

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



**"DINÁMICA DE LAS PELÍCULAS BACTERIANAS QUE
PARTICIPAN EN LA INDUCCIÓN DE LA METAMORFOSIS EN EL
ERIZO DE MAR (*Strongylocentrotus purpuratus*)"**

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

YADIRA YUMIKO DE LA CRUZ RODRÍGUEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO, 2010

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

**DINÁMICA DE LAS PELÍCULAS BACTERIANAS QUE
PARTICIPAN EN LA INDUCCIÓN DE LA METAMORFOSIS EN EL
ERIZO DE MAR (*Strongylocentrotus purpuratus*)**

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

YADIRA YUMIKO DE LA CRUZ RODRÍGUEZ

Aprobada por:



Dra. Roxana Rico Mora
Director de tesis



Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte
Sinodal



Dra. Irma E. Soria Mercado
Sinodal

DEDICATORIA:

A mi amado **ALEJANDRO:**

Por ayudarme a alcanzar esta meta, que en un principio era un sueño y se convirtió en un proyecto de los dos. Por brindarme el ejemplo de sabiduría, paciencia, humildad, valor, amor, ternura y muchas virtudes más. Nunca terminaría de describir todo lo que representas para mí, eres el ser más maravilloso del mundo pues haces que mi vida sea mejor en todos los sentidos.

Cuando alguien verdaderamente encuentra una persona especial, se acaba de encontrar una gran riqueza, las personas especiales son tesoros que no cualquier persona los encuentra y menos tiene la dicha de poseerlos por mucho tiempo.

Así que te digo: **GRACIAS POR SER MI TESORO.**

TE AMO.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, José Manuel de la Cruz Salazar y Cristina Rodríguez Jiménez por su amor infinito y su apoyo incondicional.

A mis hermanos María Concepción, José y María Guadalupe por ser símbolo de la unión familiar.

A mis sobrinos José Manuel, Nora Virginia, Nohemí del Carmen, Jesús Alejandro, José Jared, Mayhem Sherlyn, Christopher Josafath, Eowin Sarahí, Luis Adrián y Nohema Alejandra por ser la alegría de la familia.

A Alejandra Monserrat, Luisa Paulina y Alejandro por brindarme momentos tan hermosos y formar parte de mi corazón.

A la Dra. Roxana Rico Mora por compartir sus conocimientos y por su enorme paciencia.

A el Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte por todo su apoyo en la realización de la tesis.

A la Dra. Irma E. Soria Mercado por sus acertadas observaciones.

A la Dra. Yolanda Schramm Urrutia por sus valiosas aportaciones en la construcción del árbol filogenético.

Al grupo de trabajo de Ecología y Biología del Desarrollo, por su ayuda y sugerencias, en especial al M. C. Roberto Escobar, Monserrat, Leopoldo y Raquel. A Amayaly por su disposición a las consultas.

Un agradecimiento muy especial a Miryam Juárez Fonseca, Denisse Sánchez Pérez y Horacio Martínez, por ser mi familia durante la maestría, ya que prácticamente me adoptaron. Gracias por su cariño y compañía, no existe moneda que pague absolutamente todo lo que hicieron por mí.

A mis compañeros y amigos: Antonio, Carlos, Daniel, Eduardo, Gabriel, Gandhi, Jacob, Julieta, Karina Xolaltenco, Román y Yesika, por cada uno de los momentos tan agradables que compartimos, soy muy afortunada de haberlos conocido.

A Manuela Rodríguez Sánchez y Josefina Guzmán Casillas por su amistad, apoyo y consejos en los momentos difíciles.

A mis amigos del Zig-Zag: Itza Tlaloc, Silvia, Juan Pablo, Iván Saúl, Iván Santamaría, Angélica, Bertha, Esteban, Carmen y al Profesor Huberto por ser maravillosos compañeros de trabajo y por todo su apoyo.

Al M.B.E. Alejandro Alvarado Gutiérrez del Área de Microscopía de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

A la secretaria de posgrado Angélica Arce por todas sus atenciones.

Proyectos: 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).

A CONACYT por la beca otorgada durante dos años, con el número de registro 201030.

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

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. HIPÓTESIS.....	8
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo General:.....	8
4.2 Objetivos Particulares:	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1 Obtención de organismos.....	9
5.2 Producción y mantenimiento de larvas.	9
5.3 Formación de biopelículas.	9
5.4 Ensayos de inducción a la metamorfosis.	10
5.5 Análisis estadístico de los resultados de inducción a la metamorfosis.	10
5.6 Cuantificación de bacterias en las biopelículas.	11
5.6.1. Conteo directo.	11
5.6.2. Conteo viable en placa.	11
5.7 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas.	12
5.8 Pruebas bioquímicas.	12
5.9 Preservación y almacenamiento de las cepas.....	12
5.10 Caracterización molecular.	13
5.10.1. Extracción de ADN genómico.	13
5.10.2. Análisis de ADN.	13
5.10.3. Amplificación de 16S rADN.	13
5.10.4. Secuenciación de los productos PCR.....	14
5.10.5. Alineamiento de las secuencias.	14
5.10.6. Elaboración de árbol filogenético.	14
6. RESULTADOS.....	15
6.1 Ensayos de inducción a la metamorfosis con erizo blanco.....	15
6.2 Ensayo de inducción a la metamorfosis con erizo morado.....	17
6.3 Cuantificación de bacterias en las biopelículas	18
6.3.1 Ensayo con erizo blanco.	18
6.3.2 Ensayo con erizo morado.	23
6.3.2.1 Conteo Directo.....	23
6.3.2.2 Conteo viable en placa.	26
6.3.2.3 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de agua de mar y erizo morado.	30
6.3.2.4 Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa.....	31
6.3.2.5 Análisis genético de las cepas morfológicamente diferentes.....	31

6.3.2.6 Amplificación del 16S rDNA.	31
6.3.2.7 Identidad genética de las cepas obtenidas de biopelículas con las secuencias de géneros de bacterias marinas.....	32
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIONES	43
9. ANEXOS	44
10. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Cepas de bacterias aisladas en cada uno de los días de formación de biopelículas generadas en presencia de sólo agua de mar.	30
Tabla II. Cepas de bacterias aisladas en cada uno de los días de formación de biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos.	30
Tabla III. Características de cepas de bacterias encontradas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de agua de mar.	50
Tabla IV. Características de las cepas de bacterias encontradas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado.	51
Tabla V. Afiliación filogenética de cada una de las cepas analizadas molecularmente.	33
Tabla VI. Cepas de bacterias aisladas e identificadas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y en erizos morados adultos.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco a las 24, 48 y 72 horas de exposición a biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos (EB) y biopelículas formadas en sólo agua de mar (AM).	15
Figura 2.- Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo morado a las 24, 48 y 72 horas de exposición a biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos (EM) y biopelículas formadas en sólo agua de mar (AM).	17
Figura 3. Concentración de bacterias en los diferentes días de formación de las biopelículas generadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo blanco (UFC cm ⁻²).	19
Figura 4. Número de cepas encontradas en cada una de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y en presencia de erizos blancos para cada uno de los días de formación de las películas.	20
Figura 5. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de generación de las biopelículas formadas en sólo agua de mar y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.	21
Figura 6. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de generación de las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas.	22
Figura 7. Concentración de bacterias en número de células cm ⁻² en los diferentes días de generación de las biopelículas formadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo morado.	23
Figura 8. Sucesión de bacterias durante los 7 días de generación de las biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y en presencia de adultos de erizo morado.	24-25
Figura 9. Concentración de bacterias en UFC cm ⁻² en los diferentes días de generación de las biopelículas formadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo morado.	26
Figura 10. Número de cepas encontradas en cada una de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y en presencia de erizos morados adultos para cada uno de los días de formación de las películas.	27
Figura 11. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de formación de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.	28
Figura 12. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de formación de las biopelículas generadas en presencia de erizos adultos y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.	29

	Página
Figura 13. Relación genética entre 36 cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado y en sólo agua de mar por el método del vecino más cercano (Neighbour-joining).	35
Figura 14. Electroforesis en agarosa 0.8%. Extracción de DNA genómico de algunas de las cepas obtenidas de biopelículas generadas en presencia de adultos de erizo morado.	46
Figura 15. Electroforesis en agarosa 0.8%. Productos PCR purificados, fragmentos de aproximadamente 700 pb.	47
Figura 16. Colonias desarrolladas por las cepas de bacterias aisladas en biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar.	48
Figura 17. Colonias desarrolladas por las cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en presencia de erizo morado.	49
Figura 18. Tinción Gram de los diferentes tipos de formas celulares observadas en las cepas de bacterias aisladas de las biopelículas.	52

RESUMEN

Las biopelículas son agregaciones de microorganismos, principalmente bacterias, que juegan un papel fundamental en los procesos de inducción e inhibición del asentamiento y metamorfosis en larvas de invertebrados marinos. En erizo de mar se ha observado que los porcentajes de inducción a la metamorfosis son mayores en determinada etapa de formación de las biopelículas. El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios temporales en la composición y concentración de bacterias en los primeros 7 días de generación de una biopelícula y determinar si la inducción a la metamorfosis del erizo de mar depende de la composición y concentración de bacterias presentes en la biopelícula. Se realizaron dos ensayos de formación de biopelículas: uno con erizo blanco (*Lytechinus pictus*) y otro con erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*). Para la formación de las biopelículas, diariamente se introdujeron cajas de pozos múltiples en un acuario con erizos adultos y, en otro con sólo agua de mar. Esto se hizo para determinar si las diferencias están relacionadas con la presencia de erizos adultos. La inducción a la metamorfosis se realizó por triplicado en cajas de pozos múltiples donde se formaron las biopelículas. Como control positivo se usó KCl y como control negativo se usó agua de mar filtrada y esterilizada (AMFE). La inducción a la metamorfosis se evaluó por observación en un microscopio estereoscópico a las 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se tomó una muestra de un cm² de las biopelículas para realizar un conteo viable de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias (UFC). En el ensayo con erizo morado, se introdujeron portaobjetos estériles para observar la evolución en la formación de la biopelícula y realizar un conteo celular directo (células/cm²) mediante análisis de fluorescencia. Una vez realizados los conteos, se caracterizó cada una de las colonias diferentes de acuerdo a su morfología y se aislaron para identificarlas mediante la amplificación del gen 16S rDNA. En el ensayo con erizo blanco el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis en las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos se presentó al sexto día (50.1%). Una respuesta semejante se presentó con las formadas en sólo agua de mar (52%) y en el control positivo (52.5). En el ensayo con erizo morado el mayor porcentaje de metamorfosis en las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos se presentó al tercer día (43.5%), mientras que en los ensayos de biopelículas formadas en agua de mar se presentó al cuarto día (8.9%). El porcentaje de metamorfosis en el control positivo fue 53.7% mientras que en el control negativo fue de sólo 2.8%. En el conteo directo se registró una mayor concentración de células (de 2 a 10 veces) en biopelículas generadas en estanques con adultos de erizo morado que en biopelículas formadas en estanques con sólo agua de mar. Al igual que con los valores de metamorfosis la mayor concentración celular se registró en las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos, sin embargo la concentración de bacterias en el día de mayor inducción a la metamorfosis fue hasta tres veces menor que en otros días de generación de biopelículas en presencia de erizo morado. En este ensayo, el conteo viable sólo representó del 1-18% del conteo directo. De acuerdo con las pruebas moleculares, las cepas de bacterias pertenecen a los géneros *Alteromonas* sp, *Pseudidiomarina* sp, *Sulfitobacter* sp, *Staphylococcus saprophyticus*, *Maribacter ulvicola*, *Pseudoalteromonas* sp, *Rhodococcus* sp, *Microbacterium* sp, *Planomicrobium* sp, *Marinomonas* sp y *Glaciecola* sp, *Roseobacter* sp, *Sphingomonadaceae* sp, *Sphingopyxis* sp, *Cytophaga* sp, *Rhodobacteraceae* sp, *Marinobacter* sp, y *Flavobacteriaceae* sp. Los géneros *Cytophaga* sp, *Rhodobacteraceae* sp se encontraron solo en el día de mayor inducción.

1. INTRODUCCIÓN

El erizo de mar es un invertebrado bentónico que pertenece a la clase *Equinoidea* del filum *Equinodermata*; se han descrito 950 especies de erizo las cuales habitan en las grietas de las rocas, principalmente en la zona intermareal y a profundidades de entre 10 y 30 m (Palleiro, 1982). Dos especies comunes en las costas de Baja California son el erizo blanco (*Lytechinus pictus*) que se distribuye desde las costas de California hasta las Islas Galápagos en el Océano Pacífico y desde Bermuda hasta Brasil en el Océano Atlántico (Zigler y Lessios, 2004) y el erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*), el cual tiene una distribución geográfica desde Alaska, E.U. hasta la Isla de Cedros, Baja California (Palleiro, 1982). El erizo morado se captura con fines principalmente comerciales y tanto el erizo morado como el blanco se utilizan como modelo biológico en la investigación científica.

El erizo blanco mide menos de 4 cm de diámetro de caparazón y presenta espinas cortas (Allen, 1980 citado por Cardoso-Martínez, 2008); el erizo morado no excede de 9 cm de diámetro y presenta espinas pequeñas no mayores a 2.5 cm de longitud (Palleiro, 1982). Ambos alcanzan la madurez sexual durante el segundo año de vida y pueden llegar a vivir más de 30 años.

Los óvulos y espermatozoides se liberan en el agua de mar, donde se produce la fertilización, por lo que el desarrollo es externo y el embrión es planctónico. Progresivamente, el embrión inicial se va transformando en una larva planctónica denominada equinopluteus, que presenta 4 pares de brazos larvarios alargados (Ruppert y Barnes, 1996). La larva equinopluteus puede nadar y alimentarse durante varios meses hasta alcanzar su competencia metamórfica, la cual se caracteriza por el desarrollo del rudimento juvenil, lo que indica que la larva está preparada para el asentamiento y la metamorfosis.

El asentamiento está definido como el comportamiento realizado cuando una larva pelágica deja el plancton, desciende al bentos, y se mueve sobre un sustrato con o sin acoplamiento a él. Para todas las larvas, la metamorfosis incluye la pérdida de los órganos específicos de la larva, los cuales utiliza para el nado planctónico y emergen las estructuras específicas de un juvenil/adulto (Hadfield y Paul, 2001; Hadfield *et al.*, 2001).

Las larvas de muchas especies de invertebrados bentónicos son influenciadas por señales físicas (hidrodinámica y varios factores incluyendo la salinidad, temperatura, luz y topografía de los sustratos) y químicas (originadas de adultos con-específicos, los organismos presa, o superficies de los sustratos) para el asentamiento y metamorfosis en sitios apropiados para el crecimiento de juveniles y su reproducción (Crisp, 1974; Butman, 1987; Pawlik, 1992; McEdwards, 1995; Rodríguez *et al.*, 1993; Fusentani, 2004).

Otro origen de señales para el asentamiento larval son las biopelículas, las cuales han sido ampliamente reconocidas como necesarias para el asentamiento de algunas larvas de invertebrados (Zobell y Allen, 1935). En algunos casos, tipos específicos de bacterias presentes en las biopelículas pueden ser las responsables de facilitar el asentamiento (Hadfield *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1997; Unabia y Hadfield, 1999) y los productos químicos atrapados o liberados de las bacterias pueden funcionar como inductores de asentamiento (Hadfield y Paul, 2001)

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que cubren superficies sólidas submareales e intermareales tales como rocas, barcos, lazos, animales marinos y algas (Lee *et al.*, 2003). Los organismos predominantes son bacterias, algas, hongos, protozoarios y diatomeas inmersos en una gruesa capa de sustancias poliméricas extracelulares (Lawrence *et al.*, 1991) las cuales pueden proveer protección contra el estrés ambiental ocasionado por una variedad de factores tales como radiación UV, cambios de pH, choque osmótico y desecación (Mayer, 1999).

La formación primaria de la biopelícula se ha reportado que sucede por medio de una secuencia ordenada de pasos: 1) etapa de acondicionamiento inicial; 2) atracción química de bacterias móviles; 3) absorción reversible de bacterias móviles y no móviles, en esta etapa las bacterias están sostenidas sólo débilmente en la superficie sólida y son removidas fácilmente; 4) etapa irreversible de acoplamiento por medio de polímeros bacterianos extracelulares, los cuales pueden ser polisacáridos y glicoproteínas (Marshall *et al.*, 1971) y 5) etapa final del desarrollo de microflora secundaria (Cundell y Mitchell, 1977 citado por Mitchell y Kirckman, 1984). Las primeras cuatro etapas ocurren muy rápidamente y se completan en horas, mientras que el desarrollo de la microflora secundaria puede tomar días o semanas (Mitchell y Kirckman, 1984). Durante la formación de la biopelícula, una sucesión de diferentes especies puede ser influenciada por las características físico-químicas y biológicas del ambiente en el cual se está desarrollando (Wimpenny, 2000; Atlas y Bartha, 2002).

Las bacterias colonizadoras primarias desempeñan papeles críticos en formar la estructura y determinar la función de la biopelícula madura a través del establecimiento del ensamblaje de colonización superficial inicial, con la modificación de las propiedades fisicoquímicas superficiales que hacen la superficie más (o menos) conveniente para el reclutamiento de colonizadores posteriores (Dang y Lovell, 2002).

2. ANTECEDENTES

A través de diversas investigaciones se ha evidenciado que las biopelículas desempeñan un papel importante en el asentamiento y metamorfosis larval de diferentes invertebrados marinos y se ha intentado descubrir las posibles razones que contribuyen a su eficacia (Johnson *et al.*, 1991; Keough y Raimondi, 1995; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Hadfield y Paul, 2001; Huang y Hadfield 2003; Qian *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2009).

