende un grupo de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, en forma de bacilos y que requiere de el ion Na⁺ para su crecimiento de acuerdo con lo descrito por Seo et al. (2005); también se ha visto que existen especies que crecen en TCBS, y en medio de NaCl a concentraciones de 2-6% pero no al 8% como lo mencionan Thompson et al. (2005). La cepa BM24.1 que presentó identidad con el género *Photobacterium* es una bacteria no móvil, no produce acetoina (VP-) y produce ácido de el metabolismo de glucosa (MR+), crece sólo en 6% NaCl y en TCBS. Esta cepa fue la única en su género que se aisló y fue a partir de una biopelícula asociada a sustrato rocoso.

Los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* como se mencionó anteriormente son bacterias Gram negativas, oxidasa y catalasa +, no móviles, características que coinciden con el género *Paracoccus* sp., pero a diferencia de aquellas éstas son aerobias, la concentración óptima de NaCl para crecimiento es de 1-6% y no crece a 8% como lo mencionan Lee et al. (2004). Adicional a estas características la cepa BM42.3, aislada

del erizo morado *S. purpuratus*, tuvo identidad con este género, no produce indol, produce ácido a partir del metabolismo de glucosa (MR+), no produce acetoina (VP-) y no crece en medio TCBS.

Por último, otro género bacteriano presente en las muestras analizadas fue *Pseudoalteromonas* sp., se trata de bacterias Gram negativas, móviles, estrictamente aerobias, oxidasa y catalasa +, quimiorganotróficas, no fermentativas, el ion Na⁺ es esencial para su crecimiento, crece en 0.5-10% NaCl de acuerdo con Ivanova et al. (2002) y Romanenko et al. (2003). De las cepas analizadas PB1.4 y BM1.4 tuvieron identidad genética con la especie *P. flavipulchra* y para esta especie en particular además se reporta que produce un pigmento naranja (no-carotenoide), no forma esporas, hidroliza agar-agar y quitina, asimismo se puede mencionar que por las pruebas bioquímicas que se aplicaron en este estudio no producen acetoina (VP-), ácido a partir de glucosa y no producen indol, las colonias fueron de color amarillo, pero en la prueba de oxidación dio negativa, lo que altera su ubicación taxonómica, aunque cabe la posibilidad que la utilización de D-glucosa haya sido muy baja y por ello no haya sido detectada; cabe considerar que de acuerdo con lo descrito por Romanenko et al. (2003) al utilizar pruebas bioquímicas convencionales la prueba de oxidación puede variar la respuesta, pues de hecho con la prueba de API20 la respuesta es también baja y con el sistema de identificación Biolog GN la prueba llega a ser negativa. En el caso de aquellas cepas que resultaron tener relación con la secuencia de *P. agarivorans* (ER11.1, PB1.3 y E12.1), no producen indol y acetoina, no producen ácido por el metabolismo de glucosa, crecen en medio al 0,6 y 8% de NaCl y no crecen en medio TCBS.

8. DISCUSIÓN

8.1 Variación espacial de comunidades bacterianas

De las 12 cepas identificadas molecularmente y que fueron aisladas en los diferentes sitios de muestreo ubicados en la costa oeste de Baja California, diez resultaron especies pertenecientes a *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*. Lo anterior no es inusual, ya que se ha documentado que el género *Vibrio* está ampliamente distribuido en ambientes marinos (Zorrilla et al., 2003). Mientras que a diferencia de *Vibrio*, el género *Pseudoalteromonas* se encuentra distribuido principalmente en ambientes marinos de regiones templadas y polares, con excepción de dos ribotipos que son cosmopolitas y uno que fue encontrado en regiones templadas y tropicales (Pommier et al., 2005). En cuanto a las otras dos especies encontradas, éstas pertenecen a los géneros *Paracoccus* y *Photobacterium*, los cuales también presentan una amplia distribución geográfica como lo han reportado Lee et al. (2004) y Seo et al. (2005).

Hasta el momento existen solamente registros aislados de especies de *Vibrio* para las costas de Baja California y ninguno muestra un panorama completo de su distribución a lo largo de estas costas. Entre las especies aisladas en el presente estudio, se encuentra *V. cyclotrophicus*, la cual fue aislada por Hudlund y Staley (2001) en sedimento contaminado con creosota en costas del Atlántico Occidental, en Washington. Las características fenotípicas descritas para la especie por estos autores al ser comparadas con las que se obtuvieron por pruebas convencionales en este trabajo, son compatibles con las características metabólicas de *V. cyclotrophicus* aislado en Baja California. La diferencia que presentan es sólo el tipo de sustrato del cual fueron aisladas, pues en el caso de la cepa aislada en Baja California, no fue a partir de sedimento marino sino de epitelio de erizo morado donde fueron encontradas. Lo anterior refleja el potencial metabólico de la especie que, por el tipo de ambiente en sedimento contaminado, esta bacteria pueda ser capaz de degradar hidrocarburos policíclico-aromáticos (PAHs) como fuente de carbono, cuando no haya disponibilidad de otras fuentes de energía.

En este estudio *Vibrio splendidus* fue encontrada en los sitios de Bajamar y playa la Esmeralda, asociada a erizo morado y erizo negro, respectivamente. Estas cepas presentaron ligeras diferencias en cuanto a su metabolismo. Nealson et al. (1993) reportaron dos biovar o biotipos de *Vibrio splendidus*, los cuales se distinguen por presentar ciertas diferencias fisiológicas o bioquímicas. En las cepas encontradas en Baja California se tendrá que realizar una caracterización fenotípica en detalle, con la finalidad de conocer a qué biotipo pertenecen las cepas y si éstas son patógenas para algunos organismos. Lo anterior, debido a que se han reportado algunas cepas de *V. splendidus*, biotipo I, que causan mortalidad en larvas de *Scophthalmus maximus* (Thompson et al., 2005) y *V. splendidus* biotipo II que desarrolla patogenicidad causando mortalidades en larvas de *Crassostrea gigas*, larvas de *Pecten maximus*, en larvas de peces y de camarones (Nealson et al., 1993; Sugumar et al., 1998; Gatesoup et al., 1999). Asimismo, en un estudio realizado en Bahía Falsa, Baja California, donde se cultiva ostión japonés *C. gigas*, se reportaron mortalidades mayores al 80% y se les asoció con bacterias presumiblemente del género *Alteromonas* (Vásquez-Yeomans et al., 2004). No obstante, al ser comparadas las características fenotípicas de las cepas reportadas como *Alteromonas* con las reportadas para *V. splendidus* biotipo I y biotipo II por Alsina y Blanch (1994), Nealson et al. (1999) y con las caracterizadas en el presente estudio, éstas no concuerdan con el género *Alteromonas*, pero si con las características descritas para *V. splendidus*. Por lo anterior resulta, posible que las cepas reportadas como *Alteromonas*, correspondan a cepas patógenas de *V. splendidus* en estos cultivos y en poblaciones naturales de *C. gigas*. Resultará interesante en un futuro, conocer si esta especie se encuentra asociada a poblaciones naturales de bivalvos y en otras especies de invertebrados marinos en la costa de Baja California y verificar si la identificación inicial de la cepa como *Altermomonas*, no se trata en realidad de *V. splendidus*.

Otra especie bacteriana que se encontró ampliamente distribuida en la costa norte de Baja California fue *Vibrio alginolyticus*, está asociada a biopelículas en conchas de

mejillón, epitelio de erizo morado, sustrato rocoso, en algas pardas y algas rojas calcáreas. De la misma manera que las cepas de *V. splendidus*, esta cepa de *V. alginolyticus* presentó diferencias en su metabolismo. Lo anterior no es inusual, ya que previamente Zorrilla et al. (2003) encontraron que esta especie presenta una gran variedad de fenotipos, ribotipos y plásmidos. Tomando en cuenta su diversidad de respuestas metabólicas y comparando sólo las características más generales de las cepas aisladas en pozas del intermareal de Baja California, éstas corresponden a las descritas por Molitoris et al. (1985) y por Gómez-León et al. (2005), aún considerando las diferencias encontradas. También hay cepas de *V. alginolyticus* que se asocian a enfermedades en animales marinos, principalmente a bivalvos, equinodermos y peces (Zorrilla et al., 2003). En los últimos años se han reportado estudios donde la cepa de *V. alginolyticus* ha estado involucrada en la mortalidad en larvas de *Ruditapes decussatus* (Gómez-León et al., 2005), en larvas de mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Anguiano-Beltrán et al., 2004), y en larvas de *Argopecten ventricosus*, *Nodipecten subnodosus*, *Atrina maura* y *Crassostrea gigas*, aunque en estas dos últimas especies han resultado menos susceptibles a la virulencia de la cepa (Luna-González et al., 2002). Una de las razones por las cuales algunas cepas de esta especie son más patógenas que otras puede deberse a variaciones fisiológicas específicas y que resultan en variaciones en la virulencia que desarrolla la cepa, como ya ha sido reportado en otros estudios por Sugumar et al. (1998) para la cepa de *V. splendidus* biotipo II.