Diferentes especies de invertebrados responden a biopelículas de diferentes especies bacterianas que son comunes en muchos sustratos (Johnson *et al.*, 1997). También se ha observado que algunos invertebrados tienen preferencia por cierto tipo de biopelículas, por ejemplo, las larvas de invertebrados sésiles pueden distinguir entre biopelículas de composición, condición fisiológica y fase de crecimiento diversas (Wieczorek y Todd, 1998), sugiriendo que los microorganismos sirven como indicador importante para las larvas que buscan un sustrato conveniente. Keough y Raimondi (1995) notaron que el reclutamiento de diferentes invertebrados sésiles está correlacionado con la edad de la biopelícula, por lo que realizaron un ensayo en el cual generaron películas por 1, 3 y 6 días, y observaron que éstos tenían preferencia por la biopelícula con 6 días de formación. Resultados similares fueron obtenidos por Qian *et al.*, (2003) en un experimento con *Balanus amphitrite*. Otro organismo, el mejillón *Mytilus galloprovincialis* también tiene una respuesta de asentamiento y metamorfosis a biopelículas que se incrementa significativamente con la edad de la biopelícula (Bao *et al.*, 2007). Shikuma y Hadfield (2006) observaron la respuesta de inducción a la metamorfosis del poliqueto *Hydroides elegans* con biopelículas de 2 a 12 días de generación. El mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis se presentó entre los días 6 y 12 alcanzando hasta un 99% de larvas metamorfoseadas, lo cual asociaron con la densidad bacteriana de la biopelícula, ya que en este mismo estudio se observó un incremento en la densidad con respecto al tiempo de generación. En el trabajo realizado por Hadfield *et al.*, (1994) encontraron que el asentamiento de las larvas de *Hydroides*

elegans requiere una densidad microbiana mínima, y el porcentaje de asentamiento larval se correlaciona con la densidad bacteriana en biopelículas naturales formadas por varias especies de bacterias, algas filamentosas, diatomeas y hongos. Huang y Hadfield (2003) mencionan que una biopelícula altamente inductiva se puede obtener sumergiendo un sustrato, como una lámina de vidrio o un pedazo de malla de plástico, por 3 o más días en el flujo de agua de mar natural en condiciones de laboratorio, y encontraron que la densidad de la biopelícula es comparable a una biopelícula de 1 a 3 días en Pearl Harbor, Hawai en condiciones naturales (Hadfield *et al.*, 1994).

Con relación a la estructura de la biopelícula, diversos estudios se han llevado a cabo para determinar la composición bacteriana en las etapas tempranas de las biopelículas. Uno de ellos consistió en la formación de biopelículas en laminillas de vidrio con 3 y 6 días de incubación. Las bacterias colonizadoras en las laminillas fueron identificadas molecularmente amplificando el DNA de la región que codifica para el rRNA 16S ó 23S para identificar los grupos filogenéticos específicos. Las α -*Proteobacteria* fueron los organismos colonizadores más abundantes en la superficie. Más del 28% de las células bacterianas totales fueron afiliadas con el grupo marino *Rhodobacter* (Dang *et al.*, 2002).

Lau y Qian (2001) realizaron un ensayo con películas monoespecíficas de 2 bacterias aisladas de biopelículas de formación temprana (24 h), las cuales fueron identificadas como *Roseobacter* y *Proteobacteria*. En este ensayo observaron que larvas de *Hydroides elegans* respondieron a la inducción de asentamiento de manera similar, sugiriendo que la señal para el asentamiento larval que proviene de estas bacterias puede compartir características comunes. Al tratar las monopelículas con un agente fijador, notaron que éste eliminó completamente la actividad inductora de la metamorfosis larval de las películas bacterianas, mientras que al realizar un tratamiento con antibiótico, éste redujo el porcentaje del asentamiento larval en las películas bacterianas en una manera dependiente de la concentración del antibiótico. En otro estudio similar, realizado por Bao *et al.*, (2007) para observar la respuesta de asentamiento y metamorfosis de mejillón

Mytilus galloprovincialis, se utilizaron agentes de fijación (formalina y glutaraldehído), calor, etanol, irradiación ultravioleta y tratamientos con antibióticos en las biopelículas, y notaron una reducción o pérdida significativa de la actividad inductora. Por lo que ambos estudios sugieren que la señal de asentamiento larval se asocia con la superficie de la célula bacteriana y que el efecto inductor al asentamiento larval de la bacteria se correlaciona con la viabilidad de las bacterias.

En diversos estudios se ha sugerido la influencia de la comunidad bacteriana en el asentamiento y metamorfosis. Lau *et al.*, (2005), analizaron el efecto de la temperatura en la composición de la comunidad bacteriana durante el desarrollo de biopelículas y la respuesta de larvas del poliqueto *Hydroides elegans* y 2 especies de balanos (*Balanus amphitrite* y *B. Trigonus*). El asentamiento larval de *B. amphitrite* y *B. trigonus* fue inducido por biopelículas desarrolladas a altas temperaturas (23 y 30°C), sin embargo biopelículas formadas a bajas temperaturas (16°C) no indujeron (*B. amphitrite*) o inhibieron (*B. trigonus*) el asentamiento larval. La respuesta de asentamiento de estos balanos no estuvo correlacionada con la biomasa o la densidad de las biopelículas, pero coincidió con diferencias marcadas en la composición de la comunidad bacteriana entre biopelículas desarrolladas a diferentes temperaturas. La respuesta de asentamiento de *Hydroides elegans* se correlacionó moderadamente con la densidad bacteriana, pero no hubo relación aparente con la composición de la comunidad bacteriana de las biopelículas. Por lo que estos autores sugieren que la composición de la comunidad microbiana y la densidad de bacterias en las biopelículas, las cuales pueden variar con las condiciones ambientales locales, determinan que las larvas de las 2 especies de balanos e *Hydroides elegans*, respectivamente, puedan distinguir entre hábitats con diferentes condiciones ambientales.

Durante los últimos años, en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO, se ha experimentado con el papel que desempeñan la biopelículas en la inducción a la metamorfosis de tres especies de erizo de mar, que incluyen el erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*), el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*)

y el erizo blanco (*Lytechinus pictus*). Los resultados iniciales han mostrado, que tanto cepas bacterianas obtenidas en el laboratorio como de pozas del intermareal con presencia de erizos, son capaces de inducir a la metamorfosis (Díaz-Pérez, 2006; Cardozo-Martínez, 2008; Santiago-González, 2008). Sin embargo, si bien se han aislado algunas cepas que resultan inductoras de la metamorfosis (Ver; Santiago-González, 2008), todavía no se han determinado las características de la evolución de la biopelícula a lo largo del periodo, ésta funciona como inductora de la metamorfosis.

Por lo tanto, la presente investigación planteó documentar los cambios en la composición y concentración de bacterias durante los primeros días de formación de la biopelícula y contrastar esta sucesión con su capacidad inductora de la metamorfosis de larvas de erizo blanco, *Lytechinus pictus* y erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*.

3. HIPÓTESIS

Considerando que existe una sucesión de bacterias en las biopelículas, las larvas de erizo de mar serán inducidas a la metamorfosis dependiendo de los cambios en la composición y concentración bacteriana de la biopelícula, en los primeros 7 días de formación de la misma.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Determinar los cambios temporales en la composición y concentración de bacterias en los primeros 7 días de formación de una biopelícula y determinar si la inducción a la metamorfosis del erizo de mar depende del tipo y concentración de bacterias presentes en la biopelícula.

4.2 Objetivos Particulares:

- a. Determinar cómo varía la composición y concentración de bacterias durante los primeros 7 días de formación de una biopelícula a temperaturas entre 18 y 20 °C.
- b. Determinar en qué día de formación de la biopelícula hay una mayor inducción a la metamorfosis.
- c. Determinar si la inducción a la metamorfosis depende de la concentración y/o composición de bacterias en la biopelícula.
- d. Identificar las bacterias encontradas en las biopelículas de 1-7 días de formación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de organismos.

Los ejemplares de erizo morado (*S. purpuratus*) adultos fueron colectados en Bajamar, al norte de Ensenada, Baja California, México (latitud 31°58'49"N, longitud 116°47'38"W) en diciembre de 2007 y los de erizo blanco (*L. pictus*), en la Isla Todos Santos, Ensenada, Baja California, México (latitud 31 50'23"N, longitud 116 38'18"W) en octubre de 2007.

5.2 Producción y mantenimiento de larvas.

Las larvas de las dos especies de erizo utilizadas en los ensayos se produjeron siguiendo la metodología descrita por Carpizo Ituarte *et al.*, (2002) y Díaz-Pérez (2006). Una vez que alcanzaron el estadio de prisma, las larvas se colocaron en estanques cónicos de 45 L con aireación continua y estuvieron a una temperatura de 16 a 19°C durante el periodo de cultivo. La densidad de las larvas en los estanques fue de 2 larvas ml⁻¹ y como alimento se les proporcionó diariamente 500 mL de microalga *Rhodomonas* sp. El recambio de agua en los estanques se realizó de acuerdo con la rutina de limpieza descrita por Díaz-Pérez (2006) y fue del 50% del volumen del agua diariamente y el 100% cada tercer día.

5.3 Formación de biopelículas.

Para la generación de las biopelículas se utilizaron dos acuarios de 40 litros con un sistema de flujo de agua de mar continuo (1.5L min⁻¹). Uno de los acuarios contenía un grupo de 15 erizos adultos y el otro acuario no contenía erizos, solo agua de mar con el mismo sistema de flujo de agua de mar que el anterior. Esto se hizo para determinar si existían diferencias en la composición y concentración de bacterias en las biopelículas relacionadas con la presencia de los erizos adultos. En ambos acuarios se introdujeron cajas de seis pozos (BD Falcon, CAT EF2489OQ Daigger) estériles para que se formaran biopelículas de 1 a 7 días.

Se realizaron dos ensayos de formación de biopelículas, uno con erizo blanco y otro con erizo morado. Durante el ensayo con erizo morado, también se introdujeron 2 portaobjetos estériles en cada acuario para observar la evolución en la formación de la biopelícula y realizar el conteo celular directo en un microscopio invertido Carl Zeiss AXIOVERT 200M con sistema confocal. Los portaobjetos fueron lavados con etanol absoluto y esterilizados en cámara UV antes de ser colocados en los acuarios.

5.4 Ensayos de inducción a la metamorfosis.

Los ensayos de inducción a la metamorfosis se realizaron en las cajas de seis pozos en las que se generaron las biopelículas de 1 a 7 días. Previo al ensayo, las cajas fueron enjuagadas tres veces con agua de mar filtrada hasta $0.2\ \mu\text{m}$ y esterilizada en autoclave (AMFE) para remover heces u otras partículas depositadas en los pozos. Para el ensayo, en cada pozo se adicionaron 5 mL AMFE y se colocaron de 20 a 30 larvas competentes. Se tuvieron 3 réplicas por tratamiento. Como control positivo las larvas fueron inducidas a la metamorfosis en presencia de KCl (100 mM por 15 min), después del cual, la solución se sustituyó por AMFE de acuerdo con lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.*, (2002). Como control negativo las larvas se colocaron solo en agua de mar filtrada hasta $0.2\ \mu\text{m}$ y esterilizada.

La evaluación del porcentaje de inducción a la metamorfosis se realizó mediante observación en un microscopio estereoscópico Carl Zeiss, a las 24, 48 y 72 horas de introducir las larvas a los pozos experimentales. Las larvas se consideraron metamorfoseadas cuando presentaron la morfología característica de la post-larva, la cual se asemeja a un erizo adulto, con las espinas juveniles desplegadas y utilizando los pies ambulacrales para desplazarse (Carpizo-Ituarte *et al.*, 2002).

5.5 Análisis estadístico de los resultados de inducción a la metamorfosis.

Para realizar las pruebas estadísticas, los datos de porcentaje de metamorfosis fueron transformados con la función arco-seno. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías ($\alpha = 0.05$). Cuando

las pruebas de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas no se cumplieron (pruebas q-q y Kolmogorov-Sminov, respectivamente), se realizó un ANOVA por rangos de Kruskal-Wallis. Para realizar las comparaciones múltiples se utilizaron las pruebas de mínimos cuadrados (Fisher's LSD) y Student-Newman-Keuls (SNK); todo lo anterior con ayuda del programa SigmaStat 2.03.

5.6 Cuantificación de bacterias en las biopelículas.

5.6.1. Conteo directo.

Los portaobjetos en los cuales se formaron las biopelículas de 1 a 7 días fueron enjuagados con AMFE y preservados en 10 mL de solución fijadora (glutaraldehído 3.7%). Para su observación en el microscopio, se utilizó el fluorocromo DAPI. La solución de montaje fue glicerol al 50% con PBS pH 7 a una concentración 0.1 M (buffer de fosfatos). Para determinar la concentración de bacterias por cm^2 de biopelícula (cels cm^{-2}) se cuantificaron al azar 16 campos de un área de $4.8204 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$, y el valor promedio se multiplicó por 2.074516×10^4 , factor de conversión para el área del filtro.

5.6.2. Conteo viable en placa.

Las cajas de seis pozos con biopelículas de 1 a 7 días de formación, utilizadas en los ensayos de inducción a la metamorfosis fueron enjuagadas con AMFE. El muestreo se realizó en el pozo en el que se registró el mayor porcentaje de metamorfosis. Con un hisopo estéril se realizó un barrido de 1 cm^2 de biopelícula, la muestra fue resuspendida en 10 mL de AMFE y se realizó una serie de diluciones (10^{-1} y 10^{-2}). Para la inoculación, se tomaron 100 μL de cada tubo incluido el inicial (directa) y se sembraron por duplicado en cajas Petri con medio agar Zobell, específico para bacterias heterótrofas marinas (Oppenheimer y ZoBell, 1952) (anexo A). Las cajas se incubaron a 24°C . El número de bacterias se contó diariamente durante 7 días para determinar la concentración de bacterias viables en las biopelículas en unidades formadoras de colonias (UFC cm^{-2}).

5.7 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas.

Las colonias de bacterias que crecieron en las cajas Petri donde se realizó el conteo fueron diferenciadas de acuerdo a su morfología (forma, elevación, margen y color). Una muestra de cada morfotipo bacteriano fue sembrada por estriado en medio agar Zobell estéril (anexo A). Se realizaron varias transferencias hasta obtener cepas puras. Este procedimiento y los que se describen a continuación se realizaron únicamente con las cepas obtenidas en el ensayo con erizo morado y su control con agua de mar.

La asignación de claves para cada una de las cepas aisladas y purificadas se realizó de la siguiente manera: **BIO** corresponde al origen de la cepa (de biopelícula formada en el laboratorio); **EM** (erizo morado) y **AM** (agua de mar) indica el tipo de acuario donde se aisló; el número del 1-7 indica los días de formación de la biopelícula; la letra siguiente indica el ensayo al que corresponde y el número final indica el número de cepa aislada, por ejemplo, la cepa BIOEM1E1 indica una muestra de biopelícula de erizo morado en el día 1, la bacteria número 1.

5.8 Pruebas bioquímicas.

A las cepas aisladas de las biopelículas se les realizaron las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa así como la tinción de Gram.

5.9 Preservación y almacenamiento de las cepas.

Para su preservación las cepas bacterianas fueron cultivadas en 10 mL de medio Zobell líquido a una temperatura de 23 a 25°C por un periodo comprendido entre 24 y 72 hr. Posteriormente, en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL se adicionó 1 mL del cultivo bacteriano y 500 µL de glicerol al 10%. Las cepas fueron almacenadas por duplicado a -70°C.

5.10 Caracterización molecular.

5.10.1. Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN, las cepas se cultivaron en medio Zobell líquido a pH 7.6 y se incubaron por 24 h aproximadamente a 150 rpm. La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo modificado de Marmur (1961), como lo describe Santiago-González (2008) (anexo B).

5.10.2. Análisis de ADN.

El ADN extraído de cada una de las cepas fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. por 1 hr a 85V. El gel de la electroforesis se colocó en el transiluminador de luz UV y se tomó la imagen respectiva en el analizador de imágenes. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizaron marcadores de peso molecular (Invitrogen) que corrieron en la electroforesis junto con las muestras.

5.10.3. Amplificación de 16S rADN.

La amplificación del gen 16S rDNA se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el ADN genómico de las cepas bacterianas que fueron seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas. Las condiciones que se utilizaron para la PCR fueron las que se describen a continuación: 1) ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 2) 35 ciclos consistentes de 94°C por 1 min, 59°C por un min, 72°C por 1 min; y una extensión del último paso consistente de 72°C por 10 min (anexo C). Los primers que fueron utilizados son complementarios al 16S rRNA de *Escherichia coli*: 27 Fwd (5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3') posición 27-46. 1522 Rvs (5' -AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA- 3') posición 1502-1522 y 785R (5' -CTA CCA GGG TAT CTA ATC C - 3') posición 785-804 (Lee et al., 1993 citado por Lau *et al.*, 2002). Los primers 27F y 1522R amplifican un fragmento de 1500 pb aproximadamente, mientras que los primers 27F y 785R amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb. Para la purificación de los productos PCR obtenidos se utilizó el "PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)".

5.10.4. Secuenciación de los productos PCR.

Las reacciones de secuenciación se prepararon de acuerdo a las especificaciones de SeqXcel DNA sequencing service (<http://www.seqxcel.com/>). La concentración del producto PCR fue de 20 a 30 ng por 100 pb en un volumen de 12 μ L. El procesamiento de las muestras se hizo con un kit para secuenciación (BigDye® Terminador cycle sequencing kit). Las muestras fueron purificadas de acuerdo a los protocolos de "Biosystems DNA sequencing" (de Biosystem). De cada uno de los productos de PCR sólo se secuenció la cadena directa utilizando el primer 27F.

5.10.5. Alineamiento de las secuencias.

Se realizó un alineamiento de cada una de las secuencias con una base de datos de secuencias nucleotídicas, mediante la opción BLAST (Basic Alingment Search Tool) en la pagina web del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dentro de la opción BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se utilizó la opción "nucleotide BLAST", la cual mostró las secuencias con mayor porcentaje de identidad con el gen 16S rDNA. Con los resultados obtenidos se estableció la identidad de las cepas a nivel género y/o especie y el porcentaje de identidad. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias en el programa UltraEdit Editor de textos/HEX Profesional versión 15.20.0.1016 (<http://www.idmcomp.com/>).

5.10.6. Elaboración de árbol filogenético.

La construcción del árbol filogenético fue realizada en el programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (<http://www.megasoftware.net/>), en el cual se utilizó el archivo previamente elaborado en el programa UltraEdit. Una vez realizado el alineamiento, se utilizó la opción "bootstrap test the phylogeny" (remuestreo) y por el método Neighbor Joining (NJ) se generó una matriz de distancias entre secuencias a través del modelo "Kimura-dos-parámetros" (Tamura *et al.*, 2004).

6. RESULTADOS

6.1 Ensayos de inducción a la metamorfosis con erizo blanco.

En el ensayo con erizo blanco, a las 72 horas de exposición de las larvas, el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis (50.1%), en las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos se presentó con la película de 6 días de formación. Una respuesta semejante se presentó con las biopelículas formadas en sólo agua de mar (52%). En el control positivo se presentó un porcentaje de 52.5, similar al máximo encontrado con las biopelículas, mientras que en el control negativo el porcentaje fue del 11.1 (figura 1).

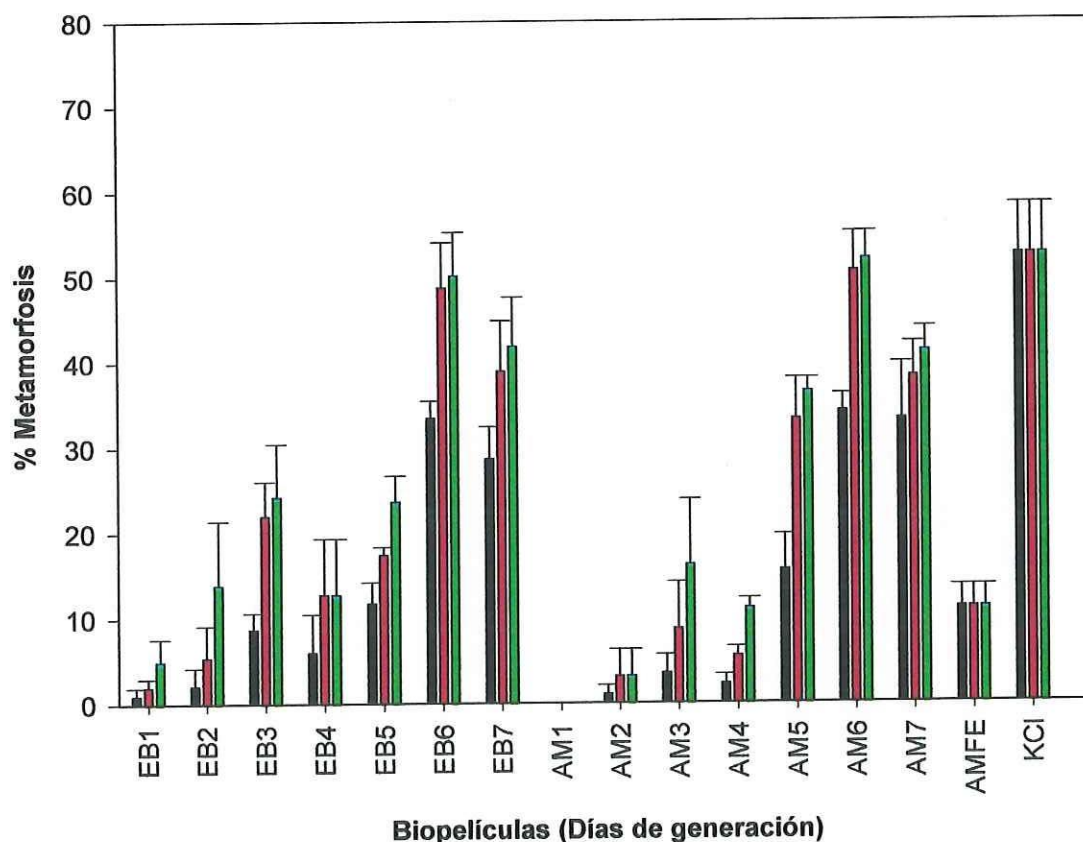


Figura 1.- Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco a las 24, 48 y 72 horas de exposición a biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos (EB) y biopelículas formadas en sólo agua de mar (AM). El número al final de la clave (1-7), corresponde a los días de generación de la biopelícula. Control negativo: AMFE (agua de mar filtrada y esterilizada). Control positivo: KCl (Cloruro de potasio 100 mM; 15 min). El color de las barras corresponde al tiempo de exposición: negro 24h, anaranjado 48 h y verde 72 h (n = 3 réplicas por tratamiento, las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar).

De acuerdo con el análisis estadístico, en los porcentajes de inducción a la metamorfosis en las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (días de generación de las biopelículas y controles; ANOVA 1 vía, $P < 0.05$). Los porcentajes de inducción de las biopelículas de 1 a 5 días de generación fueron iguales entre sí y el control negativo, pero menores (casi la mitad) con respecto al control positivo (LSD, $P < 0.05$). Sólo en las biopelículas de 6 y 7 días se encontraron diferencias con relación al control negativo (LSD, $P < 0.05$). El porcentaje de mayor inducción de metamorfosis de las biopelículas en presencia de erizos blancos adultos, obtenido con la biopelícula de 6 días de formación, no presentó diferencias con la biopelícula de 7 días y el control positivo (LSD, $P > 0.05$), pero si hubo diferencias con el resto de los tratamientos (LSD, $P < 0.05$). Resultados similares se obtuvieron en el análisis realizado a los porcentajes de inducción a la metamorfosis en las biopelículas formadas en agua de mar sin la presencia de erizos (ANOVA 1 vía, $P < 0.05$). Los porcentajes de metamorfosis en las biopelículas de 1-5 días de generación también fueron iguales entre sí pero menores (casi una tercera parte) con relación al control positivo (LSD, $P < 0.05$). Sólo las biopelículas de 5, 6 y 7 días de generación presentaron diferencias con respecto al control negativo (LSD, $P > 0.05$). La biopelícula con 6 días de formación, no presentó diferencias con la biopelícula de 7 días de formación y el control positivo (LSD, $P > 0.05$), pero si hubo diferencias con el resto de los tratamientos (LSD, $P < 0.05$).

Al realizar el análisis estadístico con dos factores (condiciones para la formación de las biopelículas y días de generación), no se encontraron diferencias significativas entre las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos y las formadas en sólo agua de mar (ANOVA 2 vías, $P > 0.05$). Mientras que al comparar entre días de generación en las biopelículas formadas en sólo agua de mar si hubo diferencias significativas (ANOVA 2 vías, $P < 0.05$). En este caso, ambos factores son independientes, ya que no hubo diferencias significativas en las interacciones entre el tipo de biopelículas y los días de formación (ANOVA 2 vías, $P > 0.05$).

6.2 Ensayo de inducción a la metamorfosis con erizo morado.

En el ensayo de inducción a la metamorfosis con erizo morado, el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis en biopelículas formadas en presencia de erizos adultos se presentó al tercer día (43.5%), mientras que en las biopelículas formadas en solo agua de mar el mayor porcentaje de inducción se presentó al cuarto día (8.9%). El control positivo presentó un porcentaje de 53.7 mientras que en el control negativo el porcentaje fue de 2.8 (figura 2).

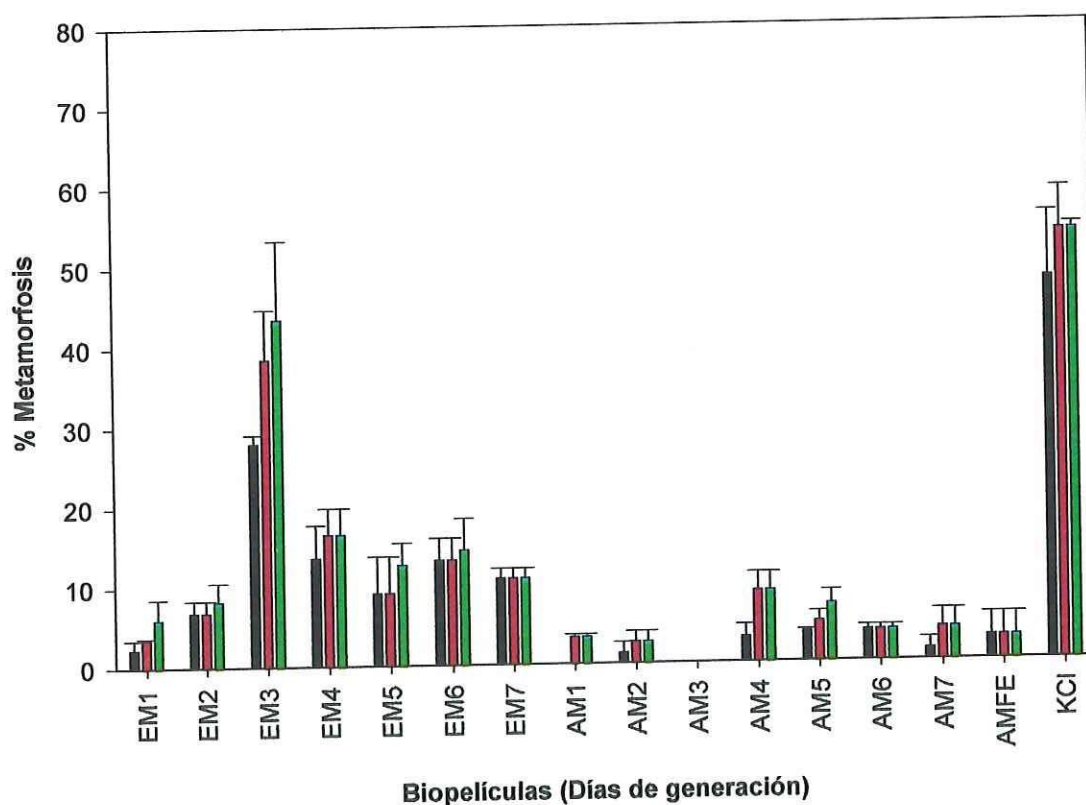


Figura 2.- Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo morado a las 24, 48 y 72 horas de exposición a biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos (EM) y biopelículas formadas en sólo agua de mar (AM). El número al final de la clave (1-7), corresponde a los días de generación de la biopelícula. Control negativo: AMFE (agua de mar filtrada y esterilizada). Control positivo: KCl (Cloruro de potasio 100 mM; 15 min). El color de las barras corresponde al tiempo de exposición: negro 24h, anaranjado 48 h y verde 72 h (n = 3 réplicas por tratamiento, las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar).

En los porcentajes de inducción a la metamorfosis con las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (días de generación de las biopelículas y controles; ANOVA 1 vía, $P < 0.05$). Las biopelículas de 1-5 y 7 días de formación presentaron diferencias con respecto al control positivo (SNK, $P < 0.05$), mientras que con relación al control negativo no se encontraron diferencias (SNK, $P > 0.05$). La biopelícula con 3 días de formación, en la cual se registró el porcentaje de mayor inducción de la biopelículas en presencia de erizos morados, no resultó diferente al control positivo (SNK, $P > 0.05$), pero si fue diferente con el resto de los tratamientos (SNK, $P < 0.05$). Al realizar el análisis de los porcentajes de metamorfosis de las biopelículas generadas en sólo agua de mar, también se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA 1 vía, $P < 0.05$); las biopelículas de 1-7 días de formación presentaron diferencias significativas con relación al control positivo (SNK, $P < 0.05$), mientras que con el control negativo no se encontraron diferencias (SNK, $P > 0.05$).

Al realizar el análisis estadístico con dos factores (condición para la formación de las biopelículas y días de generación), se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de biopelícula (ANOVA 2 vías, $P < 0.05$). La comparación entre días de generación de las biopelículas formadas en sólo agua de mar mostró diferencias significativas con respecto a las formadas en presencia de erizos morados adultos (ANOVA 2 vías, $P < 0.05$). En este ensayo el efecto del tipo de biopelícula no fue independiente del efecto de los días de generación, ya que se encontraron diferencias significativas en las interacciones entre ambos factores (ANOVA 2 vías, $P < 0.05$).

6.3 Cuantificación de bacterias en las biopelículas

6.3.1 Ensayo con erizo blanco.

En la figura 3, se puede observar una variación de la concentración bacteriana en Unidades Formadoras de Colonias por centímetro cuadrado (UFC cm^{-2}) de cada uno de los días de generación de las biopelículas.

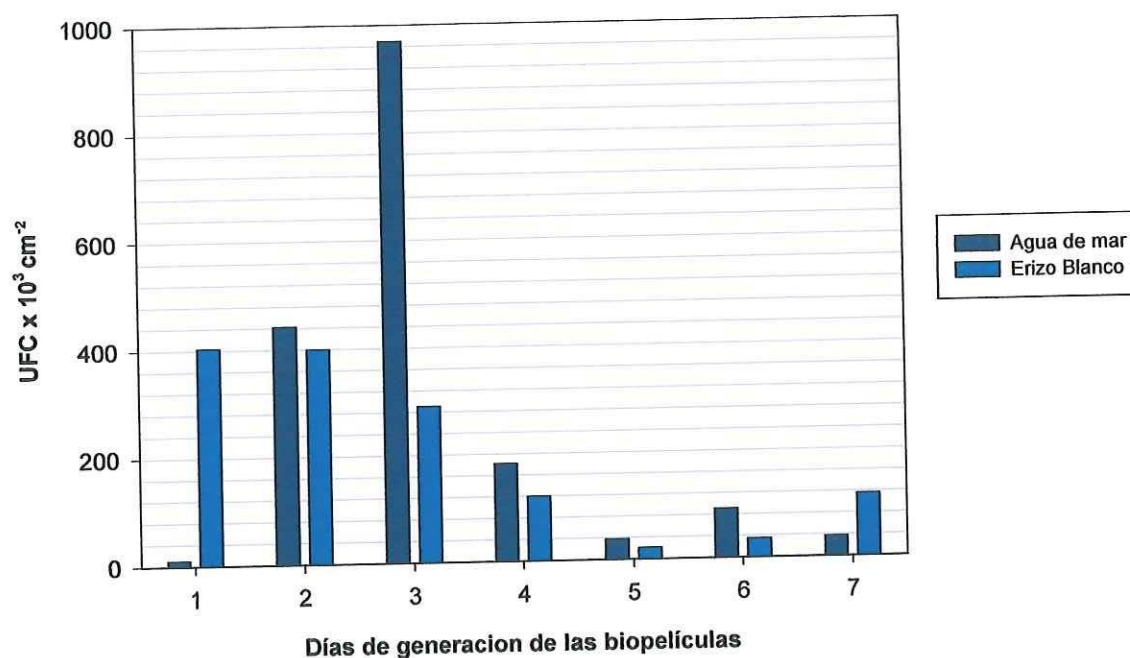


Figura 3. Concentración de bacterias en los diferentes días de formación de las biopelículas generadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo blanco (UFC cm⁻²).

En las biopelículas formadas en sólo agua de mar, la concentración más alta se registró al tercer día (970×10^3 UFC cm⁻²), mientras que para las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos la concentración más alta se presentó en el primer día (400.4×10^3 UFC cm⁻²). Al quinto día se observó una disminución considerable en la concentración de bacterias tanto para la biopelícula formada en solo agua de mar como para la formada con erizos adultos, con un valor de 38×10^3 UFC cm⁻² y 21.1×10^3 UFC cm⁻², respectivamente.

La concentración de bacterias en las biopelículas formadas en presencia de erizo blanco en el día 1 fue 38 veces mayor que en la biopelícula formada en sólo agua de mar, mientras que para el día 7 fue sólo 3 veces mayor. Para los días 2, 4 y 5 los valores fueron muy similares. En contraste, para los días 3 y 6 la concentración bacteriana en las biopelículas formadas en sólo agua de mar fue aproximadamente 3 veces mayor que la registrada en las biopelículas formadas en presencia de erizo blancos adultos.

Al realizar el conteo de las colonias diferentes que aparecieron en cada uno de los siete días de generación, para ambos tipos de biopelícula (figura 4), se observó que en las formadas en sólo agua de mar en el primer día de generación se registró un valor de 19 colonias. Para los otros días el número varió de un valor mínimo de 12, en el segundo día, y un valor máximo de 20 colonias en el tercer día. Para las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos, en el primer día de generación se obtuvieron 21 colonias. Para los otros días el número varió de un valor mínimo de 11, en el segundo día, y un valor máximo de 24 colonias en el quinto día.

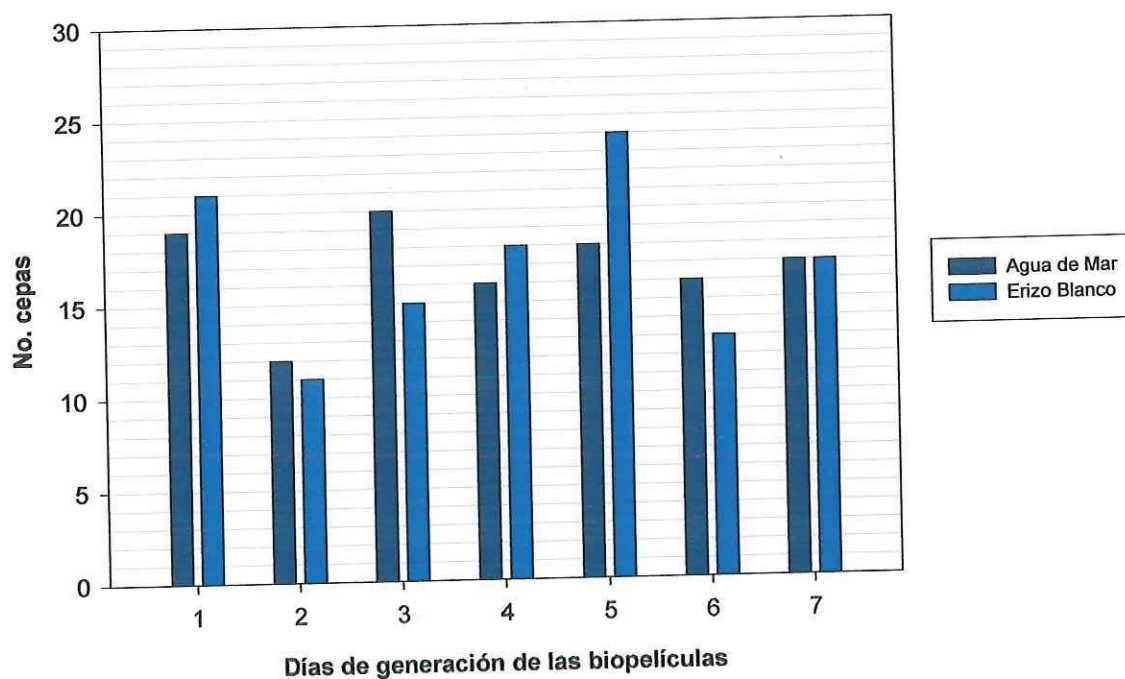


Figura 4. Número de cepas encontradas en cada una de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y en presencia de erizos blancos para cada uno de los días de formación de las películas.