Como ya se mencionó previamente *V. alginolyticus* es una cepa patógena en larvas de mejillón *Mytilus galloprovincialis*, y este es cultivado en Baja California (Anguiano-Beltrán et al., 2004), por lo que no es de extrañarse que se haya encontrado asociada a algunos otros sustratos como algas pardas, algas rojas calcáreas, sustrato rocoso y en mejillón, *M. californianus*, (con amplia distribución en costas de California) en este estudio. Es posible que *V. alginolyticus* pueda estar involucrado en la mortalidad de ciertas larvas de invertebrados marinos dentro de la comunidad del intermareal rocoso, aunque aún no se ha estudiado el efecto de su presencia en la dinámica de las poblaciones del intermareal. Por otra parte, es interesante mencionar, que se encontró

una cepa de esta especie como la principal inductora de la metamorfosis en larvas de erizo morado en condiciones de laboratorio, por lo que se descarta que para las larvas de erizo pueda ser una bacteria patógena oportunista.

En cuanto, a las especies del género *Pseudoalteromonas*, aisladas en costas de Baja California, éstas difieren en su metabolismo, aún las que fueron identificadas como la misma especie. Estas diferencias fenotípicas también han sido encontradas en la formación de pigmentos, en la producción de enzimas hidrolíticas, en utilización de azúcares y ácidos grasos como lo reportan Ivanova et al. (2002). Al ser comparadas las características metabólicas representativas del género descritas por varios autores (Vera et al., 1998; Ivanova et al., 2002; Romanenko et al., 2003; Mai-Prochnow et al., 2004), éstas son similares a las características bioquímicas de las especies hasta el momento caracterizadas para la zona oeste de Baja California. Aunque no se han encontrado como patógenas de animales marinos, pero sí se ha comprobado que inhiben el asentamiento de algunos organismos como esporas de algas, bacterias y larvas de invertebrados marinos como lo mencionan Mai-Prochnow et al. (2004). Lo anterior puede explicar parcialmente, el que al ser utilizadas en biopelículas monoespecíficas en ensayos de inducción a la metamorfosis en el laboratorio, no se obtengan porcentajes tan altos, punto que se discutirá más adelante. Asimismo, algunas especies del género *Pseudoalteromonas* se han encontrado asociadas a moluscos, peces, tunicados (Mai-Prochnow et al., 2004) y agua (Ivanova et al., 2002). Si bien también se han aislado de otros organismos marinos, como es el caso de *P. agarivoras*, cepa aislada de colonias de ascidios (*Halocynthia aurantium*, *Polysyncraton* sp. y *Clarentina molucensis*) al sureste del Océano Pacífico en costas de Chile (Romanenko et al., 2003) y en el oeste del mar Mediterráneo (Francia y España) aislada de detritus de diatomeas (Agogué et al., 2005). El que esta cepa se encuentre asociada a detritus, implica que es una especie que llega a formar parte de la comunidad bacteriana en biopelículas marinas como lo mencionan Lee et al. (2003), quienes la aislaron de biopelículas de cinco localidades de Mokpo Harbor en Korea.

La cepa de *Pseudoalteromonas flavipulchra* fue identificada y encontrada asociada al epitelio de erizo morado y en conchas de mejillón, en al menos dos sitios del intermareal en costas de Baja California. No obstante, las dos cepas fueron aisladas de diferente sustrato, las dos presentaron el mismo metabolismo, el cual corresponde al descrito para la especie reportada por Ivanova et al. (2002). No hay duda que se trata de la misma especie ya que su identidad fue comprobada en un 100% en el análisis genético. La cepa reportada por Ivanova et al. (2002), aislada de aguas del mediterráneo (Francia), no había sido encontrada en otras aguas, por tanto se desconocía que esta especie pudiera estar asociada a diversos sustratos. Resulta interesante encontrar a *P. flavipulchra* en costas del Pacífico Oriental, y además que esté involucrada en la inducción al asentamiento y metamorfosis de erizo morado en experimentos en el laboratorio. Asimismo, en estudios posteriores resultará interesante conocer si esta especie puede encontrarse asociada a otros sustratos o se presenta en estado de vida libre, y si se presentan variaciones en el metabolismo de estas cepas dependiendo del sustrato del cual son aisladas.

Si bien las especies aisladas en Baja California en su mayor proporción fueron *Vibrio* sp. y *Pseudoalteromonas* sp., del género *Photobacterium* también se aisló una cepa a partir de una biopelícula asociada a sustrato rocoso. En lo que se refiere a la especie encontrada en Baja California, *P. aplysiae* ya anteriormente fue encontrada por SüB et al. (2007) en sedimentos del mar mediterráneo exclusivamente en las capas saprofitas, ricas en materia orgánica. Al comparar el metabolismo descrito para la especie, con la cepa aislada en Baja California estas resultan contrastantes, a excepción de su tolerancia a altas concentraciones de NaCl, lo que podría considerarse como una variante para la especie encontrada en el Pacífico. Sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores del metabolismo de diferentes cepas de este mismo género, para conocer las variaciones metabólicas que puedan presentar la especie de la región. De manera general, se considera que las características fisiológicas son propias de cada especie independientemente si se encuentran en sustratos diferentes. Lo anterior se concluyó al comparar el metabolismo de diferentes especies de *Photobacterium*, reportadas por

Budsberg et al. (2003), Seo et al. (2005), Jung et al. (2007). Sin embargo, en *P. rosenbergii* se han observado variaciones metabólicas de una cepa reportada por Thompson et al. (2005) y la cual fue aislada de corales blanqueados. Por lo tanto la cepa de *Photobacterium* encontrada en el presente estudio podría ser una variante de esta especie, con tolerancia a la salinidad.

Otro género identificado en costas de Baja California fue *Paracoccus* sp., asociado a epitelio de erizo morado. Este género al igual que *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* se ha encontrado en diferentes lugares del mundo y asociado a diferentes sustratos como los son el briozoario *Bugula plumosa* (Pukall et al., 2003), en algas marinas (Berry et al., 2003) y en sedimentos (Kelly et al., 2006). Estos reportes han sido en Costas del mar del Norte y en costas de África. El metabolismo característico de este género comprende la producción de un pigmento (carotenoides) que es diferente en cada una de las especies, menos en *P. solventivorans*, *P. marcusii* y *P. carotinifaciens* que son cepas no-carotenogénicas. Al comparar las características fenotípicas que definen al género con las que mostró la cepa BM42.3, la actividad metabólica fue la misma y también presenta pigmentación color naranja. A pesar de que se analizó por pruebas moleculares no se obtuvieron identidades mayores al 95% con ninguna especie del género, por ello se requiere hacer análisis más detallado de su actividad metabólica para establecer su identidad definitiva.

8.1.2 Variación temporal en la composición bacteriana

De acuerdo con la composición de especies bacterianas encontradas en costas de Baja California las dos especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus* y *V. cyclotrophicus*) se encontraron presentes durante las dos épocas de muestreo que correspondieron a otoño e invierno, probablemente porque en las biopelículas naturales estas cepas resisten las variaciones en las condiciones oceanográficas que oscilan con el tiempo. Es posible que solo se vean afectadas estas dos especies bacterianas en su densidad y abundancia dentro de la biopelícula, como se ha comprobado con diferentes grupos bacterianos

presentes en arrecifes coralinos por Webster et al., (2004). Estos autores reportan, que a pesar de que existen diferencias en la comunidad bacteriana con relación a la profundidad, algunas especies se mantienen presentes por periodos prolongados, solamente variando su densidad.

En las comunidades bacterianas del intermareal rocoso en costas de Baja California, se encontraron especies bacterianas que mostraron estar asociadas a un tipo de sustrato específico, mostraron estacionalidad y además presentaron una distribución restringida, éstas fueron *V. halioticoli*, *V. splendidus*, *Photobacterium aplysiae* y *Paracoccus* a excepción de *P. flavipulchra*, que se encontró tanto en epitelio de erizo morado como en conchas de mejillón. Sin embargo, hay especies bacterianas que se encontraron asociadas a diferentes sustratos, que tienen una distribución restringida y que no se ven afectadas por el tiempo, como fue el caso de *V. alginolyticus*. Asimismo, hay especies bacterianas que sólo se encontraron en un tipo de sustrato y fueron de amplia distribución, como es el caso de *P. agarivorans* y *V. cyclotrophicus*. Estas variaciones en la composición bacteriana no se deben a otra cosa sino a las condiciones ambientales, que en conjunto con los factores fisicoquímicos y biológicos presentes durante la época de muestreo afectaron la presencia de especies bacterianas dentro de la biopelícula. Durante los muestreos realizados la salinidad osciló entre 33-35ppm, la temperatura entre 13 y 20°C y el pH entre 7.6 y 8.5. Conclusiones similares han sido reportadas por Shimura y Hadfield (2006), cuando estudiaron la variación temporal en una comunidad bacteriana desde el inicio de formación de la biopelícula y las hechas por Lau et al. (2005) quienes encontraron en condiciones de laboratorio, que la composición de la comunidad de una biopelícula se ve afectada por cambios en la salinidad, temperatura y por sucesión en el tiempo.

8.2 Asentamiento de invertebrados marinos mediante biopelículas monoespecíficas

En este estudio los altos porcentajes de metamorfosis en condiciones de laboratorio, obtenidos de biopelículas monoespecíficas de bacterias aisladas en costas de Baja

California, fueron significativos en comparación con los que se han obtenido en otros estudios, pues con la cepa de *V. alginolyticus*, los porcentajes de metamorfosis fueron del 75.55% y 53.33% y con la cepa de *P. flavipulchra* fue de un 53.19%. En comparación con biopelículas probadas en larvas de otros invertebrados, en *H. elegans*, *V. alginolyticus* fue capaz de inducir alrededor del 50% de las larvas, mientras que una cepa del género *Pseudoalteromonas* indujo a un 55% (Lau et al., 2002). Posteriormente Huang y Hadfield (2003) probaron una biopelícula de *P. luteoviolacea* en la que se obtuvo un 60% de larvas metamorfoseadas, aún en concentraciones bacterianas bajas. En otros organismos el efecto de inducción a la metamorfosis por medio de biopelículas bacterianas no es muy diferente, nuevamente con una biopelícula monoespecífica de *Pseudoalteromonas* sp se indujeron niveles de un 51% en larvas de *Acropora willisae* (Negri et al., 2001). Es interesante que los niveles de inducción que se presentan en las especies de *H. elegans*, *A. willisae* y *S. purpuratus* al ser expuestas a biopelículas de *Vibrio alginolyticus* y *Pseudoalteromonas* sp, oscilen aproximadamente alrededor del mismo porcentaje de inducción y el cual se encontró entre 50-75% de larvas metamorfoseadas. Por otra parte, esta respuesta inductora no es común para todas las especies. Estudios realizados en el briozoario *Bugula neritina*, mostraron que este mismo género bacteriano inhibe su asentamiento, aun cuando se incremente la densidad de células en la biopelícula (Dahms et al., 2004). Es posible que las especies del género *Pseudoalteromonas* sp. contribuyan solo con una parte en la señal de asentamiento y por tanto estén actuando sinérgicamente con otras especies bacterianas para proveer un estímulo más fuerte.

No solo *Vibrio* sp. y *Pseudoalteromonas* sp. han sido reportadas como involucradas en la inducción a la metamorfosis. Algunos estudios en *H. elegans* reportan que una cepa de *Roseobacter* favorece notablemente la metamorfosis, con porcentajes que alcanzaron hasta un 65% de larvas metamorfoseadas (Lau y Qian, 2001); por otra parte *Cytophaga tytica* indujo hasta un 40% de las larvas (Huang y Hadfield, 2003). En el caso del erizo blanco, *Lytechinus pictus* las bacterias del género *Alteromonas* sp. indujeron a la metamorfosis a un 48% de las larvas competentes (Díaz-Pérez, 2006), y en el caso de

larvas de *S. purpuratus* también éstas fueron inducidas al asentamiento y metamorfosis en presencia de biopelículas de *Photobacterium aplysiae* y *V. cyclotrophicus* con porcentajes que oscilaron entre 34.24 y 38.47%.

En contraste con biopelículas monoespecíficas de cepas asociadas a erizo morado en condiciones de laboratorio, los porcentajes de metamorfosis han sido más bajos que los que se obtuvieron con cepas asociadas a erizo blanco e incluso para erizo morado obtenidas de las pozas. Estos porcentajes de metamorfosis, producidos por cepas asociadas a erizo morado en el laboratorio fueron de 17.15% a las 48 h, 36.53% a las 72 h y de entre 40-44.79% a las 120 h (datos no publicados). Mientras que en este estudio el porcentaje de metamorfosis más alto se obtuvo a las 48 h, éstos fueron del 75.55 y 53.33%. Aparentemente, el efecto de inducción es más retardado por cepas asociadas a erizo morado en condiciones de laboratorio que por cepas asociadas a estos organismos en condiciones ambientales. De cualquier forma es necesario realizar experimentos simultáneos con cepas aisladas de condiciones de laboratorio y del campo para poder afirmar con certeza que existe diferencia en el efecto inductor.

Finalmente, cabe mencionar, que no todas las bacterias favorecen la inducción a la metamorfosis, pues hay ciertas especies bacterianas asociadas a la superficie de organismos bentónicos, que inhiben el asentamiento larval de otros invertebrados marinos, como mecanismo de defensa o “antifouling” (Dobretsov y Qian, 2004; MacProchnow et al., 2004). A través de estos mecanismos de inducción o inhibición por parte de la microflora asociada a diferentes sustratos u organismos se determina la distribución espacial de las larvas a diversos sustratos y con ello la presencia de invertebrados marinos en el fondo (Holmström et al., 1992; Lau et al., 2002).

8.3 Distribución de erizo de mar, *Strongylocetrotus purpuratus*

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, el asentamiento en larvas de erizo morado *S. purpuratus* en Baja California, es muy posible que

responda al estímulo dado por la presencia de cepas bacterianas tales como *V. alginolyticus* y *P. flavipulchra* dentro de las biopelículas naturales. Como ya se mencionó anteriormente estas cepas se encuentran asociadas a conchas de mejillón, a algas rojas calcáreas, algas pardas y al epitelio de erizo morado, principalmente. Estos resultados indican que las claves que inducen el asentamiento de erizo morado están asociadas a sus congéneres, a fuentes de alimento (algas o en si la misma biopelícula) o a un sustrato bentónico en particular, por ende un hábitat adecuado para su desarrollo. Como ya ha sido observado en otras especies de erizo de mar, como *Strongylocentrotus droebachiensis* que es inducido a la metamorfosis en presencia de algas rojas coralinas (Pearce y Scheibling, 1990), mientras que para las larvas de *S. purpuratus*, *S. franciscanus*, *Loxechinus albus*, *Lytechinus pictus* y *Arbacia punctulata* se ha reportado que son inducidas por biopelículas bacterianas (Cameron y Schroeter, 1980), aunque hasta el momento no se habían identificado cepas específicas dentro de las biopelículas inductoras.

Por otro lado, aparentemente las especies bacterianas de distribución restringida como *V. haliotocoli*, *V. splendidus* y *P. agarivorans* no juegan un papel importante como señal ambiental en el estímulo de inducción a la metamorfosis, ya que al menos en el laboratorio resultaron no inductoras.

Es importante conocer la distribución natural de las diferentes especies bacterianas, así como su capacidad de inducción a la metamorfosis en larvas de erizo morado en el medio ambiente, tomando en cuenta que hay bacterias que pueden estimular, inhibir o no afectar el asentamiento de las larvas, estas diferencias en los niveles de inducción fueron observados por Lau et al. (2002), cuando determinó el efecto de varias cepas aisladas de biopelículas marinas en larvas de *H. elegans*.

Una vez que se hayan ubicados los sitios con mayor número de especies bacterianas que estimulan el asentamiento de las larvas de erizo y comprobar que son sitios de reclutamiento, entonces se podrán promover actividades que eviten que estos lugares

sean afectados por la pesca artesanal o de gran escala, y de esta manera proteger los sitios de reclutamiento del erizo morado *S. purpuratus*.

Por otro lado, la variabilidad temporal y estacional en especies bacterianas, encontradas en la región de la costa oeste de Baja California confirma que hay heterogeneidad en la diversidad bacteriana de las biopelículas marinas, y demuestra que son sistemas dinámicos que van cambiando con respecto a las condiciones ambientales presentes a diferentes escalas tanto espaciales como temporales.

Por último, considerando que por cuestiones metodológicas, la diversidad bacteriana aislada de las biopelículas y asociadas a los diversos sustratos son parte de la porción viable cultivable de bacterias marinas, la cual corresponde solamente a menos del 0.1% (Noker et al., 2004), es necesario intentar caracterizar el 99.9% restante de las bacterias marinas que no son cultivables. Esta fracción puede conocerse a través de otros métodos moleculares como son el análisis por microscopio de electrónico de barrido (SEM), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Webster et al., 2004; Webster y Negri, 2006), análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) a partir del 16S rDNA (Blum et al., 2004; Nogales et al., 2007) y análisis de espacios intergénicos ribosomales automatizados (ARISA) (Yannarell et al., 2003). De esta forma se podrá obtener un panorama más completo de la estructura de la comunidad en biopelículas bacterianas asociadas a diversos sustratos marinos a diversas escalas temporales y espaciales. Por el momento y con el alcance técnico disponible, uno de los intereses principales del trabajo fue conocer qué especies bacterianas pudieran estar involucradas en el asentamiento de erizo morado y para evaluarlo era necesario que las cepas obtenidas se pudieran manipular en condiciones de laboratorio, para fines de comparación con otros estudios. De esta forma resulta importante aportar información sobre la distribución de especies de bacterias y su importancia en los ecosistemas marinos, pues hasta el momento son pocos los estudios enfocados en la distribución espacial de especies bacterianas y de cómo éstas se ven afectadas por las condiciones ambientales (Pinhasii

et al., 2003). La intención de este estudio fue tener una aproximación inicial sobre la distribución de comunidades bacterianas, y de ahí poder entender la importancia de algunas especies en el reclutamiento de larvas de erizo de mar a lo largo de la costa.