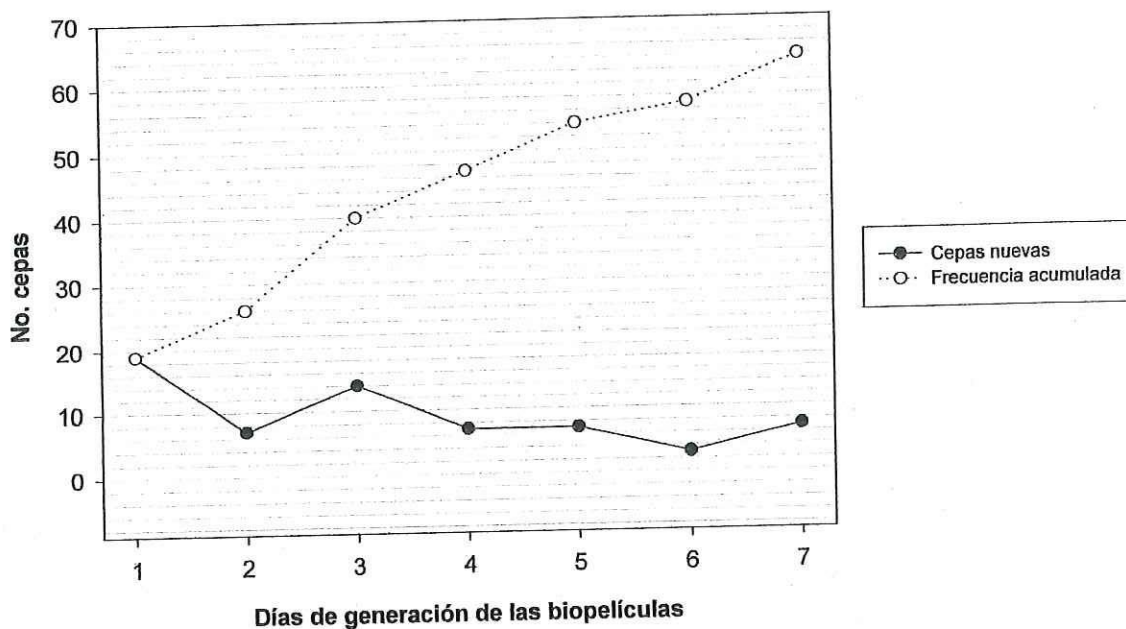


Figura 5. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de generación de las biopelículas formadas en sólo agua de mar y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.

Al realizar el análisis morfológico de las colonias de bacterias presentes en cada condición experimental se determinó que, en las biopelículas formadas en sólo agua de mar había 64 cepas diferentes (figura 5), valor similar al obtenido en las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos (figura 6). El mayor número de cepas diferentes se registró en el primer día para ambos tipos de biopelícula, con un valor de 19 cepas en la biopelícula de agua de mar y 21 para la de erizos adultos. Para los demás días, en general el número de cepas nuevas fue de un orden de magnitud menor. En la biopelícula formada en sólo agua de mar se registró un segundo valor máximo de 14 cepas nuevas al tercer día. Un valor similar se registró en la biopelícula formada en presencia de erizos blancos adultos en el cuarto día.

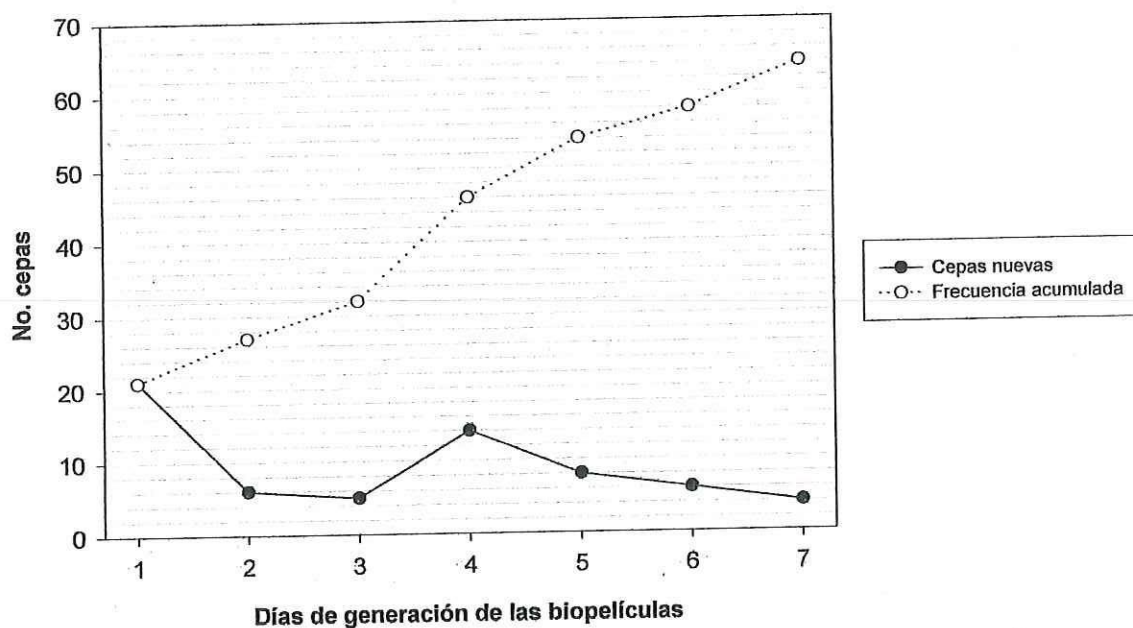


Figura 6. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de generación de las biopelículas formadas en presencia de erizos blancos adultos y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas.

6.3.2 Ensayo con erizo morado.

6.3.2.1 Conteo Directo.

En la figura 8 se muestra la evolución de las biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y de adultos de erizo morado. En la figura 7 se presentan los valores de conteo directo de bacterias en las biopelículas. En términos del número de células por centímetro cuadrado (No. células cm^{-2}) la concentración de bacterias en las biopelículas formadas en presencia de erizo morado fue de 2 a 10 veces mayor que en las biopelículas formadas en sólo agua de mar. La magnitud de la diferencia varió con el día de formación de la biopelícula. La mayor diferencia (10 veces) se registró en el día 7 mientras que la menor diferencia se registró en los días 3 y 6. En las biopelículas de agua de mar la concentración más alta se presentó al cuarto día con 1.38×10^6 células cm^{-2} y la concentración más baja en el séptimo día con 0.61×10^6 células cm^{-2} . Para las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos la concentración más alta se presentó en el primer día con 8.45×10^6 células cm^{-2} y la concentración más baja en el sexto día con 2.46×10^6 células cm^{-2} .

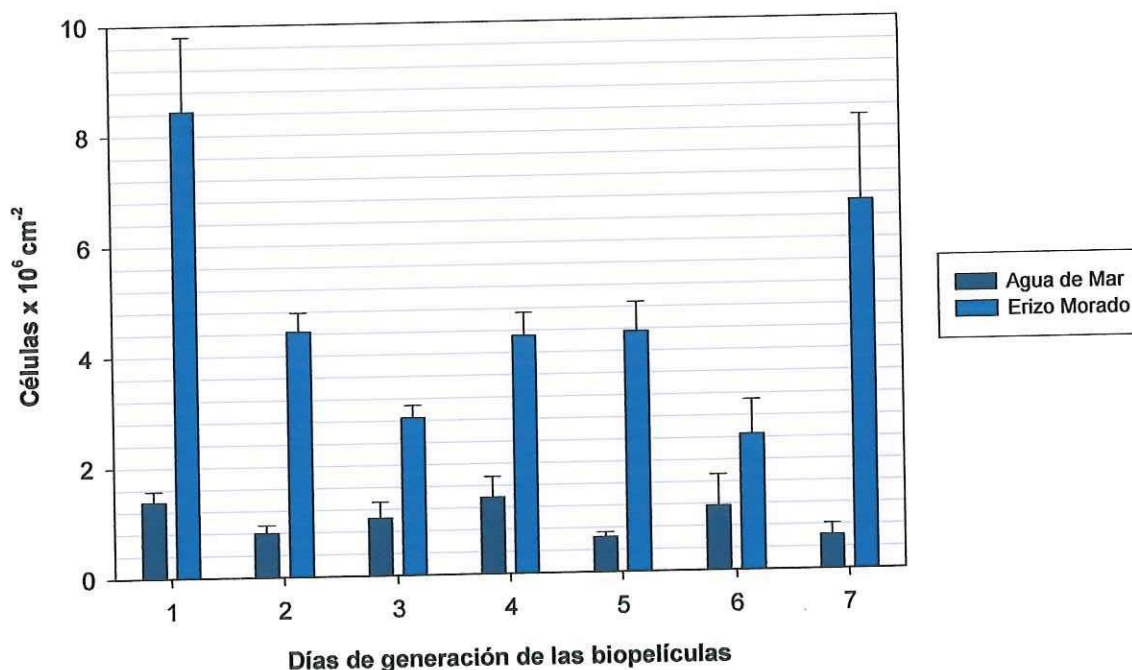
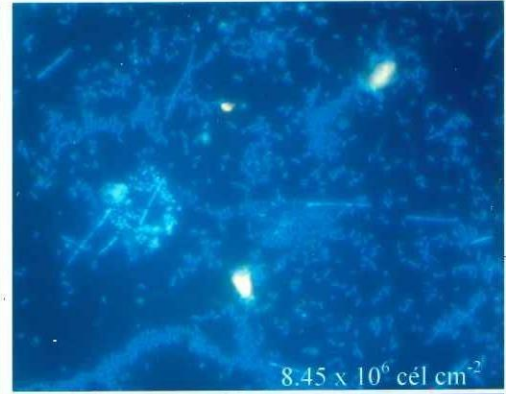
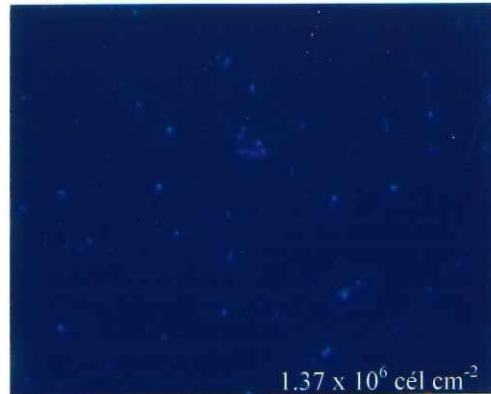


Figura 7. Concentración de bacterias en número de células cm^{-2} en los diferentes días de generación de las biopelículas formadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo morado. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar.

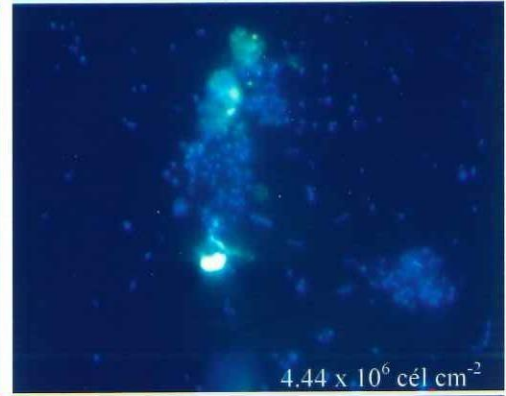
AGUA DE MAR

ERIZO MORADO

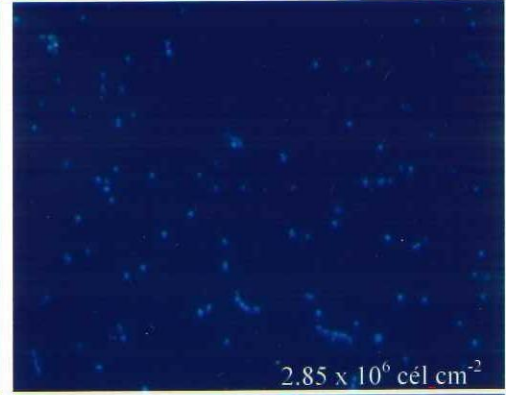
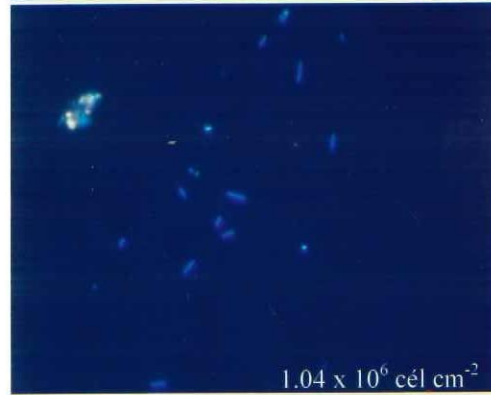
DIA 1



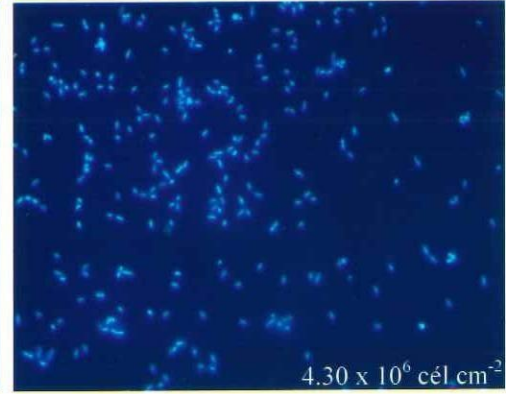
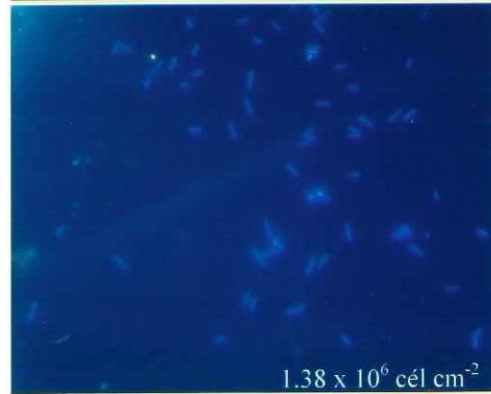
DIA 2



DIA 3



DIA 4



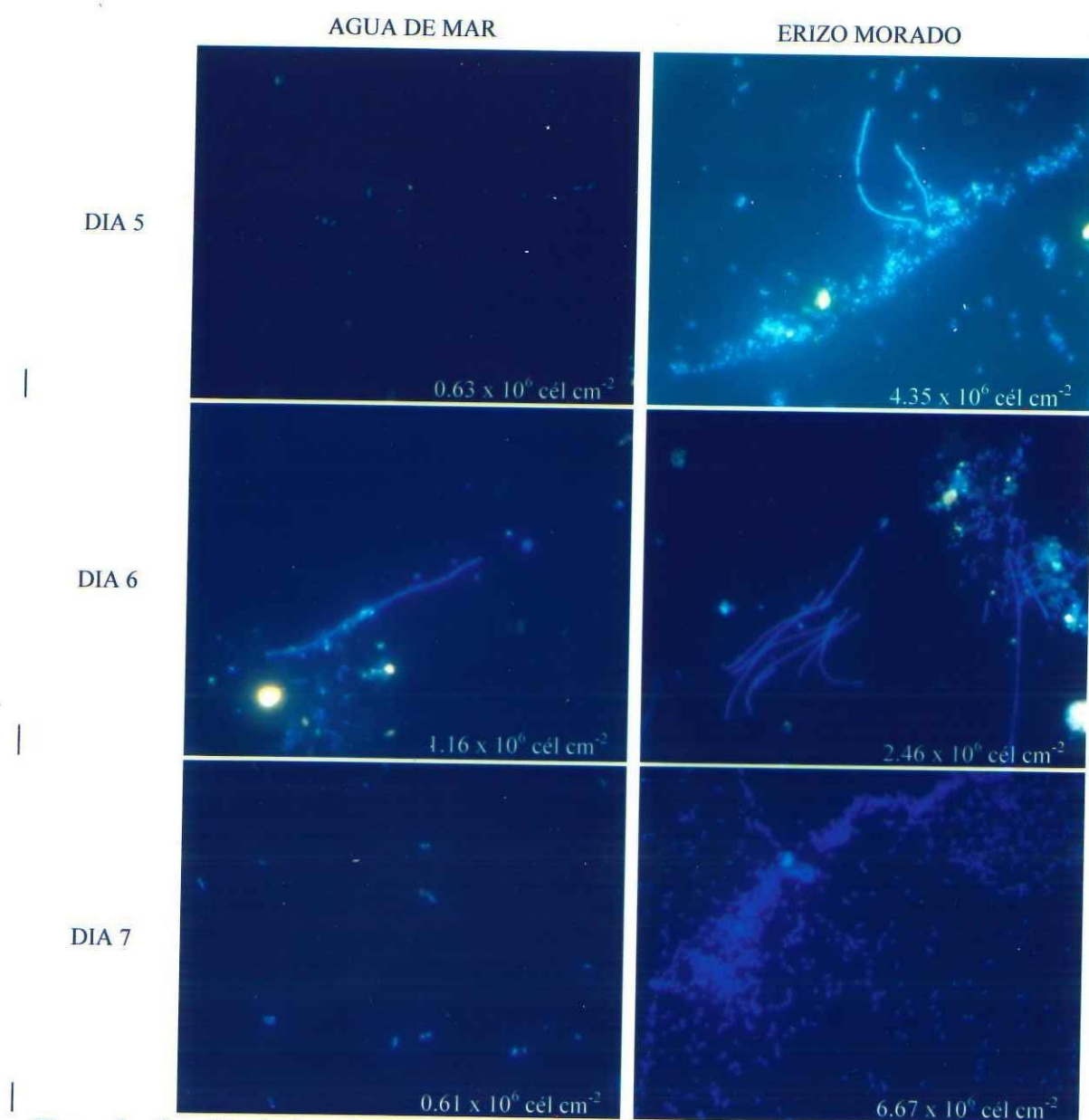


Figura 8. Sucesión de bacterias durante los 7 días de generación de las biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y en presencia de adultos de erizo morado. En la esquina inferior derecha de cada fotografía aparece la concentración para cada uno de los días de formación.

En las biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar, el nivel de variación en la concentración se mantuvo constante, mientras que en las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos, la variación fue más evidente con respecto al día de generación, ya que después del valor máximo registrado en el primer día la concentración disminuyó a casi la mitad (4.44×10^6 células cm^{-2}) con un segundo valor máximo en el séptimo día (6.67×10^6 células cm^{-2}).

6.3.2.2 Conteo viable en placa.

En términos de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC cm^{-2}) la concentración de bacterias viables en las biopelículas generadas en agua de mar fue de 2 hasta 49 veces mayor que en las biopelículas generadas en presencia de erizo morado (figura 9).

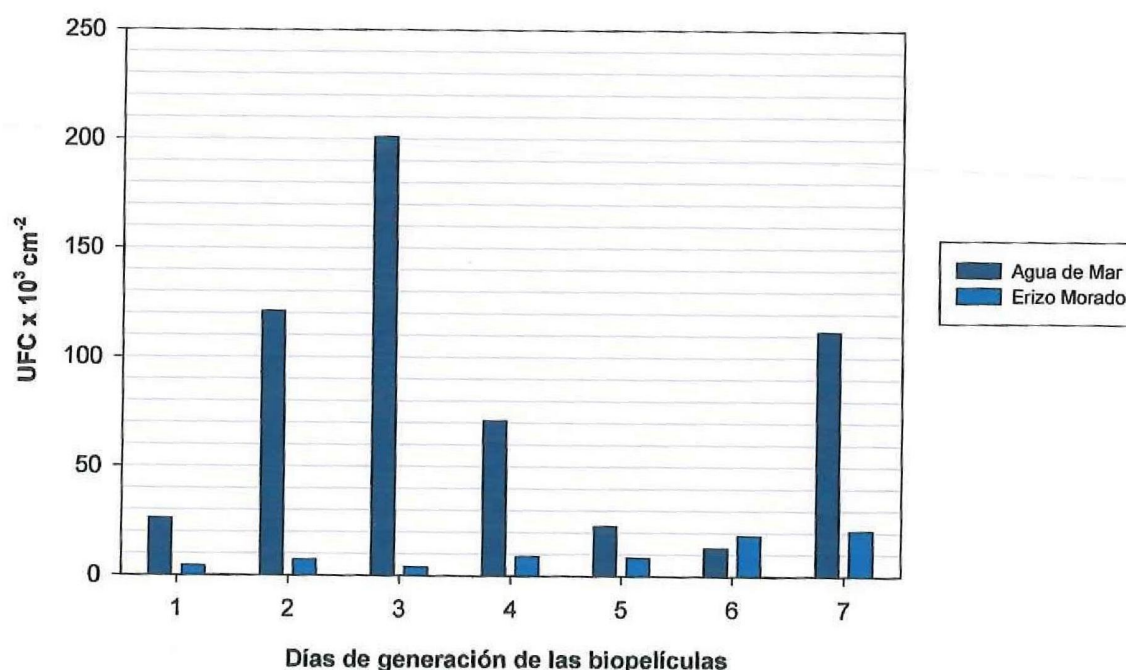


Figura 9. Concentración de bacterias en UFC cm^{-2} en los diferentes días de generación de las biopelículas formadas en los acuarios con sólo agua de mar y erizo morado.

La concentración más alta en las biopelículas formadas en sólo agua de mar se observó al tercer día ($201 \times 10^3 \text{ UFC cm}^{-2}$) y la concentración más baja ($13 \times 10^3 \text{ UFC cm}^{-2}$) en el sexto día. En las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos, la concentración más alta se observó en el séptimo día ($20.95 \times 10^3 \text{ UFC cm}^{-2}$) y la concentración más baja ($4.05 \times 10^3 \text{ UFC cm}^{-2}$) en el tercer día. En el sexto día de formación se registraron valores similares en los dos tipos de biopelícula. El conteo viable representó del 1-18% del conteo directo.

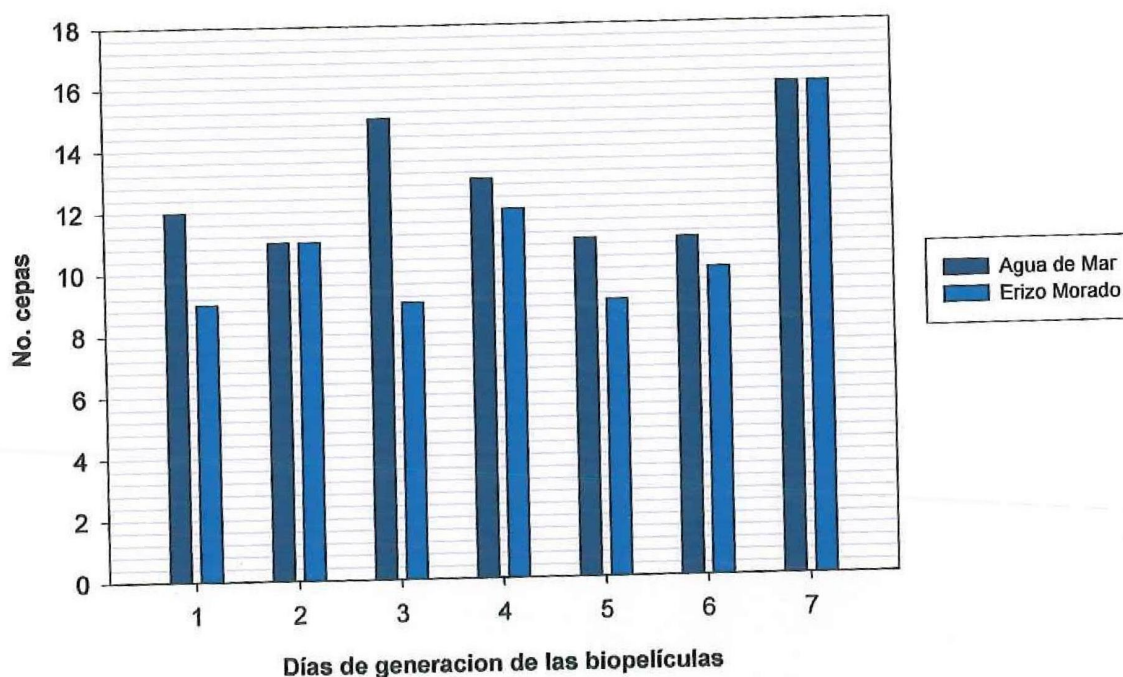


Figura 10. Número de cepas encontradas en cada una de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y en presencia de erizos morados adultos para cada uno de los días de formación de las películas.

Al realizar el conteo de cepas de colonias morfológicamente diferentes que aparecieron en cada uno de los siete días de generación para ambos tipos de biopelícula (figura 10), para las formadas en sólo agua de mar en el primer día de formación se registró un valor de 12 cepas y al séptimo día se registró un valor máximo de 16 colonias. Para las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos, en el primer día de formación se obtuvieron 9 cepas. Al igual que las formadas en agua de

mar el mayor número de cepas se registró al séptimo día, con un valor similar de 16 cepas.

Del número total de cepas cuantificado en ambos tipos de biopelícula se observó que en las biopelículas formadas en sólo agua de mar se obtuvo un número mayor de cepas que en las biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos. En las biopelículas de erizo morado se obtuvieron 35 cepas diferentes, mientras que en las de agua de mar se obtuvieron 37 cepas (figuras 11 y 12).

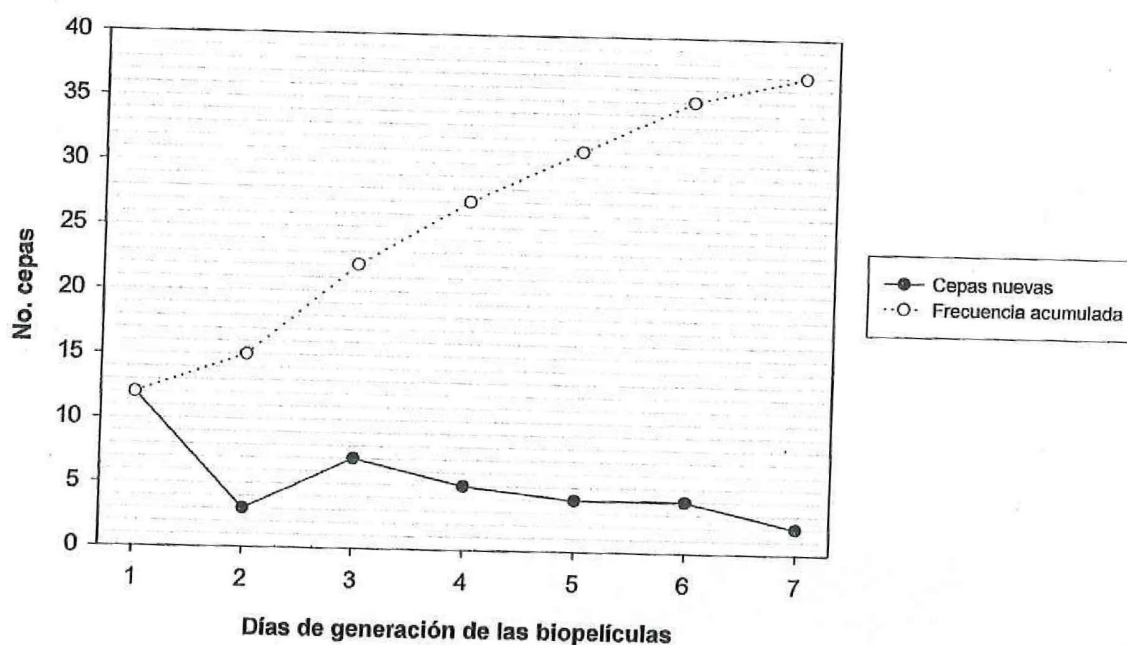


Figura 11. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de formación de las biopelículas generadas en sólo agua de mar y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.

Para ambos tipos de biopelícula, el mayor número de cepas nuevas se registró en el primer día, con un valor de 12 cepas en la biopelícula formada en solo agua de mar y 9 cepas para la biopelícula formada en presencia de erizos adultos. En los dos tipos de biopelícula se registró un segundo valor máximo de 7 cepas nuevas al tercer día. En los otros días se registraron de 2 a 4 cepas nuevas. La presencia de cepas nuevas indica una sucesión en la composición bacteriana conforme se acumulan los días de generación de las biopelículas.

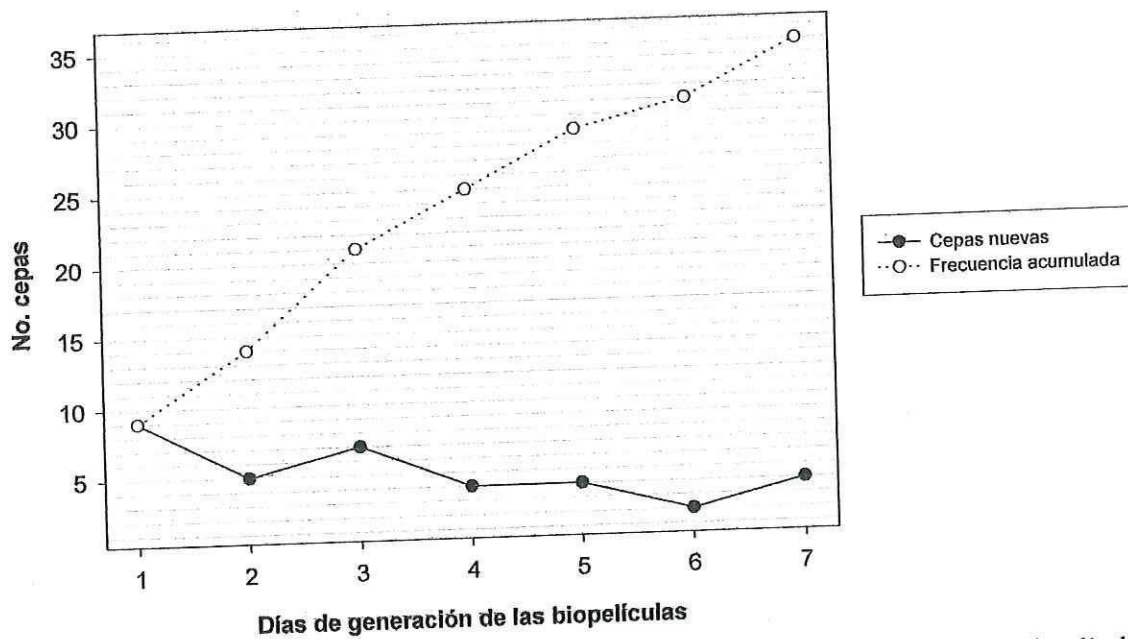


Figura 12. Número de cepas nuevas encontradas en cada uno de los días de formación de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos y la frecuencia acumulada que corresponde al número total de cepas encontradas.

6.3.2.3 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de agua de mar y erizo morado.

En la tabla I se presenta la relación de las cepas de bacterias aisladas en cada uno de los siete días de generación de las biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y en el anexo F se muestran fotografías de las colonias de cada una de las cepas caracterizadas morfológicamente.

Tabla I. Cepas de bacterias aisladas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	
Cepa	BIOAM1E1 BIOAM1E2 BIOAM1E3 BIOAM1E4 BIOAM1E6 BIOAM1E7 BIOAM1E8 BIOAM1E9 BIOAM1E10 BIOAM1E12	BIOAM2E3 BIOAM2E6	BIOAM3E3 BIOAM3E10 BIOAM3E15	BIOAM4E3 BIOAM4E4 BIOAM4E7	BIOAM5E5 BIOAM5E8 BIOAM5E9	BIOAM6E8 BIOAM6E10	BIOAM7E1 BIOAM7E7	
Total de cepas	10	2	3	3	3	2	2	Σ total: 25

En la tabla II se presenta la lista de las cepas de bacterias que se aislaron en cada uno de los siete días de generación de las biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado. En el anexo F se muestran fotografías de las colonias de cada una de las cepas caracterizadas morfológicamente.

Tabla II. Cepas de bacterias aisladas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de erizos morados adultos.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	
Cepa	BIOEM1E1 BIOEM1E2 BIOEM1E4 BIOEM1E5 BIOEM1E6 BIOEM1E7 BIOEM1E8	BIOEM2E9 BIOEM2E10	BIOEM3E1 BIOEM3E2 BIOEM3E4 BIOEM3E6 BIOEM3E8 BIOEM3E9	BIOEM4E1 BIOEM4E2	BIOEM5E9	BIOEM6E4 BIOEM6E7	BIOEM7E16	
Total de cepas	7	2	6	2	1	2	1	Σ total: 21

En el anexo G se presentan las características morfológicas de las colonias desarrolladas por las cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en estanques de agua de mar y en presencia de erizos morados adultos. En el anexo F se muestran fotografías correspondientes a cada una de las colonias.

6.3.2.4 Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa.

De acuerdo con la tinción de Gram, todas las cepas fueron Gram-negativas. De las 25 cepas obtenidas de biopelículas formadas en sólo agua de mar, 19 (76%) fueron oxidasa y catalasa positivas, 3 (12%) cepas fueron oxidasa y catalasa negativas y 3 (12%) cepas oxidasa positivas y catalasa negativas. En cuanto a la forma, 16 cepas (64%) fueron bacilos cortos, 6 (24%) bacilos, 1 (4%) bacilos largos y 2 (8%) cocos (tabla III y figura 18, anexo G).

De las 21 cepas obtenidas de biopelículas de erizo morado, 11 (52%) fueron oxidasa y catalasa positivas, 4 (19%) cepas fueron oxidasa y catalasa negativas, 5 (24%) cepas fueron oxidasa positivas y catalasa negativas y sólo 1 (5%) cepa fue oxidasa negativa y catalasa positiva. En cuanto a la forma, 4 cepas (19%) fueron bacilos cortos, 13 (62%) bacilos, y 4 (19%) bacilos largos (tabla IV y figura 18, anexo G).

6.3.2.5 Análisis genético de las cepas morfológicamente diferentes.

El análisis se realizó de las 46 cepas caracterizadas por su morfología (anexo F y G). La extracción de DNA genómico para cada una de las cepas se hizo en las mismas condiciones que se muestran en el anexo B.

6.3.2.6 Amplificación del 16S rDNA.

Las condiciones de los ciclos PCR se estandarizaron a partir del método descrito por Lee *et al.*, (2003), con algunas modificaciones (anexo E).

6.3.2.7 Identidad genética de las cepas obtenidas de biopelículas con las secuencias de géneros de bacterias marinas.

En la tabla V se presentan los datos de género o especie a los que se llegó mediante la comparación de las secuencias obtenidas de las cepas aisladas de las biopelículas y las reportadas en el GenBank, así como el porcentaje de identidad máxima (93 a 100%) con las secuencias obtenidas.

La identificación bacteriana se basó en el análisis del 16S rDNA. De las 46 cepas a las cuales se les realizó el análisis, sólo se pudieron identificar 37. En el caso de las biopelículas generadas en presencia de sólo agua de mar se identificaron 20 cepas, en las cuales se presentaron 11 géneros diferentes (*Alteromonas* sp., *Pseudidiomarina* sp., *Sulfitobacter* sp., *Saphylococcus saprophyticus*, *Maribacter ulvicola*, *Pseudoalteromonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Planomicrobium* sp., *Marinomonas* sp. y *Glaciecola* sp.) De las biopelículas generadas en presencia de adultos de erizo morado se identificaron 17 cepas en las que se identificaron 9 posibles géneros distintos (*Roseobacter* sp., *Alteromonas* sp., *Sphingomonadaceae* sp., *Sphingopyxis* sp., *Sulfitobacter* sp., *Cytophaga* sp., *Rhodobacteraceae* sp., *Marinobacter* sp., y *Flavobacteriaceae* sp.). Solo 2 cepas, *Alteromonas* sp. y *Sulfitobacter* sp., incidieron en ambos tipos de biopelícula.

Como se puede observar en la tabla VI, durante la formación de las biopelículas se registró una sucesión de especies de bacterias.

En la figura 13 se muestran los cluster que definen el árbol filogenético de 36 secuencias obtenidas, ya que la secuencia de la cepa BIOEM3E1 era muy corta y no fue posible incluirla en el árbol filogenético. En esta figura se puede observar la formación de los diferentes grupos a los que pertenecen las cepas de bacterias aisladas de ambos tipos de biopelículas.

Tabla V. Afiliación filogenética de cada una de las cepas analizadas molecularmente. Las secuencias de cada una de las cepas fueron comparadas con las secuencias de nucleótidos en el banco de genes de NCBI, donde se obtuvo el porcentaje de identidad y los datos de género o especie.