8.4 Identificación molecular de bacterias por 16S rDNA

Desde la década de 1970 existen trabajos que han utilizado el 16S rDNA como marcador para identificar diferentes cepas bacterianas a nivel de especie. A pesar de que esta práctica ha aumentado en los últimos años, existen diferentes opiniones sobre la certeza de la identificación o a qué porcentaje de identidad se debe de considerar que se trata de la misma especie.

El 16S rDNA codifica un gen altamente conservado y presenta una tasa de variación muy baja (Rodicio y Mendoza, 2004). Entonces parecería confiable que secuencias objetivo con porcentajes de identidad cercanos al 100%, se trate de la especie con la que tuvo dicha identidad. Sin embargo, Lee et al. (2003) reportaron que una bacteria marina con 100% de identidad a *Ochobactrum anthropi*, a partir del 16S rDNA, sólo había sido reportada en especímenes clínicos de humanos, en suelo y en raíces de trigo. Por ello hicieron una relación de homología entre secuencias del 16S rDNA de *O. anthropi* y *O. intermedium* y éstas excedieron el 98% de identidad. Estos autores concluyeron que se requieren estudios de sus características fenotípicas y la comparación de la secuencia completa para identificar dicha cepa. Un ejemplo que confirma la importancia de las características fenotípicas para la identificación de especies bacterianas, es el que reportan Romanenko et al. (2003), quienes encontraron que la secuencia del 16S rDNA de *Pseudoalteromonas agarovorans* es 99.9% idéntica a *P. distincta*, *P. atlantica*, *P. spejiana* y *P. elyakovii*. Para distinguir *P. agarovorans* de las demás especies con las que fue idéntica genéticamente, estos autores se apoyaron en características fenotípicas para poder identificarla.

Por otra parte, Stackebrandt y Goebel (1994) observaron que hay cepas que comparten una similitud del 70% entre estudios de reasociación DNA-DNA, este porcentaje de similitud, corresponde a una identidad del 97% o más del gen 16S rRNA. De tal manera que si se tienen porcentajes iguales o mayores al 97% de identidad del 16S rDNA, se considera altamente probable que se trate de la misma especie. Debido a que el 16S rDNA es altamente conservado, se han encontrado casos de cepas con un 99-100% de identidad en este gen, aunque sólo compartan el 50% de similitud o menos, en experimentos de reasociación. A pesar de lo anterior, las características fenotípicas, pueden tener un papel importante en la identificación de una cepa, cuando hay incertidumbre con información del 16S rDNA.

En el presente trabajo, la identificación bacteriana basada en el análisis del 16S rDNA resultó dar porcentajes de identidad máxima de entre 98, 99 y 100%, con secuencias tipo, de especies bacterianas. Se presentaron algunos casos, en los que sólo al utilizar la información molecular y bioquímica (características fenotípicas) en combinación fue posible hacer una identificación a nivel de especie.

La cepa PB1.4 presentó 99% de identidad con *Pseudoalteromonas piscicida*, pero también con *P. maricaloris* y *P. flavipulchra*. Las características fenotípicas de la cepa, permitieron identificarla como *P. flavipulchra*. Contrario a lo anterior, la cepa BM32.3 fue 100% idéntica a *Vibrio splendidus*, pero se encontraron diferencias fenotípicas. Debido a que el ambiente puede provocar la expresión diferencial de ciertas características, lo que cambia el fenotipo; se decidió identificar a BM32.3 como *V. splendidus*.

Por lo tanto, en estudios de taxonomía bacteriana es importante una identificación bioquímica, con la finalidad de tener un criterio fenotípico que junto con la identificación molecular, pueda ayudar a decidir la identidad de la cepa. Ya que en muchas ocasiones se tienen secuencias objetivo que comparten entre un 98, 99 o incluso 100% con secuencias tipo de especies cercanas. Estas recomendaciones, ya

anteriormente fueron consideradas por Stackebrandt et al. (2002) para la identificación de especies bacterianas. Esto autores mencionan que aún teniendo una secuencia completa de 16S rDNA (>1300 pb) con una ambigüedad baja (<0.5%), las características fenotípicas juegan un papel muy importante en la identificación de especies.

9. CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas que se aislaron y se identificaron (análisis por pruebas bioquímicas y pruebas moleculares), recolectadas de biopelículas naturales en la zona del intermareal rocoso de la costa oeste de Baja California, pertenecen a los géneros: *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium* y *Paracoccus*.

Hay una variabilidad temporal en la distribución de especies bacterianas a lo largo de la costa oeste de Baja California. Las especies *Vibrio halioticoli*, *Pseudoalteromonas flavipulchra* y *Pseudoalteromonas agariovorans*, se encontraron asociadas a biopelículas recolectadas en septiembre; *Paracoccus* sp, *Photobacterium aplysiae* sólo fueron aisladas en muestras recolectadas en diciembre; mientras que *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. cyclitrophicus* y *P. agariovorans* estuvieron presentes en los dos meses que se muestreó.

Existe variabilidad espacial de las especies bacterianas encontradas en pozas de marea en el intermareal rocoso. Las cepas de *V. splendidus* se encontraron distribuidas desde Bajamar hasta Eréndira, *V. cyclitrophicus* se encontró desde Bajamar hasta Playa la Esmeralda y *V. alginolyticus* se encontró sólo en Bajamar y Punta Baja. Las cepas asociadas a adultos de erizo morado fueron *V. splendidus* y *V. cyclitrophicus*, ésta última presentó la mayor distribución espacial. Otras cepas asociadas al erizo morado son *Paracoccus* y *P. agariovorans*, pero con una menor distribución en la costa oeste de Baja California.

En los ensayos de inducción a la metamorfosis en larvas de erizo morado las cepas con mayor efecto en el asentamiento y metamorfosis fueron la cepas de *V. alginolyticus* con un 75.55 y 53.33% y con la cepa de *P. flavipulchra* un 53.19%. La primera especie bacteriana fue aislada de conchas de *M. californianus* y la segunda se encontró asociada a *S. purpuratus*. Estas cepas que se consideran de importancia en Bajamar y Punta Baja ya que pueden estar presentes al inicio de la temporada de reproducción del erizo.

En condiciones de laboratorio se encontró que predomina la presencia de bacterias de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Paracoccus*, asociadas a adultos de erizo blanco. Mientras que, las bacterias del género *Vibrio* se encuentran asociadas a ambas especies de erizo: *Lytechinus pictus* y *Srongylocentrotus purpuratus*. En condiciones ambientales, si bien no se analizó qué bacterias están asociadas a adultos de erizo blanco *L. pictus*, en la zona del intermareal se encontraron los mismos géneros bacterianos aislados en condiciones de laboratorio.

10. ANEXOS

A. *Medios de cultivo para pruebas Bioquímicas*

En la preparación de los medios de cultivo, se utilizó el medio de cultivo caldo marino (Difco), como medio basal y de acuerdo a las modificaciones de Hansen y Sorheim (1991).

1. Movilidad 1 L: 5 g de agar en 1 L de medio de cultivo a pH 7.6.
2. Oxido-Fermentación 1 L: 3 g de Bacto agar, 0.01 g de Rojo Fenol, 0.50 g de TrisHCl y 1 L de medio de cultivo caldo marino; se calienta a ebullición hasta que se disuelva el agar y se esteriliza. A parte se prepara una solución de glucosa al 10% y se esteriliza, después en condiciones asépticas se mezclan 900 mL de medio y 100 mL de la solución de glucosa estéril. Posteriormente se distribuyen 2 mL por tubo de ensayo esterilizados previamente.
3. Indol 1 L: 0.4 de L-triptófano en 1 L de medio de cultivo caldo marino a pH 7.6, y se distribuyen 2 mL en tubos de ensayo y esterilizado.
4. Requerimientos de sal: se utilizó a concentraciones de 0, 6 y 8% de NaCl, en 1 L de medio basal: 5 g de Bactopectona, 1 g de extracto de levadura y 1 mL de cloruro férrico (solución al 1%). Para NaCl al 0% 0 g, NaCl al 6% 60 g y NaCl al 8% 80 g, además de 13 g de agar y 1000 mL de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.6, se calienta a ebullición hasta que se disuelve el agar y se esteriliza, por último se vierte en cajas Petri.
5. MP-VP 1 L: se utiliza medio de cultivo caldo marino con 10 g de glucosa, ajustando el pH a 7.6, posteriormente se distribuye a 1 mL en tubos de ensayo y se esteriliza.
6. Crecimiento en TCBS 1 L: 89 g de medio agar TCBS (Difco), 450 mL de agua de mar y 550 mL de agua desionizada, se ajusta el pH a 8.6. Se calienta a ebullición hasta disolver el agar y se vierte en cajas Petri. Este medio de cultivo no se esteriliza.
7. Crecimiento en Agar Mc Conkey 1 L: 50 g de medio agar Mc Conkey (Difco), 540 mL de agua de mar y 460 mL de agua desionizada a pH 7.1. Se calienta a ebullición hasta que se disuelva el agar, se esteriliza y se vierte en cajas Petri.