Cepa	Género o especie	% de identidad
BIOAM1E1	<i>Alteromonas</i> sp. Cv1	97
BIOAM1E2	<i>Alteromonas</i> sp.	99
BIOAM1E3	<i>Pseudidiomarina</i> sp.	99
BIOAM1E4	<i>Sulfitobacter</i> sp.	100
BIOAM1E6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
BIOAM1E7	<i>Alteromonas</i> sp.	100
BIOAM1E8	<i>Alteromonas</i> sp.	99
BIOAM1E9	<i>Alteromonas</i> sp.	100
BIOAM1E10	<i>Maribacter ulvicola</i>	94
BIOAM1312	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100
BIOAM3E3	<i>Alteromonas</i> sp.	94
BIOAM3E10	<i>Maribacter ulvicola</i>	94
BIOAM3E15	<i>Alteromonas</i> sp.	99
BIOAM4E3	<i>Rhodococcus</i> sp.	98
BIOAM4E4	<i>Microbacterium</i> sp. CV97	99
BIOAM4E7	<i>Planomicrobium glaciei</i>	94
BIOAM5E8	<i>Marinomonas</i> sp.	93
BIOAM6E8	<i>Glaciecola</i> sp.	98
BIOAM6E10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	98
BIOAM7E7	<i>Alteromonas</i> sp.	99
BIOEM1E2	<i>Roseobacter</i> sp. 2734	98
BIOEM1E6	<i>Alteromonas</i> sp. Rc1	99
BIOEM1E7	<i>Roseobacter</i> sp. 2734	99
BIOEM1E8	<i>Sphingomonadaceae bacterium ACEMC 24-9</i>	100
BIOEM2E9	<i>Sphingophyxis</i> sp. MEBiC05060	99
BIOEM2E10	<i>Roseobacter</i> sp. KAT10	98
BIOEM3E1	<i>Rhodobacteraceae</i> sp.	98
BIOEM3E4	<i>Sulfitobacter</i> sp.	99
BIOEM3E6	<i>Cytophaga</i> sp. G22	99
BIOEM3E8	<i>Sulfitobacter</i> sp.	99
BIOEM3E9	<i>Rhodobacteraceae</i> sp.	98
BIOEM4E1	<i>Marinobacter</i> sp.	100
BIOEM4E2	<i>Marinobacter</i> sp.	96
BIOEM5E9	<i>Alteromonas</i> sp.	99
BIOEM6E4	<i>Flavobacteriaceae</i> sp.	98
BIOEM6E7	<i>Roseobacter</i> sp. KT0917	100
BIOEM7E16	<i>Sulfitobacter</i> sp.	100

Tabla VI. Cepas de bacterias aisladas e identificadas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar y en erizos morados adultos

En acuario con sólo agua de mar.							
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Cepas	<i>Alteromonas</i> sp. Cv1 <i>Alteromonas</i> sp. <i>Pseudidiomarina</i> sp. <i>Sulfitobacter</i> sp. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Alteromonas</i> sp. <i>Alteromonas</i> sp. <i>Alteromonas</i> sp. <i>Maribacter ulvicola</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	BIOAM2E3 BIOAM2E6	<i>Alteromonas</i> sp. <i>Maribacter ulvicola</i> <i>Alteromonas</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Microbacterium</i> sp. CV97 <i>Planomicrobium glaciei</i>	BIOAM5E5 <i>Marinomonas</i> sp. BIOAM5E9	<i>Glaciecola</i> sp. <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	BIOAM7E1 <i>Alteromonas</i> sp.
Total de cepas	10	2	3	3	3	2	2
En acuario con erizos morados adultos.							
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Cepas	BIOEM1E1 <i>Roseobacter</i> sp. 2734 BIOEM1E4 BIOEM1E5 <i>Alteromonas</i> sp. Rc1 <i>Roseobacter</i> sp. 2734 <i>Sphingomonadaceae bacterium</i> ACEMC 24-9	<i>Sphingophyxis</i> sp. MEBtC05060 <i>Roseobacter</i> sp. KAT10	<i>Rhodobacteraceae</i> sp. BIOEM3E2 <i>Sulfitobacter</i> sp. <i>Cytophaga</i> sp. G22 <i>Sulfitobacter</i> sp. <i>Rhodobacteraceae</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. <i>Marinobacter</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Flavobacteriaceae</i> sp. <i>Roseobacter</i> sp. KT0917	<i>Sulfitobacter</i> sp.
Total de cepas	7	2	6	2	1	2	1

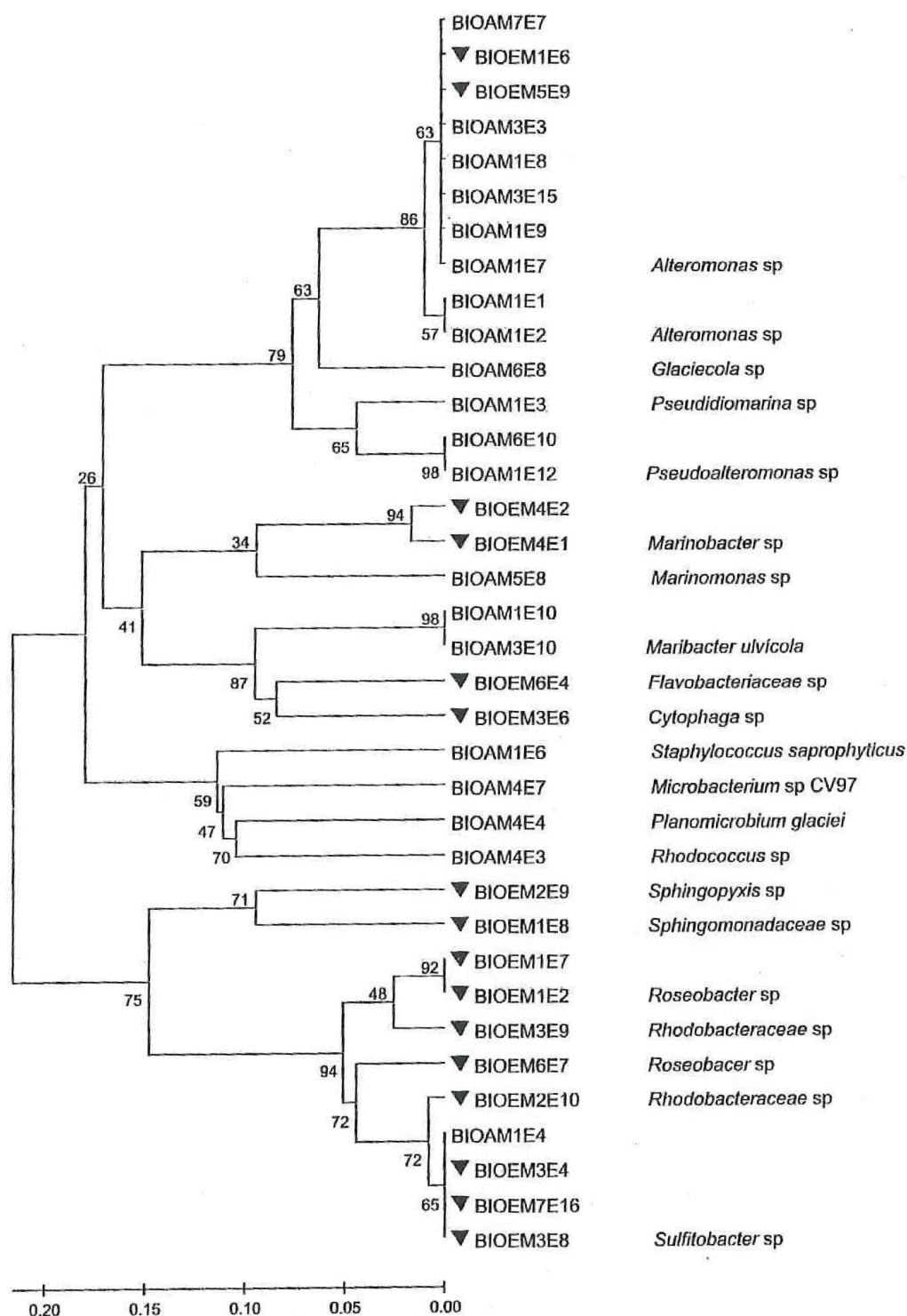


Figura 13. Relación genética entre 36 cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado y en sólo agua de mar por el método del vecino más cercano (Neighbour-joining). La distancia genética se calculó a partir del método Kimura-2-parámetros. Los valores del remuestreo (bootstrap), en cada nodo, son resultado de 1000 réplicas. El símbolo (▼) señala las cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las larvas de erizo blanco y erizo morado respondieron al estímulo o señal de las bacterias presentes en las biopelículas, y en forma similar a como se ha reportado para otras larvas de diversos grupos de invertebrados (Satuito *et al.*, 1997; Huang y Hadfield, 2003; Jin y Qian, 2005) y corrobora los estudios previos en el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO, en donde la respuesta a metamorfosearse en presencia de películas bacterianas es consistente en las diversas especies de erizo (ver: Díaz-Peréz, 2006; Cardozo-Martínez, 2008; Santiago-González, 2008).

En el ensayo con erizo blanco, los porcentajes de metamorfosis fueron similares en biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo blanco y en sólo agua de mar (>50). Este comportamiento no se corresponde con los resultados obtenidos en ensayos previos, en los cuales el porcentaje de metamorfosis en biopelículas formadas en presencia de agua de mar siempre fue menor al de biopelículas formadas en presencia de erizos adultos. Aunque se observaron variaciones en la temperatura entre los dos estanques no se registraron los valores, por lo cual no se puede explicar este comportamiento. Se recomienda tener un mayor control en los ensayos y llevar un registro de temperatura así como de otros parámetros ambientales (*eg.* pH, O₂). En relación con la presencia de erizos adultos, en un ensayo similar al de este trabajo, en el que se experimentó con biopelículas de diferentes días de generación y formadas en diferentes condiciones (en presencia de adultos de erizo blanco, erizo morado, otros invertebrados y en sólo agua de mar), Díaz-Pérez (2006) observó que las larvas de erizo blanco eran inducidas a la metamorfosis en un mayor porcentaje en biopelículas generadas en presencia de adultos de erizo blanco (>85%) en relación con los otros tipos de biopelícula (15.2%). De igual manera Qian *et al.*, (2003) encontraron que las larvas de *Balanus amphitrite* se asientan preferentemente en las biopelículas desarrolladas donde había una población densa de conespecíficos.

En el experimento con larvas de erizo morado, hubo una notable diferencia en la respuesta de las larvas a metamorfosearse, ya que éstas respondieron de una mejor manera ante biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado que en las formadas en sólo agua de mar. El mayor porcentaje de inducción se presentó en la biopelícula de 3 días en presencia de erizos adultos (43.5%) y al cuarto día en la de agua de mar (8.9%), por lo que el efecto inductor de las biopelículas formadas en presencia de erizos adultos fue mayor 5 veces que el de las formadas en agua de mar. Esto sugiere que hay una señal de inducción a la metamorfosis asociada a las etapas tempranas de la formación de la biopelícula en presencia de adultos de la especie.

Al igual que en este trabajo, se ha reportado la preferencia de otros invertebrados marinos por biopelículas en etapas de formación temprana. Faimali *et al.*, (2004) observaron que las larvas de *Fistulobalanus albicostatus* rápidamente se establecen en sustratos artificiales de 1 día cuando la biopelícula está empezando a formarse. Chen *et al.* (2007) en un estudio similar, observaron que la respuesta disminuyó con la edad de la biopelícula, por lo que sugieren que el envejecimiento o la sucesión de la biopelícula que produce cambios en la composición microbiana redujo gradualmente el asentamiento larval. En contraste, Rahim *et al.* (2004) encontraron que el asentamiento y metamorfosis de las larvas de erizos *Pseudocentrotus depressus* y *Anthocidaris crassispina* se incrementa con la edad de la biopelícula. Un patrón similar se observó en otros invertebrados, incluyendo larvas de mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Bao *et al.*, 2007) y especies de poliquetos (Hadfield *et al.*, 1994; Shikuma y Hadfield, 2006). En el trabajo realizado por Díaz-Pérez (2006) se observó que biopelículas de 2, 4, 5 y 6 días de formación indujeron muy poco a la metamorfosis de larvas de erizo blanco (15.2%) mientras que el mayor porcentaje de metamorfosis (>85%) se registró en biopelículas de 9 a 15 días de formación. Es probable que no se haya observado un mayor porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco en los primeros días de formación debido a que en dichos experimentos no se registró información para la biopelícula de 3 días, pero en el trabajo se sugiere que es probable que los grupos bacterianos responsables de la inducción a la metamorfosis de las larvas

de erizo blanco, empiezan a colonizar las biopelículas a partir de los 9 días de formación. Cabe mencionar que durante el presente estudio solo se generaron biopelículas en los primeros siete días de formación, por lo que no fue posible evaluar el porcentaje de metamorfosis en biopelículas de más tiempo de generación.

En el estudio realizado por Shikuma y Hadfield, (2006), se observó una correlación entre la densidad bacteriana y la edad de la biopelícula, por lo que estos autores concluyen que la metamorfosis de *H. elegans* esta relacionada con las densidades bacterianas. Porcentajes de metamorfosis de *H. elegans* y la densidad celular en una biopelícula monoespecífica de *P. luteoviolacea* también han mostrado una correlación positiva (Huang y Hadfield, 2003). Del mismo modo, las larvas del serpúlido *Pomatoceros lamarkii* responden a las biopelículas en función de la edad; los autores reportan, que la proporción de organismos asentados, estuvo estrechamente relacionada con la densidad de bacterias de la biopelícula (Hamer *et al.*, 2001). En contraste, en el presente estudio se observó que en la biopelícula de mayor efecto inductor (3 días de formación), la concentración de células fue aproximadamente 3 veces menor que en otros días de formación en presencia de adultos de erizo morado, por lo que probablemente la inducción dependa del tipo de bacterias más que de la concentración o de una combinación de estas, esto es, la presencia de cierto tipo de bacterias a una densidad mínima para inducir a la metamorfosis.

En el conteo directo se registró una mayor concentración de células (de 2 a 10 veces) en biopelículas generadas en estanques con adultos de erizo morado que en biopelículas formadas en estanques con sólo agua de mar, esto se debe posiblemente a que las bacterias se adhieren preferentemente a sustratos en donde se encuentran los erizos por la disponibilidad de nutrientes. Aparte de la diferencia en concentración, las biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo presentaron una mayor diversidad en formas celulares (cocos, bacilos cortos, bacilos, bacilos largos y filamentos) que las formadas en presencia de sólo agua de mar.

Por otro lado, el conteo viable sólo representó del 1-18% del conteo directo. Esto es debido a que la mayoría de las bacterias (>95%) de las muestras de ambientes naturales no son cultivables por la tecnología actual (Ward *et al.*, 1990 citado por Qian *et al.*, 2003). De las 72 cepas morfológicamente diferentes encontradas sólo fue posible cultivar y aislar 48 cepas, esto posiblemente se debe a que el medio de cultivo no provee los nutrientes requeridos por las bacterias cuando se realizan transferencias sucesivas.

En el ensayo con erizo morado, el mayor número de cepas de bacterias se encontró en las biopelículas de 1 día de formación, sin embargo, los mayores porcentajes de inducción se dieron en biopelículas de 3 días. Lo anterior sugiere que al tercer día aparecen las cepas relacionadas con la inducción independientemente de la cantidad de cepas y posiblemente, se requieren al menos 3 días para que las cepas inductoras alcancen una densidad suficiente para que su capacidad inductora sea máxima.

Las pruebas de oxidasa y catalasa realizadas a las cepas de bacterias obtenidas de ambos tipos de biopelícula solo brindan un reducido panorama del metabolismo de las mismas, por lo que se recomienda realizar otras pruebas bioquímicas en trabajos posteriores para su caracterización fenotípica y conocer la diversidad metabólica en las biopelículas.

La composición bacteriana de las biopelículas generadas en presencia de sólo agua de mar y adultos de erizos morados fue diferente, lo cual posiblemente se debe a que algunos grupos de bacterias son atraídas por nutrientes que se encuentran en el ambiente en el que se localizan los erizos (alimento, metabolitos, productos de desecho, etc.). Lo anterior sugiere que los erizos favorecen la fijación de ciertos grupos bacterianos específicos que conforman las biopelículas, los cuales a su vez pueden inducir la metamorfosis de las larvas (Díaz-Pérez, 2006, Toonen y Pawlik, 2001).

El grupo *Rhodobacter* ha sido identificado en diferentes estudios y se ha observado que es uno de los primeros y mas abundantes colonizadores de las

biopelículas (Dang y Lovell, 2002; Jones *et al.*, 2007). Lau y Qian (2001) observaron que bacterias pertenecientes al grupo *Roseobacter* y principalmente al grupo de *Proteobacterias*, son las principales responsables del asentamiento y metamorfosis del poliqueto *Hydroides elegans*. En la presente investigación, las cepas identificadas que pertenecen al grupo *Roseobacter* sólo se registraron en biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado y estuvieron presentes desde el primer día de formación. De lo anterior se desprende, que estas cepas podrían estar involucradas en la respuesta de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo morado, lo que habrá que confirmar en estudios posteriores.

Por otro lado, Lau *et al.* (2002) encontraron que el asentamiento larval puede ser inducido por una variedad de bacterias pertenecientes al género de *Cytophaga*, en la rama *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* en la rama de Gram positivos, y los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio* en la rama γ -*Proteobacteria*. Huang y Hadfield (2003) observaron que *Cytophaga lytica* indujo a la metamorfosis a larvas de *H. elegans* hasta un 40%. En esta investigación, una cepa perteneciente al género *Cytophaga* fue encontrada en la biopelícula de mayor efecto inductor (3 días), por lo que es posible que sea una de las responsables de la inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo. También se encontraron cepas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Pseudoalteromonas*, solo que éstas fueron aisladas de biopelículas en presencia de solo agua de mar, las cuales tuvieron muy poco efecto inductor (8.9%). En un trabajo previo (Santiago-González, 2008) se realizó ensayos con películas monoespecíficas de *Pseudoalteromonas* sp., en los cuales se obtuvieron altos porcentajes de larvas de erizo morado metamorfoseadas (53.19%), esto se debe posiblemente a que estas bacterias fueron aisladas de pozas intermareales en donde habitan erizos morados. Para futuras investigaciones resultaría interesante realizar ensayos con películas monoespecíficas de las cepas de bacterias encontradas en este estudio, y ver su efecto en la metamorfosis de larvas de erizo.