B. Extracción de DNA

Protocolo modificado por Marmur (1961).

Reactivos: Lisozima 50 mg/ml, SDS 10%, Proteinasa K 20 mg/ml, Acetato de Potasio (saturado), Buffer PI, Buffer TE, Cloroformo, Isopropanol y Etanol 70%.

1. Se colectan las células en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, después centrifuga a 12000 rpm por 5 min, y después se elimina el sobrenadante.
2. Se resuspenden las células por completo en 753 μ L buffer PI con 3.75 μ L de RNAasa A 100 mg/mL (0.5 mg/mL concentración final), 1 mg/mL Lisozima (concentración final), removiendo el pellet perfectamente.
3. Se Incuba la muestra por 30- 60 min a 37°C.
4. Después del tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionan 76 μ L de SDS 10% (1% concentración) y 4.2 μ L de proteinasa K 20 mg/mL (0.1 mg/mL concentración final), se agita suavemente e incuban por 30 min a 37°C.
5. Los tubos se remueven de la temperatura de incubación anterior y se incuban nuevamente a 55°C por 30 min.
6. Posteriormente, a cada tubo se le adicionan 200 μ L de cloroformo, agitando vigorosamente hasta que se forme una emulsión, se centrifuga a 1200 rpm por 5 min.
7. Se adicionan 200 μ L de Acetato de K concentrado y se agita suavemente la muestra, después se centrifuga 5 min a 12000 rpm.
8. Se recuperan 700 μ L de la fase acuosa en un tubo Eppendorf limpio. En algunas muestras fue necesaria una segunda limpieza con cloroformo, como se indica en el paso No. 6.
9. A cada muestra se le adiciona un volumen de isopropanol, se deja reposar 15 min a temperatura ambiente, y se centrifuga 15 min a 14000 rpm. Después se elimina el sobrenadante.
10. Se agregan 200 μ L de Etanol al 70% y se agita suavemente, se centrifuga por 15 min a 14000 rpm y por último se elimina el sobrenadante.
11. Se deja secar el pellet de DNA a temperatura ambiente.

12. Por último, se resuspende el pellet en 20 μL de Buffer TE.

Acetato de Potasio Saturado: se adiciona el reactivo hasta que no se disuelva en la solución, usar H_2O desionizada estéril.

Buffer PI: se disuelven 6.06 g Tris Base, 3.72 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 800 mL de H_2O desionizada y estéril. Ajustando el pH a 8.0 con HCl y aforar a 1 L con H_2O desionizada estéril.

Buffer TE: 0.01 mM EDTA y 10 mM Tris

C. Condiciones de PCR.

Reactivos:

1. Mezcla para PCR o maxter mix (20 reacciones): 373.29 μL H_2O desionizada estéril, 50 μL de Buffer PCR 10X (concentración final 1X: 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0), 15 μL de MgCl_2 10 mM (concentración final: 1.64 mM) y 19.21 μL de dNTP's 5 mM (concentración final: 0.21 mM).
2. Taq polimerasa GIBCO (Life Technologies of Brazil)
3. Oligonucleótidos: 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3') y 1522R (5'-AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3') y 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3').
4. La concentración final de DNA genómico que se utilizó en la reacción de PCR fue de 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Preparación de las reacciones de PCR: maxter mix 22.87 μL , primer Fwd 0.5 μL , Primer Rvs 0.5 μL , Taq polimerasa 0.125 μL , DNA 1 μL en un volumen total de 25 μL

D. Alineamiento de Productos PCR

El primer 27F es la secuencia de la posición 14-441 y en primer 518R es la secuencia de la posición 449-21. Los fragmentos fueron 100% idénticos.

14	ACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAAGAGTAGCTTGCTACTCTGGCGTCGAGCGGCGGAC	72
449	ACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAAGAGTAGCTTGCTACTCTGGCGTCGAGCGGCGGAC	390
73	GGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCT	132
389	GGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCT	330
133	AATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCA	192
329	AATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCA	270
193	AGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTT	252
269	AGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTT	210
253	GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA	312
209	GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA	150
313	GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG	372
149	GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG	90
373	GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAG	432
89	GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAG	30
433	CTGTGACGT	441
29	CTGTGACGT	21

E. Extracción de ADN genómico de algunas cepas aisladas, caracterizadas como diferentes fenotípicamente.

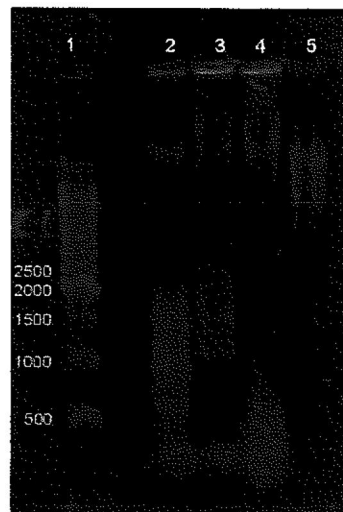


Figura 10. Electroforesis de agarosa al 0,8%. Extracción de DNA genómico. Carril 1: marcador de peso molecular 500 pares de bases (pb); carril 2: PBI.3; carril 3: BM1.1; carril 4: BM1.3; carril 5: BM1.4.

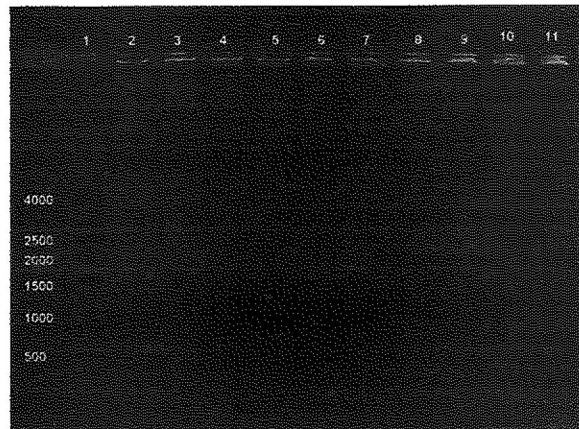


Figura 11. Electroforesis de agarosa 0.8%. Extracción de DNA genómico de las cepas probadas en el ensayo de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo morado, *S. purpuratus*. **Carril 1:** marcador de PM 500 pb; **carril 2:** PB1.5; **carril 3:** BM1.5; **carril 4:** PB1.2; **carril 5:** PB11.1; **carril 6:** PB12.2; **carril 7:** PB13.2; **carril 8:** BM21.1; **carril 9:** BM22.1; **carril 10:** BM24.1; **carril 11:** BM24.2.

F. Condiciones de PCR

Las primeras condiciones de los ciclos del PCR que se probaron fueron las siguientes: 1) ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 2) 35 ciclos consistentes de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, y 72°C por 1 min; y una extensión del último paso consistente de 72°C por 7 min de acuerdo con lo descrito por Lee et al. (2003), y sólo se realizó con el DNA genómico de dos cepas: PB1.3 y BM1.1. El resultado de esta prueba se puede observar en la electroforesis que se muestra en la **Figura 12A**. A pesar de que se observan fragmentos más pequeños que también están amplificando, está presente el fragmento de interés. Debido a esta situación, se decidió aumentar la temperatura de alineamiento 2°C (a 57°C) de tal manera que los oligonucleótidos tuvieran mayor especificidad y evitar que amplificaran fragmentos de menor peso molecular. Como se puede observar en la **Figura 12B**, aunque se aumentaron dos grados de temperatura, no sólo amplificó el fragmento de interés, por lo que en otro PCR se elevó nuevamente la temperatura de alineamiento a 59°C con la finalidad de eliminar los fragmentos de DNA de bajo peso molecular que se observan en la **Figura 13A**. De esta manera se obtuvo sólo el fragmento de 1400 pb. En la **Figura 13B** se muestran los dos fragmentos de interés ya purificados. Una vez establecidas las

condiciones de amplificación del fragmento correspondiente al 16S rDNA, se prosiguió a tratar las muestras restantes utilizando las condiciones de PCR ya establecidas. En la **Figura 14** se muestran los productos de PCR que amplificaron. Sólo se obtuvo el fragmento de interés de las cepas: BM1.3, BM1.4, PB11.1, BM21.1 y BM24.1.

En más PCR realizados con DNA de otras cepas en los que no amplificó el fragmento de interés se cambió un oligonucleótido, utilizando el 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3') que en conjunto con el 27F amplificaron un fragmento de 500 pb aproximadamente. De esta manera se obtuvo el fragmento que amplifica la región del 16S rDNA de las cepas que se probaron en el ensayo de inducción a la metamorfosis (**Figura 15**).