En un trabajo previo realizado por Díaz-Pérez (2006) se observó que la composición bacteriana en las biopelículas que se formaron en presencia de erizo blanco y erizo morado fue diferente en cuanto a familias y géneros bacterianos. En las biopelículas generadas en presencia de erizo blanco se encontró que las cepas bacterianas que pertenecieron al género *Aeromonas* fueron las más representativas y presentaron un mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis (48%) de larvas de erizo blanco. De las biopelículas generadas en presencia de erizo morado aisló cepas de bacterias que pertenecieron a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Deleya* o *Marinobacter* y *Cytophaga* (de las cuales estas dos últimas también se encontraron en el presente estudio), siendo las del género *Pseudomonas* las más representativas y en ensayos con películas monoespecíficas las cepas de bacterias del género *Deleya* o *Marinobacter* fueron las que registraron el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco (17%), por lo que el autor sugiere que existe una relación entre erizos adultos y los grupos bacterianos que conforman las biopelículas que favorecen la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo de su propia especie.

En este trabajo también se encontraron cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudidiomarina* sp., *Glaciecola* sp., *Marinomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Sulfitobacter* sp., *Maribacter ulvícola*, *Rhodococcus* sp., y *Sphingopyxis* sp., mismos que no se reportan como inductores en el asentamiento y la metamorfosis. Al igual que en el presente estudio no se encuentra una relación de la presencia de éstos con la inducción a la metamorfosis del erizo morado; además, varios autores reportan estos géneros presentes en diferentes ambientes marinos, tales como aguas costeras y oceánicas, sedimentos costeros, hielo marino y fluidos hidrotermales submarinos (Helmke y Weyland, 1984; Kim *et al.*, 2008; Jean *et al.* 2009; Romanenko *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), mientras que en el presente trabajo se aislaron de biopelículas formadas en agua de mar. Por lo anterior, se asume que hay una amplia distribución de estos géneros en el ambiente marino y pueden desempeñar un papel importante en el proceso de sucesión bacteriana. Bacterias de los géneros *Glaciecola* sp., *Marinomonas* sp. y *Sulfitobacter* sp. también han sido aisladas de invertebrados marinos, pero no reportadas

con relación al asentamiento y metamorfosis (Romanenko *et al.*, 2003b; Ivanova *et al.*, 2004 y Lau *et al.*, 2006).

En la mayoría de las secuencias, solo fue posible identificar las cepas a nivel de género debido a que presentaban el mismo porcentaje de identidad en diferentes especies, ya que el número de bases en la secuencia utilizada en el presente trabajo fue menor a 400 pb, por lo que para estudios posteriores, se recomienda amplificar fragmentos mas grandes y apoyarse en las características fenotípicas para poder identificarlas. Rodicio y Mendoza (2004) mencionan que el ADN que codifica para el 16S ARNr es un gen altamente conservado que presenta regiones comunes a todos los organismos y contiene variaciones que se concentran en zonas específicas. En diversas investigaciones también se ha reportado que se requieren estudios de las características fenotípicas y la comparación de la secuencia completa para la identificación (Romanenko *et al.*, 2003a). Estas recomendaciones también fueron consideradas por Santiago-González (2008), ya que en su investigación obtuvo porcentajes de identidad máxima de entre 98 y 100% de cepas de bacterias aisladas de diversos sustratos y en algunos casos se empleó la información bioquímica para la identificación a nivel de especie.

8. CONCLUSIONES

La metamorfosis de las larvas de erizo morado es inducida por biopelículas bacterianas, lo que confirma estudios anteriores para la especie. La inducción fue mayor con biopelículas generadas en presencia de erizos adultos que con las formadas en sólo agua de mar.

La inducción a la metamorfosis fue diferente para cada día de formación de la biopelícula. El tercer día registró el mayor porcentaje de larvas de erizo morado metamorfoseadas (43.5%).

La concentración y la composición de bacterias variaron con el tiempo de formación de la biopelícula, por lo tanto se registró una sucesión de especies de bacterias.

La metamorfosis de las larvas de erizo morado no depende de la concentración de bacterias en la biopelícula, sino de las especies de bacterias presentes.

El conteo viable representó del 1–18 % del conteo directo en el ensayo con erizo morado.

Los géneros más probables presentes en el día de mayor inducción a la metamorfosis fueron: *Sulfitobacter* sp., *Rhodobacteraceae* sp. y *Cytophaga* sp.; el primero además se identificó en el día 7, mientras que los dos últimos se identificaron solo en el tercer día.

El número de cepas de bacterias aisladas en el estanque de agua de mar (37) fue casi igual que el número de cepas aisladas en el estanque con erizo morado (35). Sin embargo la composición de especies varió entre estanques. Los únicos géneros presentes en ambos tipos de estanques fueron *Alteromonas* sp. y *Sulfitobacter* sp.

9. ANEXOS

A. Medios de cultivo.

Para la cuantificación aislamiento y purificación, así como para la criopreservación de las cepas se utilizó el medio agar Zobell en sus presentaciones sólido (agar) y líquido (caldo), respectivamente.

1. Zobell, formulación para 1 L, pH 7.6: Bactopeptona 5 g, Extracto de levadura 1 g, Cloruro férrico (solución al 0.1%) 1 mL, Agar 13 g, Agua de mar envejecida 750 mL y agua desionizada 250 mL. Suspender los ingredientes en el agua de mar al 75%, ajustar pH (7.6) y hervir hasta disolución del agar. Esterilizar 15 min a 121°C y 15 L de presión. Esperar a que el medio esté a 45-50°C para verter en las cajas Petri.
2. Para el medio líquido, suspender los ingredientes (sin agar), ajustar pH (7.6), distribuir 10 mL en los tubos de ensayo y esterilizar.

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 se centrifugaron a 12 000 rpm por 5 min, y después se eliminó el sobrenadante.
2. Se resuspendieron las células por completo en 753 μ L de Buffer PI con 3.75 μ L de RNAasa a 100 mg/mL (0.5 mg/mL concentración final) y 1 mg/mL Lisozima (concentración final), removiendo el pellet perfectamente.
3. Se incubó la muestra por 30-60 min a 37°C.
4. Después del tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionaron 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 agitó suavemente e incubó por 30 min a 37°C.
5. Los tubos se removieron de la temperatura de incubación anterior y se incubaron nuevamente a 55°C por 30 min.

6. Posteriormente, a cada tubo se le adicionaron 200 μ L de cloroformo, agitando vigorosamente hasta que se formó una emulsión y se centrifugó a 1 200 rpm por 5 min.
7. Se adicionaron 200 μ L de Acetato de Potasio concentrado y se agitó suavemente la muestra, posteriormente se centrifugó 5 min. a 12 000 rpm.
8. Se recuperaron 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 adicionó un volumen de isopropanol, se dejó reposar 15 min. a temperatura ambiente, se centrifugó 15 min. a 14 000 rpm. Después se eliminó el sobrenadante.
10. Se agregaron 200 μ L de Etanol al 70% y se agitó suavemente, se centrifugó por 15 min a 14 000 rpm y por último se eliminó el sobrenadante.
11. El pellet de de DNA se dejó secar a temperatura ambiente.
12. Por último, el pellet se resuspendió en 20 μ L de Buffer TE.

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

Acetato de Potasio saturado: adicionar hasta que no se disuelva en la solución, usar H_2O desionizada estéril.

Buffer TE: 0.001 mM EDTA y 10 mM Tris.

C. Condiciones de PCR.

Reactivos:

1. Mezcla para PCR o master mix (22 reacciones): 368.5 μ L H_2O desionizada estéril, 110 μ L de Buffer PCR 5X (concentración final 1X: 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), 16.5 μ L de MgCl_2 50 mM (concentración final: 1.5 mM) y 11 μ L de dNTP's 10 mM (concentración final: 0.20 mM).

2. Tfi DNA Polimerasa.
3. Oligonucleótidos: 27F (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') y 1522R (5' - AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA- 3') y 785R (5' - CTA CCA GGG TAT CTA ATC C - 3').
4. La concentración final de DNA genómico que se utilizó en la reacción de PCR fue de 0.03 µg/mL.

Preparación de las reacciones de PCR: master mix 22.87 µL, primer Fwd 0.25 µL, primer Rvs 0.25 µL, Tfi DNA polimerasa 0.125 µL, DNA 1 µL en un volumen total de 25 µL.

D. Extracción de ADN genómico de algunas cepas aisladas, caracterizadas como diferentes morfológicamente.



Figura 14. Electroforesis en agarosa 0.8%. Extracción de DNA genómico de algunas de las cepas obtenidas de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado. **Carril 1:** Marcador de peso molecular; **carril 2:** BIOEM3E4; **carril 3:** BIOEM3E6; **carril 4:** BIOEM3E8; **carril 5:** BIOEM3E9; **carril 6:** BIOEM4E2; **carril 7:** BIOEM4E1; **carril 8:** BIOEM5E9.

E. Condiciones de PCR

Las primeras condiciones de los ciclos de PCR que se utilizaron fueron los siguientes: 1) ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 2) 35 ciclos consistentes de 94°C por 1 min, 59°C por un min, 72°C por 1 min; y una extensión del último paso consistente de 72°C por 10 min, de acuerdo a las condiciones modificadas por Santiago-

Gonzalez (2008) y descritas inicialmente por Lee *et al.*, (2003) para la amplificación del fragmento correspondiente al 16S rDNA. Bajo estas condiciones no se obtuvieron los fragmentos de interés, por lo que se decidió bajar 2°C a la temperatura de alineamiento (a 57°C). Bajo estas condiciones se obtuvieron los fragmentos de las cepas BIOAM1E4, BIOAM1E6, BIOAM4E7, BIOEM1E7, BIOEM1E8, BIOEM3E1, BIOEM3E4, BIOEM3E8, BIOEM3E9, BIOEM4E1 y BIOEM4E2.

En otras PCR realizados con DNA de las cepas que no amplificaron con el fragmento 1522R, se cambió el oligonucleótido utilizando el 785R (5' - CTA CCA GGG TAT CTA ATC C - 3') que junto con el 27F amplificaron un fragmento de 700 pb aproximadamente (figura 15).

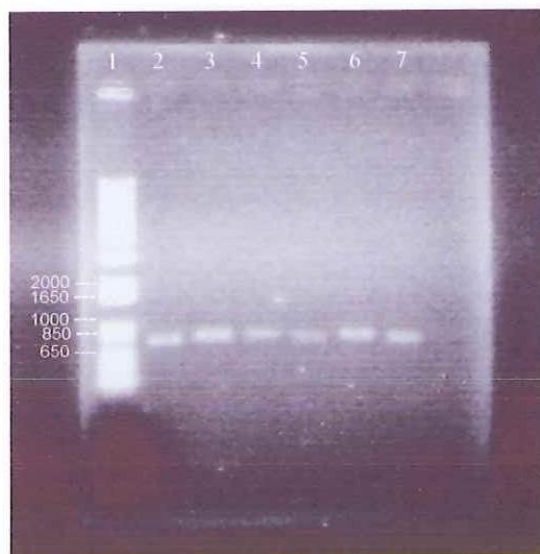


Figura 15. Electroforesis en agarosa 0.8%. Productos PCR purificados, fragmentos de aproximadamente 700 pb. **Carril 1:** Marcador de peso molecular; **carril 2:** BIOEM7E16; **carril 3:** BIOAM1E3; **carril 4:** BIOAM5E8; **carril 5:** BIOEM1E2; **carril 6:** BIOEM6E4; **carril 7:** BIOEM6E7.

F. Cepas caracterizadas morfológicamente.

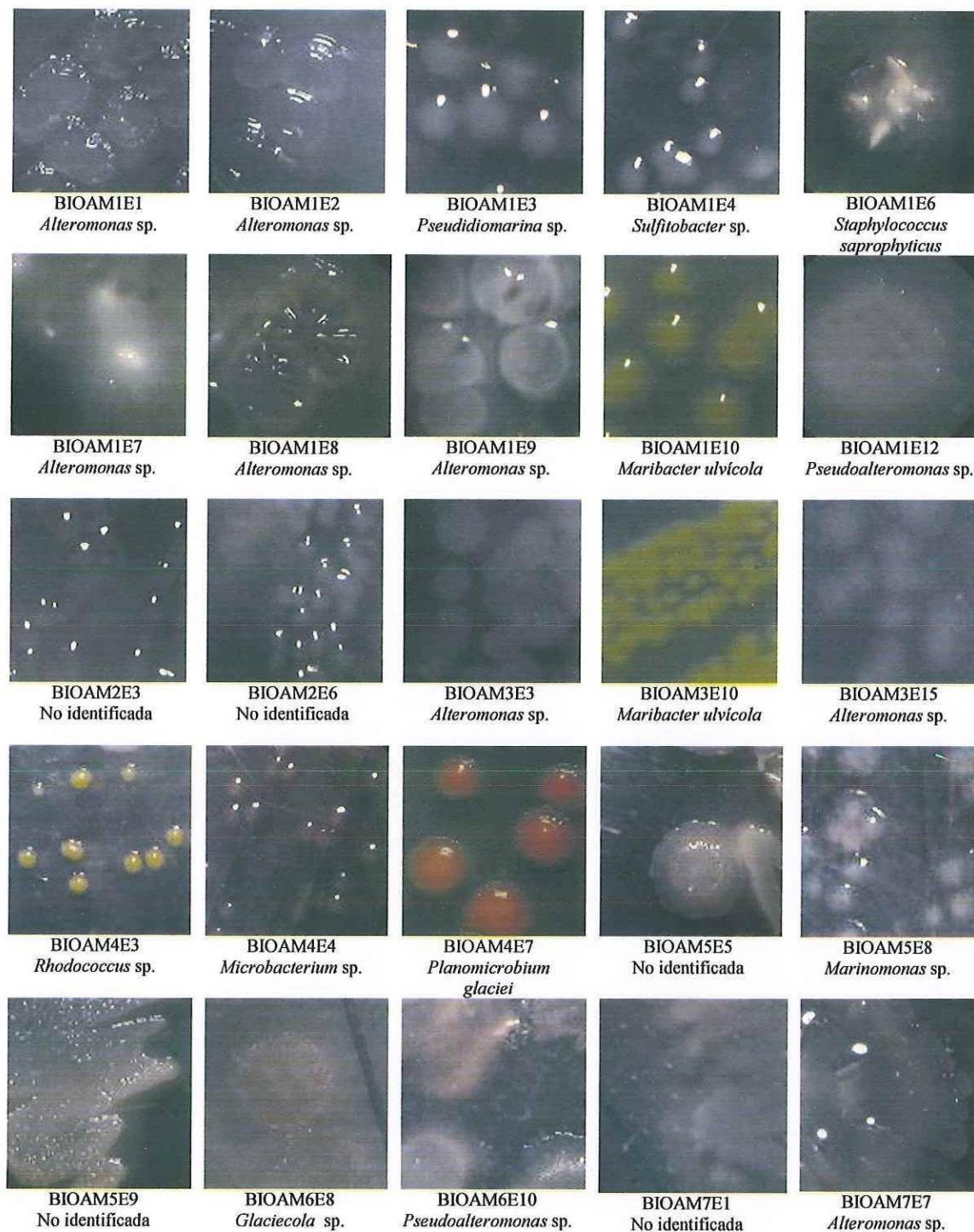


Figura 16. Colonias desarrolladas por las cepas de bacterias aisladas en biopelículas formadas en presencia de sólo agua de mar.

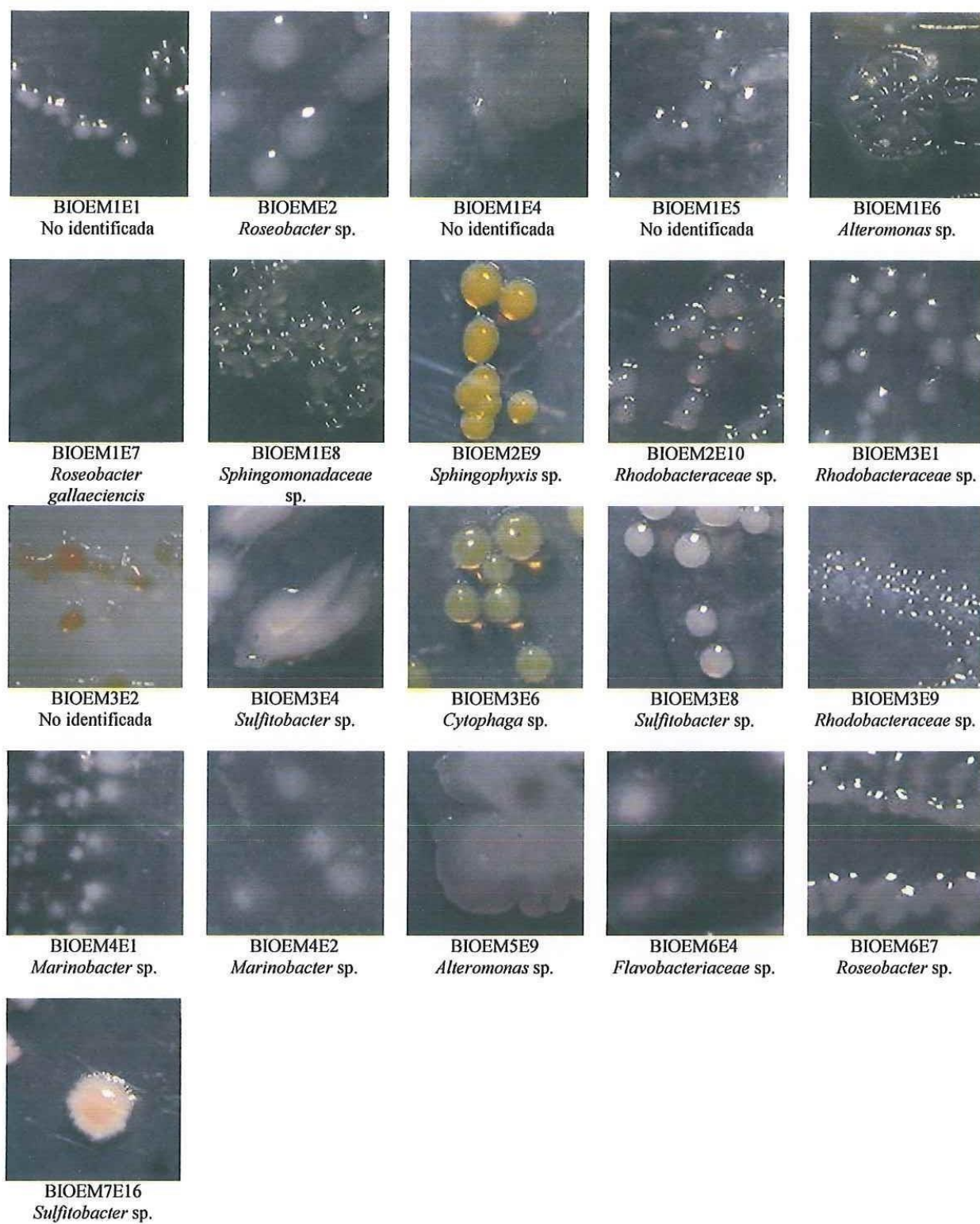


Figura 17. Colonias desarrolladas por las cepas de bacterias aisladas de biopelículas formadas en presencia de erizo morado.