Posteriormente se trataron las muestras de cepas obtenidas de biopelículas asociadas a erizo morado, *S. purpuratus*. Para éstas se volvió a usar el juego de oligonucleótidos 27F y 1522R. En las **Figura 16 y 17** se muestran los productos de PCR de cada una de las muestras, excepto aquellos que corresponden a la cepa PB31.2, que como se puede observar en el carril cuatro de la **Figura 16** no se obtuvo producto de PCR.

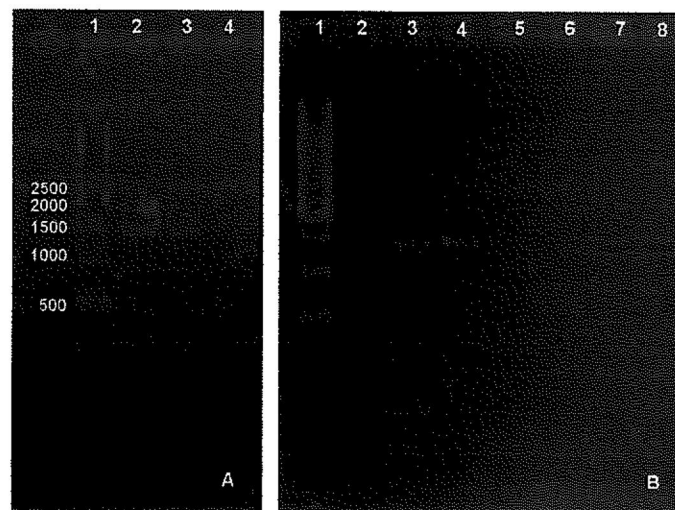


Figura 12. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR. (A) Carril 1: marcador de PM 500 pb; carril 2: PB1.3 (Temp. de alineamiento 55°C); carril 3: BM1.1 (Temp. de alineamiento 55°C); carril 4: control negativo. (B) Carril 1: marcador de PM 500 pb; carril 2: sin muestra; carril 3: PB1.3 (Temp. De alineamiento 57°C); carril 4: BM1.1 (Temp. De alineamiento 57°C) y carril 5: Control negativo; carril 6: sin muestra; carril 7: PB1.3 (Temp. de alineamiento 55°C); carril 8: BM1.1 (Temp. de alineamiento 55°C).

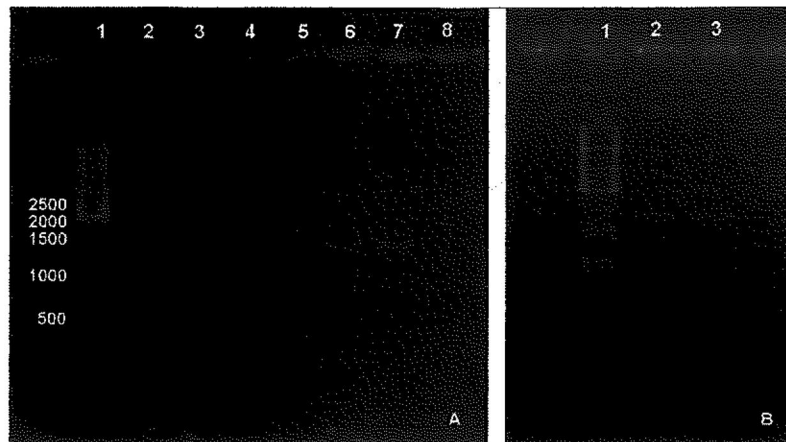


Figura 13. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos PCR. (A) Carril 1: marcador de PM 500 pb; carril 2: PB1.3 (Temp. de alineamiento 59°C); carril 3: BM1.1 (Temp. de alineamiento 59°C); carril 4: Control negativo (Temp. de alineamiento 59°C); carril 5: sin muestra; carril 6: PB1.3 (Temp. de alineamiento 57°C); carril 7: BM1.1 (Temp. de alineamiento 57°C); carril 8: control negativo (Temp. de alineamiento 57°C). (B) Carril 1: marcador de PM 500 pb; carril 2: Producto de PCR de PB1.3 purificado (temp. de alineamiento 59°C); carril 3: producto PCR de BM1.1 purificado (Temp. de alineamiento 59°C).

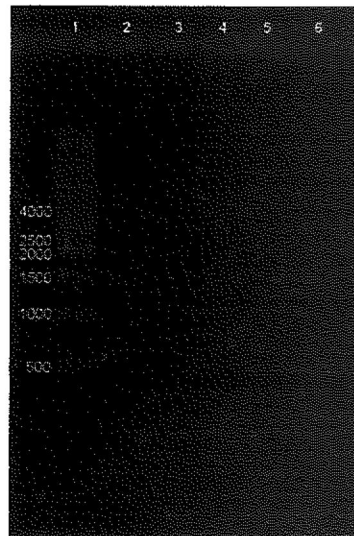


Figura 14. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos PCR purificados. Carril 1: Marcador de peso molecular 500 pb; carril 2: BM1.3; carril 3: BM1.4; carril 4 PB11.1; carril 5: BM21.1 y carril 6: BM24.1

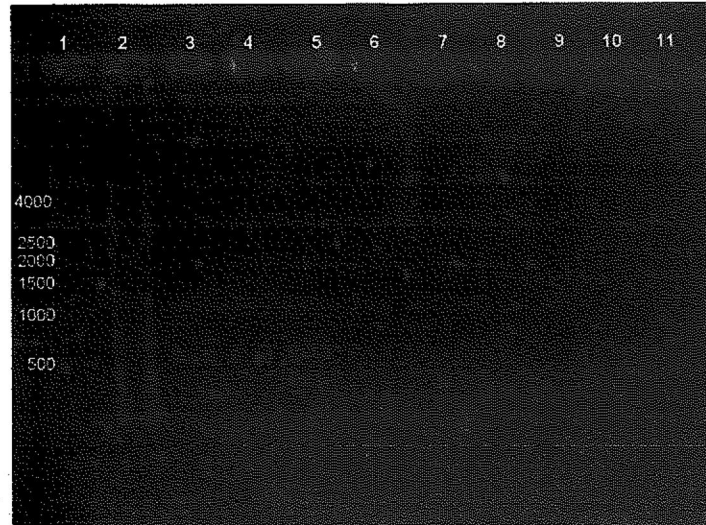


Figura 15. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR. **Carril 1:** Marcador de PM 500 pb; **carril 2:** Marcador de PM de 100pb; **carril 3:** PB1.5; **carril 4:** PB1.2; **carril 5:** PB12.2; **carril 6:** PB13.2; **carril 7:** BM1.5; **carril 8:** BM22.1; **carril 9:** BM24.2; **carril 10:** PB1.4 y **carril 11:** Control negativo.



Figura 16. Electroforesis de agarosa al 0.8%. Productos de PCR. **Carril 1:** Marcador de peso molecular 100 pb; **carril 2:** BM31.1; **carril 3:** BM31.4; **carril 4:** BM32.2; **carril 5:** BM32.3; **carril 6:** BM41.1; **carril 7:** BM42.5 y **carril 8:** Control negativo.

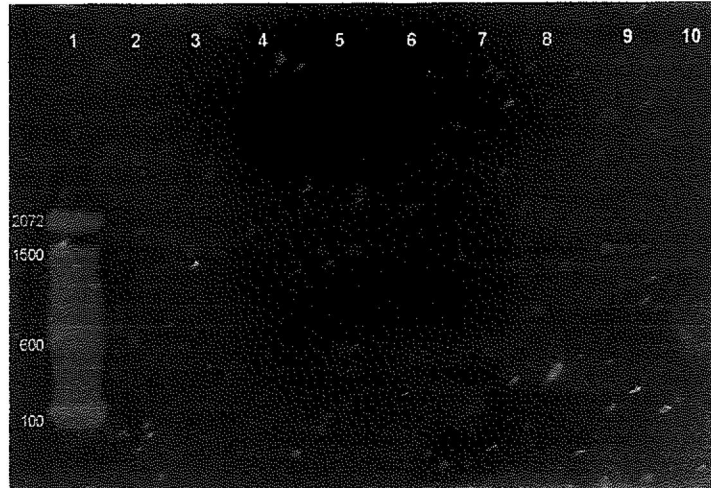


Figura 17. Electroforesis al 0.8%. Productos PCR. **Carril 1:** Marcador de peso molecular 100 pb; **carril 2:** PB11.2; **carril 3:** PB14.2; **carril 4:** PB31.2; **carril 5:** PB31.2; **carril 6:** ER11.2; **carril 7:** ER11.3; **carril 8:** ER12.1; **carril 9:** ER15.1 y **carril 10:** Control negativo.

Por otra parte, en la **Figura 17** se muestran los productos PCR purificados, en los tres primeros carriles se muestran los fragmentos de 500 pb y los cuatro últimos los fragmentos de 1400 pb aproximadamente, en el carril dos se encuentra el producto PCR para la cepa PB31.2 que anteriormente no había podido ser amplificado con el juego de oligonucleótidos 27F y 1522R.