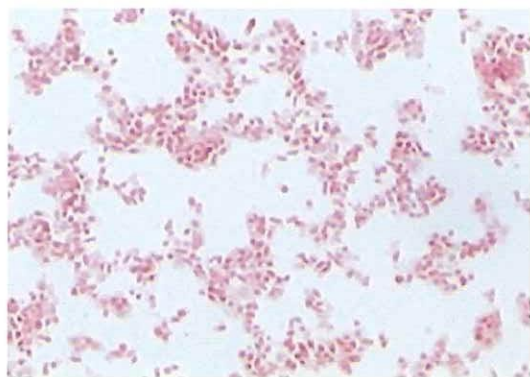
G. Características de las cepas de bacterias aisladas.

Tabla III. Características de cepas de bacterias encontradas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de agua de mar.

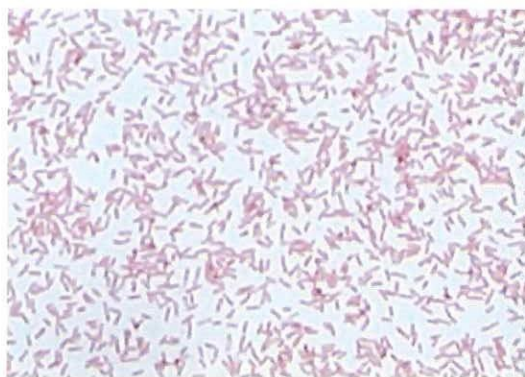
Cepa Bacteriana	Características							
	Forma	Elevación	Margen	Color	Bacteria	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
1. BIOAM1E1	Irregular	Elevada	Lobulado	Blanco traslúcido	Bacilos cortos	-	+	+
2. BIOAM1E2	Irregular	Umbonada	Ondulado	Blanco	Bacilos cortos	-	+	+
3. BIOAM1E3	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	-	-	-
4. BIOAM1E4	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos cortos	-	+	-
5. BIOAM1E6	Circular	Elevada	Entero	Blanco	Cocos	-	+	+
6. BIOAM1E7	Circular	Umbonada	Entero	Blanco	Bacilos cortos	-	+	+
7. BIOAM1E8	Circular	Umbonada	Entero	Blanco traslúcido	Bacilos cortos	-	+	+
8. BIOAM1E9	Circular	Umbonada	Entero	Blanco traslúcido	Bacilos cortos	-	+	+
9. BIOAM1E10	Irregular	Umbonada	Ondulado	Amarillo	Bacilos largos	-	+	+
10. BIOAM1E12	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos	-	+	+
11. BIOAM2E3	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos cortos	-	+	+
12. BIOAM2E6	Circular	Umbonada	Entero	Beige	Bacilos cortos	-	+	+
13. BIOAM3E3	Circular	Umbonada	Entero	Blanco	Bacilos cortos	-	+	+
14. BIOAM3E10	Irregular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Bacilos	-	+	+
15. BIOAM3E15	Circular	Umbonada	Entero	Blanco traslúcido	Bacilos cortos	-	+	+
16. BIOAM4E3	Circular	Elevada	Entero	Amarillo	Bacilos	-	+	-
17. BIOAM4E4	Circular	Convexa	Entero	Amarillo traslúcido	Bacilos cortos	-	-	-
18. BIOAM4E7	Irregular	Convexa	Ondulado	Naranja	Cocos	-	+	-
19. BIOAM5E5	Irregular	Convexa	Ondulado	beige	Bacilos cortos	-	+	+
20. BIOAM5E8	Irregular	Plana	Lobulado	Blanco	Bacilos cortos	-	-	-
21. BIOAM5E9	Irregular	Elevada	Ondulado	Beige	Bacilos cortos	-	+	+
22. BIOAM6E8	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos cortos	-	+	+
23. BIOAM6E10	Irregular	Plana	Umbonada	Blanco	Bacilos cortos	-	+	+
24. BIOAM7E1	Irregular	Plana	Lobulado	Beige	Bacilos	-	+	+
25. BIOAM7E7	Irregular	Plana	Lobulado	Beige	Bacilos	-	+	+

Tabla IV. Características de las cepas de bacterias encontradas en cada uno de los días de generación de biopelículas formadas en presencia de adultos de erizo morado.

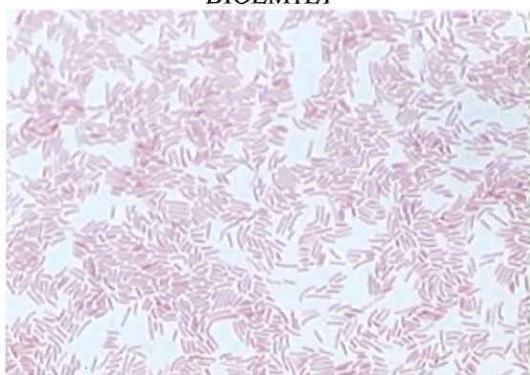
Cepa Bacteriana	Características							
	Forma	Elevación	Margen	Color	Bacteria	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
1. BIOEM1E1	Circular	Umbonada	Entero	Beige	Bacilos cortos	-	-	-
2. BIOEM1E2	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	-	-	-
3. BIOEM1E4	Irregular	Elevada	Lobulada	Blanco traslúcido	Bacilos	-	+	+
4. BIOEM1E5	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	-	+	-
5. BIOEM1E6	Circular	Umbonada	Entero	Blanco traslúcido	Bacilos	-	+	+
6. BIOEM1E7	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos cortos	-	+	-
7. BIOEM1E8	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Bacilos cortos	-	+	-
8. BIOEM2E9	Circular	Umbonada	Entero	Amarillo	Bacilos cortos	-	+	+
9. BIOEM2E10	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos	-	-	+
10. BIOEM3E1	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos largos	-	+	-
11. BIOEM3E2	Circular	Convexa	Entero	Naranja traslúcido	Bacilos	-	-	-
12. BIOEM3E4	Rizoide	Elevada	Filamentosa	Beige	Bacilos largos	-	+	+
13. BIOEM3E6	Circular	Convexa	Entero	Amarilla	Bacilos	-	+	+
14. BIOEM3E8	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos largos	-	+	+
15. BIOEM3E9	Circular	Umbonada	Entero	Blanco	Bacilos	-	+	+
16. BIOEM4E1	Irregular	Plana	Ondulado	Blanco	Bacilos	-	+	-
17. BIOEM4E2	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	-	+	+
18. BIOEM5E9	Irregular	Convexa	Ondulado	Beige	Bacilos	-	+	+
19. BIOEM6E4	Circular	Umbonada	Entero	Beige	Bacilos	-	-	-
20. BIOEM6E7	Circular	Convexa	Entero	Beige	Bacilos	-	+	+
21. BIOEM7E16	Rizoide	Umbonada	Lobulada	Beige y café	Bacilos largos	-	+	+



Bacilos cortos
BIOEM1E1



Bacilos
BIOAM7E1



Bacilos largos
BIOEM3E8



Cocos
BIOAM1E6

Figura 18. Tinción Gram de los diferentes tipos de formas celulares observadas en las cepas de bacterias aisladas de las biopelículas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, K. R., 1980. Common intertidal invertebrates of Southern of California. Peek Publications.
- Atlas, R. M. y Bartha, R., 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación, S.A., Madrid. 178 – 180.
- Bao, W. Y., Satuito, C. G., Yang, J. L. y Kitamura, H., 2007. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Marine Biology* 150:565–574.
- Cardoso-Martínez, F., 2008. Purificación y elucidación estructural de compuestos químicos que inducen a la metamorfosis de larvas de erizo de mar (*Lytechinus pictus*). Tesis de Maestría, U.A.B.C., Ensenada, Baja California, México. pp. 63.
- 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. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas*. 28,157-166
- Chen, P. H., Chen, Y. H. y Chen, I. M., 2007. Effect of biofilm age and type on settlement of cyprids of the barnacle, *Fistulobalanus albicostatus* Pilsbry (Thoracica: Balanidae). *Zoological Studies* 46(4): 521-528.
- Crisp, D. J., 1974. Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae, IN: Grant, P. T. y Mackie, A. M. (eds.). *Chemoreception marine organisms*. Academic Press, New York; 177-265.
- Dang, H. Y. y Lovell, C. R., (2002) Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 68: 496-504
- 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.
- Faimali, M., Garaventa, F., Terlizzi, A., Chiantore, M. y Cattaneo-Vietti, R., 2004. The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulation of *Balanus*

- amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 306: 37-50.
- Fusentani, N., 2004. Biofouling and antifouling. Review. *Natural Products Reports*. 21: 94-104.
- Hadfield, M. G. y Paul, V. J. 2001. Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine-invertebrate larvae, IN: McClintock, J.B.; Baker, B.J. (eds.). *Marine chemical ecology. CRC Marine Science Series* 431-461
- Hadfield, M. G., Unabia, C. C., Smith, C. M. y Michael, T. M., 1994. Settlement preference of the ubiquitous fouler *Hydroides elegans*. IN: Thompson, M. F., Nagabhushanam, R., Sarojini, R. y Fingerman, M. (eds.). *Recent developments in biofouling control*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. 65
- Hadfield, M. G., E. Carpizo-Ituarte, K. Del Carmen, and B. T. Nedved. 2001. Metamorphic competence, a major adaptive convergence in marine invertebrate larvae. *Am. Zool.* 41: 1123-1131.
- Hamer, J. P., Walker, G. y Latchford, J. W., 2001. Settlement of *Pomatoceros lamarkii* (Serpulidae) larvae on biofilmed surfaces and the effect of aerial drying. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 260:113-131
- Helmke, E. y Weyland, H., 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov. an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34(2): 127-138.
- Huang, S. y Hadfield, M. C., 2003. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology Progress Series*. 260: 161-172.
- Hung, O. S., Lee, O. O., Thiagarajan, V., He, H. P., Xu, Y., Chung, H. C., Qiu, J. W. y Qian, P. Y., 2009. Characterization of cues from natural multi-species biofilms that induce larval attachment of the polychaete *Hydroides elegans*. *Aquatic Biology*. 4: 253-262.
- Ivanova, E. P., Gorshkova, N. M., Sawabe, T., Zhukova, N. V., Hayashi, K., Kurilenko, V. V., Alexeeva, Y., Buljan, V., Nicolau, D. V., Mikhailov, V. V. and Christen, R., 2004. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 475-480.
- Jean, W. D., Leu, T. Y., Lee, Ch. L., Chu, T. J., Lin S. Y. and Shieh, W. Y., 2009. *Pseudidiomarina marina* sp. nov. and *Pseudidiomarina tainanensis* sp. nov. and reclassification of *Idiomarina homiensis* and *Idiomarina salinarum* as

Pseudidiomarina homiensis comb. nov. and *Pseudidiomarina salinarum* comb. nov., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 53–59.

- Jin, T. y Qian, P. Y., 2005. Amino acid exposure modulates the bioactivity of biofilms for larval settlement of *Hydroides elegans* by altering bacterial community components Marine Ecology Progress Series. 297: 169–179.
- Johnson, C. R., Lewis, T. E., Nichols, D. S. y Degnan, B. M., 1997. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in marine invertebrates. IN: Proceedings of the 8th international coral reef symposium. 2: 1219–1224.
- Johnson, C. R., Muir, D. G. y Reysenbach, A. L., 1991. Characteristic bacteria associated with surfaces of coralline algae: a hypothesis for bacterial induction of marine invertebrate larvae. Marine Ecology Progress Series. 74: 281–294.
- Jones, P. R.; Cottrell, M. T.; Kirchman, D. L. y Dexter, S. C. 2007. Bacterial community structural of biofilms on artificial surfaces in an estuary. Microbial Ecology vol. 53, 153–162.
- Keough, M. J. y Raimondi, P. T., 1995. Responses of settling invertebrate larvae to bioorganic films: effects of different types of films. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 185: 235–253.
- Kim, K. K., Lee, K. Ch., Oh, H. M. y Lee, J. S., 2008. *Microbacterium aquimaris* sp. nov., isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 1616–1620.
- Lau, K. W. K., Ren, J., Wai, N. L. M., Lau, S. C. L., Qian, P. Y., Wong, P. K. y Wu, M., 2006. *Marinomonas ostreistagni* sp. nov., isolated from a pearl-oyster culture pond in Sanya, Hainan Province, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 2271–2275.
- Lau, S. C. K. y Qian, P. Y., 2001. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue. Marine Biology. 138: 321–328.
- Lau, S. C. K., Mak, K. K. W., Chen, F. y Qian, P. Y., 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*. Marine Ecology Progress Series 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 the marine invertebrates. Aquatic Microbial Ecology. 38: 41–51.

- Lawrence, J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, and D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558-6567.
- Lee, Y. K.; Kwon, K. K.; Cho, K. H.; Kim, H. W.; Park, J. H. y Lee, H. K., 2003. Culture and Identification of bacteria from marine biofilms. *J. Microbiol.* Vol 41, no. 3 pp. 183-188.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolate of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- Marshall, K. C., Stout, R. and R. Mitchell, 1971: Selective sorption of bacteria from seawater. *Canadian Journal of Microbiology.* 17, 1413-1416.
- Mayer, C., R. Moritz, C. Kirschner, W. Borchard, R. Maibaum, J. Wingender, and H.C. Flemming. 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 3-16.
- McEdwards, L. D., 1995. Ecology of marine invertebrate larvae, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mitchell, R. y Kirckman, D. 1984. The microbial ecology of marine surfaces. Marine biodeterioration: an interdisciplinary study. 50-56.
- Oppenheimer, C.H. y ZoBell, C. E. 1952. Maintenance of marine bacteria. *Journal of Marine Research.* 11: 10-18.
- Palleiro Nayar, J. S., 1982. Estimación de la densidad y crecimiento del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Agassiz) para la zona de Santo Tomás, Baja California, México. UABC. Escuela de Ciencias Marinas. Tesis Profesional. 68 pp.
- Pawlik, J. R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates, IN: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review.* 30: 273-335.
- Qian, P. Y., Thiagarajan V., Lau, S. C. K., Cheung, S. C. K., 2003. Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquatic Microbial Ecology.* 33:225-237
- Rahim S. A. K. A., Li J. Y. y Kitamura H., 2004. Larval metamorphosis of the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina* in response to biofilms. *Marine Biology.* 144:71-78

- 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, S. R., Ojeda, F. P. e Inestrosa, N. C. 1993. Review: Settlement of benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*. 97: 193-207.
- Romanenko, L. A., Tanaka, N. y Frolova G. M., 2009. *Marinomonas arenicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 59: 2834-2838.
- Romanenko, L. A., Zhukova, N. V., Rohde, M., Lysenko, A. M., Mikhailov, V. V. y Stackebrandt, E., 2003a. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 125-131.
- Romanenko, L. A., Zhukova, N. V., Rohde, M., Lysenko, A. M., Mikhailov V. V. y Stackebrandt, E., 2003b. *Glaciecola mesophila* sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 647-651.
- Ruppert, E. E. y Barnes, R. D., 1996. Zoología de los invertebrados. 6a. edición. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 958-974
- Santiago-González, M., 2008. Películas bacterianas asociadas a la presencia de adultos de erizo morado "*Strongylocentrotus purpuratus*", en pozas intermareales de la costa Oeste de Baja California. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. UABC. Ensenada, Baja California, México.
- Satuito, C. G., Shimizu, K. y Fusentani, N., 1997. Studies on the factors influencing larval settlement in *Balanus amphirite* and *Mytilus galloprovincialis*. *Hidrobiología*. 358: 275-280.
- Shikuma, N. J. y Hadfield, M. G., 2006. Temporal variation of an initial marine biofilm community and its effects on larval settlement and metamorphosis of the tubeworm *Hydroides elegans*. *Biofilms*. 1-8.
- Tamura, K., Nei, M. y Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS*. 101(30): 11030-11035.
- Toonen, R. J. y Pawlik, J. R., 2001. Settlement of the gregarious tube worm *Hydroides dianthus* (Polychaeta: Serpulidae). I. Gregarious and nongregarious settlement. *Marine Ecology Progress Series*. 224: 103-114.

- Unabia, C. R. C, y Hadfield, M. G., 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biology*. 135: 55-64.
- Ward, D.M., Weller, R. y Bateson, M. M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 345:63-65
- Wieczorek S. K., Todd, C. D., 1998. Biofilm cues and larval settlement. *Biofouling* 12:81-118
- Wimpenny, J. 2000. An overview of biofilms as functional communities. IN: Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. y Wilson, M. (eds.). *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge. 1-24
- Zhang, D. Ch., Liu, H. C., Xin, Y. H., Yu, Y., Zhou, P. J. y Zhou, Y. G., 2009. *Planomicrobium glaciei* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 1387-1390.
- Zigler, K. S. y Lessios, H. A., 2004. Speciation of the coasts of the New World: phylogeography and the evolution of binding in the sea urchin genus *Lytechinus*. *Evolution*. 58: 1225-1241.
- Zobell, C. E. y Allen, E. C., 1935. The significance of the marine bacteria in the fouling of submerged surfaces, *Journal of Bacteriology*. 29: 239-251.