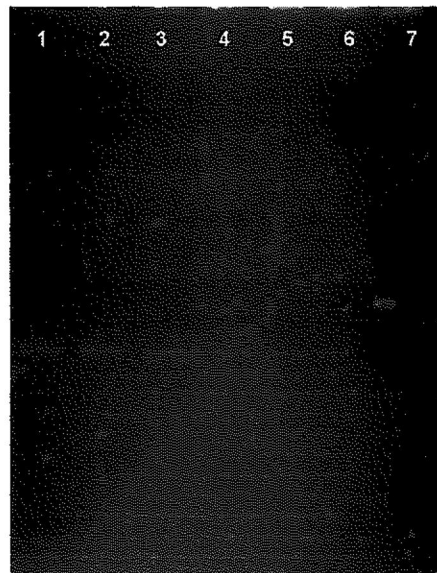


Figura 18. Electroforesis al 0.8%. Productos PCR purificados. **Carril 1:** PB11.2; **carril 2:** PB31.2, **carril 3:** BM31.1; **carril 4:** BM42.3; **carril 5:** ER12.1; **carril 6:** ER12.2 y **carril 7:** O11.2.

11. REFERENCIAS

- Agogué, H., Casamayor, E. O., Bourrain, M., Obernosterer, I., Joux, F., Herndl, G. J. y Lebaron, P. 2005. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 269-280.
- Alsina, M. y Blanch, A. R. 1994. Improvement y update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 719-721.
- Amador-Cano, G. 2007. Cambios morfogenéticos y procesos reguladores en la metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Tesis de Doctorado en Oc. Costera. FCM-UABC. 137 pp.
- Amador-Cano G., Carpizo-Ituarte, E y D. Cristino-Jorge, D. 2006. The role of protein kinase C, G-protein coupled receptors and calcium flux during metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.* 210: 121-131.
- Anguiano-Beltrán, C., Lizárraga-Partida, L. y Searcy-Bernal, R. 2004. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 59: 119-123.
- Berry, A., Janssens, D., Hümbelin, M., Jore, J.P.M., Hoste, B., Cleenwerck, I., Vancanney, M., Bretzel, W., Mayer, A. F., Lopez-Ulibarri, R., Shanmugam, B., Swings, J. y Pasamontes, L. 2003. *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 231-238.
- Blum, L. K., Roberts, m. S., Garland, J. L. y Mill, A. L. 2004. Distribution of microbial communities associated with the dominant high marsh plant and sediments of the United State East Coast. *Microb. Ecol.* 48: 375-388.
- Budsberg, K. J., Wimpee, C. F. y Braddock, J. F. 2003. Isolation and Identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migration Salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6938-6942.
- Cameron, R. A. y Schroeter, S.C. 1980. Sea urchin recruitment: effect of substrate selection on juvenile distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 243-247.
- Carpizo-Ituarte, E. y M.G. Hadfield. 1998. Stimulation of metamorphosis in the polychaete *Hydroides elegans* Haswell (Serpulidae). *Biol. Bull.* 194: 14-24.
- Carpizo-Ituarte, E, Salas-Garza, A y Parés-Sierra, G. 2001. Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de los erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles. *Ciencias Marinas.* 28: 157-166.

- Cota, V. A., Aguilar, M. D. y Romero, M. J. M. 1996. Evaluación de la densidad y biomasa del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y su dictamen técnico biológico de la pesquería para la temporada de pesca d1996-1997. Informe Técnico Interno. 16p.
- Chen, Ping-Hung, Chen, Yung-Hui. y Chen, I-Ming. 2007. Effect of Biofilm age and type on settlement of Cyprids of the barnacle, *Fistulobalanus albicostatus* Pilsbry (Thoracica: Balanidae). Zool. Stud. 46: 521-528.
- Dahmns, Hans-U., Dobretsov, S. y Quian, Pei-Yuan. 2004. The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*. J. Exp. Mar. Biol. 313: 191-209.
- Díaz-Pérez, L. 2006. Inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. UABC. Ensenada, Baja California, México.
- Dobretsov, S. y Quian, Pei-Yuan. 2004. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp in the inhibition of larval settlement. J. Exp. Mar. Biol. 299: 35-50.
- Gatesoupe, F. J., Lambert, C. y Nicolas, J. L. 1999. Patogenicity of *Vibrio splendidus* strain associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. J. Appl. Microbiol. 87: 737-763.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., Novoa, B. y Figueras, A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl. Environ. Microbiol. 71: 98-104.
- Gu, Ji-Doug., Maki, J. S y Mitchell, R. 1996. Microbial biofilms and role in the induction and inhibition of invertebrate settlement. Lab. of Microbiol. Ecol. Harvad University, Marquette University.
- Hadfield, M. G. y Koeht, M. A. R. 2004. Rapid behavioral responses of an invertebrate larva to dissolved settlement cue. Biol. Bull. 207: 28-43.
- Hadfield, M. G. and Paul, V. J. 2001. Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: 431-445. In: McClintonck, J.B. and Baker, B. J. (Eds), Marine Chemical Ecology. CRC Press. Boca Raton, pp 1-610.

- Hadfield, M.G., Carpizo-Ituarte, E., Del Carmen, K., y Nedved, B. T. 2001. Metamorphic competent, a major adaptative convergence in marine invertebrate larvae. *Amer. Zool.* 41: 1123-1131.
- Hansen, G. H. y Sørheim, R. 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *J. Microbiol. Met.* 13: 231-241.
- Harder, T. y Qian, Pei-Yuan. 1999. Induction of larval attachment and metamorphosis in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* by dissolved free aminoacid: isolation and identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 179: 259-271.
- Harder, T., Lam, C y Qian, Pei-Yuan. 2002. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229: 112-112.
- Harrold, C., Lisin, S., Light, K. H y Tudor, S. 1991. Isolating settlement from recruitment of sea urchins. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 147: 81-94.
- Harrison, J.J., Turner, J.R., Marques, R.L.L. y Ceri, H. 2006. Biopelículas, los avances en el conocimiento de estas comunidades microbianas están desencadenando una revolución que puede transformar la microbiología. *Investigación y Ciencia.* 76-83
- Hedlund, B. P. y Stanley, J. T. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 61-66.
- Huang, S. y Hadfield, M. C. 2003. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260: 161-172.
- Ivanova, E. P., Shevchenko, L. S., Sawabe, T., Lysenko, A. M., Svetashev, V. I., Gorshkova., Satomi, M., Christen, R. y Mikhailov, V. V. 2002. *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 263-271.
- Jackson, D., Leys, S. P., Hinman, V. F., Woods, R., Lavin, M. F. y Degnan, B. M. 2002. Ecological regulation of development: Induction of marine invertebrate metamorphosis. *Int. J. Biol.* 46: 679-686.
- Jensen, S., Samuelsen, O. B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C. y Bergh, O. 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus*

- and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Org.* 53: 25-31.
- Johnson, C., Sutton, D.C., Olson, R.R. y Giddins, R. 1991. Settlement of crow-thorns starfish: role of bacteria on surfaces of coralline algae and a hypothesis for deepwater recruitment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71: 143-162.
- Kelly, D. P., Euzéby, J. P., Goodhew, C. F. y Wood, A. 2006. Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strain held by international culture collections. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 56: 2495-2500.
- Lau, S. C. K. y Qian, Pei-Yuan. 2001. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue. *Mar. Biol.* 138: 321-328.
- Lau, S. C. K., Mak, K. K. W., Chen, F y Qian, Pei-Yuan. 2002. Bioactivity of bacterial strains isolated from marine biofilms in Hong Kong waters for the induction of larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226: 301-310.
- Lau, S. C. K., Thiyagarajan, V., Cheung, S.C.K. y Qian, P. Y. 2005. Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrate. *Aqua. Microb. Ecol.* 38: 41-51.
- Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, Tae-Jin., Lee, W. J. y Kim, Y. T. 2004. *Paracoccus haeundaesis* sp. nov., a Gram-negative, halophytic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1699-1702.
- Lee, Y. K., Kwon, Kae-Kyung., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H y Lee, H. K. 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *J. Microbiol.* 41: 183-188.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A. N., Sainz, J. C. y Ascencio-Valle, F. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Org.* 49: 221-226.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J. S. y Kjelleberg, S. 2004. Biofilm development and cell death in the marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3232-3238.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolate of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.

- Molitoris, E., Joseph. S. W., Krichevsky, M. I., Sindhuhardja, W. y Colwell, R. R. 1985. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1388-1394.
- Morgan, L. E., Wing, S. R., Botsford, L. W., Lundquist, C. J y Diehl, J. M. 2000. Spatial variability in red sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) recruitment in northern California. *Fish. Oceanogr.* 9: 83-98.
- Murray, S. N., Ambrose, R.F. y Dethier, M.N. 2002. Methods for performing monitoring, impact and ecological studies on rocky shores. Technical report prepared for the U. S. Department of interior, Minerals Management Service, Pacific OCS Region, Camarillo, California. OCS Study MMS 2001-070. MMS Cooperative Agreement No. 14-35-0001-30761.
- Nealson, K. H., Wimpee, B. y Wimpee, C. 1993. Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian Gulf and Kuwait region with *luxA* probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2684-2689.
- Negri, A. P., Webster, N. S., Hill, R. T. y Heyward. 2001. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 223: 121-131.
- Nocker, A., Lepo, J. E. y Snyder, R. A. 2004. Influence of fan oyster reef on development of the microbial heterotrophic community of an estuarine biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6834-6845.
- Nogales, B., Aguiló-Ferretjans, M. M., Martín-Cardona, C., Lalucat, J. y Bosch, R. 2007. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. *Environ. Microbiol.* 9(8): 1913-1929.
- Palleiro, J. S., Aguilar, D. y Romero, J. M.M. 1995. La pesquería del erizo de mar en Baja California, México. Diagnóstico de la temporada de pesca 1994-1995. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca. (Inédito).
- Pawlik, J. R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30: 273-335.
- Pearce, C. M. y Scheibling, R. E. 1990. Induction of metamorphosis of larvae of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, by coralline red algae. *Biol. Bull.* 179: 304-311.
- Pearse, J. S. 2006. Ecological role of purple sea urchins. *Science.* 314: 940-941.

- Pinhassi, J., Zweifel, U. L. y Hagström, Å. 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3359-3366.
- Pinhassi, J., Winding, A., Binnerup, S. J., Zweifel, U. L., Riemann, B. y Hagström, Å. 2003. Spatial variability in bacterioplankton community composition at the Skagerrak-Kattegat front. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255: 1-13.
- Pommier, T., Pinhassi, J. y Hagström, Å. 2005. Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 79-89.
- Pukall, R., Laroche, M., Kroppensted, R. M., Schumann, P., Stackebrandt, E. y Ulber. *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., an L-serine-dehydratase-producing coccus isolated from the marine bryozoan *Bugula plumosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 53: 443-447.
- Rahmani, M. A. y Ueharai, T. 2001. Induction of metamorphosis and substratum preference in four sympatric and closely related species of sea urchins (Genus *echinometra*) in Okinawa. *Zool. Stud.* 41: 29-41.
- Rico-Mora R., Carpizo-Ituarte, E., Parés-Sierra, G., Salas-Garza, A., Escobar-Fernández, R., De la Rosa-Vélez, J. y Flores-Barillas, L. 2005. Induction to metamorphosis of two species of sea urchins in the presence of microbial biofilms. Congreso Anual of the Society of Integrative and Comparative Biology (SICB). San Diego, CA.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 238-45.
- Rodríguez, R. A. y Epifanio, C. E. 2000. Multiple cues for induction of metamorphosis in larvae of the common mud crab *Panopeus herbstii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 221-229.
- Rodríguez, S. R. Ojeda, F. P. y Inestrosa, N. C. 1993. Review: Settlement of benthic marine invertebrate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 193-207.
- Romanenko, I. A., Zhukova, N. V. Rohde, M. Lysenko, A. M., Mikhailov, V. V. y Erko, S. 2003. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 125-131.
- Rubin, S. J. y Tilton, R. C. 1975. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from wound infections. *J. Clin. Microbiol.* 2: 556-558.

KGF2000 P45 2022|1 |ENS096285 |- |Las pensiones en México: Ley del Seguro Social, Ley del ISSSTE y pensiones privadas. |

GB451.2 D38 2019|1 |ENS096323 |Davidson-Arnott, R. |Introduction to coastal processes and geomorphology / Robin Davidson-Arnott, Bernard Bauer, Chris Houser. |

QH90.8 .B46 E26 2022|1 |ENS096334 |- |Ecology and biodiversity of benthos / edited by Prince S. Godson, Salom Gnana Thanga Vincent, S. Krishnakuma.r |

PQ7085 A58 2013|1 |ENS096407 |- |Antología del cuento latinoamericano del Siglo XXI : las horas y las hordas / Julio Ortega (compilador) ; María Fernanda Lander (asistente editorial). |

HV6025 B3718 2021|1 |ENS096411 |Baratta, Alessandro, |Criminología crítica y crítica del derecho penal : introducción a la sociología jurídico-penal / Alessandro Baratta. |

HD75 W3518 2018|1 |ENS096413 |Wallerstein, Immanuel Maurice, |Impensar las ciencias sociales : límites de los paradigmas decimonónicos / por Immanuel Wallerstein. |

PQ7298.429 .A58 B68 2022|1 |ENS096469 |Salvador, Flor M., |Boulevard / Flor M. Salvador. |

PQ7298.429 .A58 B68 2022|1 |ENS096470 |Salvador, Flor M., |Boulevard / Flor M. Salvador. |

PQ7298.429 .A58 B68 2022|1 |ENS096471 |Salvador, Flor M., |Boulevard / Flor M. Salvador. |

PN2287 .M54547 A3 2023|1 |ENS096477 |McCurdy, Jennette, |Me alegro de que mi madre haya muerto / Jennette McCurdy ; [traductora: Rut Abadía. |

KGF4758 S35 2023|1 |ENS096486 |Sánchez Miranda, Arnulfo |Aplicación práctica del impuesto al valor agregado / Arnulfo Sánchez Miranda. |

KGF4666 M37 2023|1 |ENS096487 |Martínez Gutiérrez, Javier |Estudio práctico legal y fiscal de la subcontratación especializada / Javier Martínez Gutiérrez. |

KGF4629 S352 2023|1 |ENS096489 |Sánchez Miranda, Arnulfo. |Aplicación práctica del ISR : personas morales / Arnulfo Sánchez Miranda. |

HJ4664 L85 2023|1 |ENS096490 |Luna Guerra, Antonio |Resico : estudio práctico régimen simplificado de confianza para personas morales / Antonio Luna Guerra. |

KGF4685 M37 2023|1 |ENS096493 |Martínez Gutiérrez, Javier |Caso práctico de la declaración anual de personas morales 2022 / Javier Martínez Gutiérrez. |

- Salgado-Rangel, M. L., Palleiro-Nayar, J.S., Félix, R.E., Montero, A. D. y Martínez, R. M. 2004. Plan de manejo para la pesquería de erizo rojo de mar *Srongylocentrotus franciscanus* y morado *Srongylocentrotus purpuratus* en Baja California México. CRIP Ensenada-CRIP Mazatlán. 45p (Inédito).
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M, Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H., Vauterin, L., Ward, A. y Whitman, W. 2002. Report of the hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.
- Stackebrandt, E y Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. y Christen. 1998. *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolitic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 573-580.
- Seo, H. J., Bae, S. S., Lee, Jung-Hyun y Kim, Sang-Jin. 2005, *Phothobacterium frigidiphilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1661-1666.
- Shikuma, N. J. y Hadfield, M. G. 2006. Temporal variation of and initial marine biofilm community and its effects on larval settlement and metamorphosis of the tubeworm *Hydroides elegans*. *Biof.* 1-8.
- SüB, J., Herrmann, K., Seidel, M., Cypionka, H., Engelen, B. y Sass, H. 2007. Two distinct *Phothobacterium* populations thrive in ancient Mediterranean sapropels. *Microbiol. Ecol.* DOI:10.1007/s00248-007-9282-6.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. y Muroga, K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of necrosis of Japanese oyster. *Dis. Aquat Org.* 33: 111-118.
- Tamura K., Dudley J., Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thomson. R., Macpherson, H. L., Riaza, A. y Birkbeck, T. H. 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *J. Appl. Microbiol.* 99: 243-250.

- Thompson, F. L., Thompson, C.C., Naser, S., Hoste., B., Vandemeulebroecke, K., Munn, C., Bourne, D. y Swings, J. 2005. *Phothobacterium rosenbegii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. no., vibrios associated with coral bleaching. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 913-917.
- Unabia C. y Hadfield, M.G. 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. Mar. Biol. 133: 55-64.
- Vasquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J. y García-Ortega, A. M. 2004. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés, *Crassostrea gigans* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. Ser. Zool. 75: 237-243.
- Vera, J., Álvarez, R., Murano., E., Slebe, J. C. y León, O. 1998. Identification of a marine agarolitic *Pseudoalteromonas* isolated and Characterization of its extracellular agarase. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4378-4383.
- Webster, N. S. y Negri, A. P. 2006. Site-specific variation in Antarctic marine biofilm established an artificial surface. Appl. Environ. Microbiol. 8: 1177-1190.
- Webster, N. S., Smith, L.D., Heyward, A. J., Watts, J. E. M., Webb, R. I., Blackall, L.L. y Negri, A. P. 2004. Metamorphosis of a Scleractinian coral in response to microbial biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1213-1221.
- Williamson, J. E., De Nys, R., Kumar, N., Carson, D. G. y Steinberg, P. D. 2000. Induction of metamorphosis in the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from the algal host *Delinea pulcra*. Biol. Bull. 198: 332-345.
- Yannarell, A. C., Kent, A. D., Lauster, G. H., Kratz, T. K. y Triplett, E. W. 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. Ecol. Microbiol. 46: 391-405.
- Zorrilla, I., Morifiigo, M.A., Castro, D., Balebona, M.C. y Borrego, J. J. 2003. Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated recovered from cultured fish in Spain. J. Appl. Microbiol. 95: 1106-1116.