

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**“INDUCCIÓN A LA METAMORFOSIS EN LARVAS DEL ERIZO BLANCO
Lytechinus pictus (Verrill 1867), MEDIANTE BIOPELÍCULAS Y
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS AISLADAS”**

Tesis

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

PRESENTA

LEOPOLDO DÍAZ PÉREZ

Ensenada, Baja California, México

Noviembre, 2006

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

Inducción a la metamorfosis en larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas

TESIS

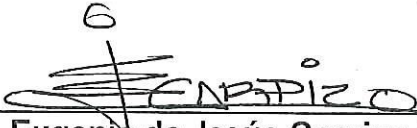
QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE


MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

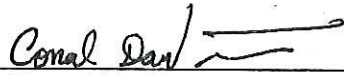
Leopoldo Díaz Pérez

Aprobada por:


Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Presidente del jurado.


Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal


M.C. Roberto Escobar Fernandez
Sinodal


M.C. Conal D. True
Sinodal

DEDICATORIA

- Este trabajo se lo dedico a mis padres ya que siempre me brindaron todo su apoyo durante la realización de mis estudios de maestría, deseándome lo mejor e impulsándome siempre a seguir adelante. Gracias por todo su cariño. Los quiero mucho.

- A mis hermanas que siempre me alentaron a echarle ganas en mis estudios y siempre estuvieron en los momentos en que necesitaba su apoyo. Gracias. Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por apoyarme y compartirme sus conocimientos durante mis estudios de maestría e impulsarme a seguir adelante y sobretodo por darme la oportunidad de formar parte en su grupo de trabajo. Gracias.
- A la Dra. Roxana Rico Mora por todas sus enseñanzas en el grandioso mundo de la Microbiología y por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo. Gracias por todo.
- Al M.C Roberto Escobar por apoyarme en todo momento cuando llegaba a tener problemas y por todas sus enseñanzas. Gracias.
- Al M.C Conal D. True por su apoyo durante la realización de mis estudios y por todos los comentarios sobre mi trabajo. Fueron de mucha utilidad. Gracias.
- A todos mis compañeros del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo: Gerardo, Raquel, Paola, Isamara, Juan Carlos, Carolina, Liz, Moises quienes me apoyaron en todo momento y hacen que el trabajo sea mas agradable y divertido.
- A mis amigos: Beto, Leti, Santa, Mariana, Alejandra, Gerardo, Mario, Tono, Miki, Andrea, Abraham, por siempre apoyarme y ser mis amigos.
- A Favi que siempre ha estado ahí para brindarme su amor y su apoyo en todo momento. Gracias. Te Amo Mucho.
- A todos y cada uno de los profesores que me brindaron su apoyo durante mis estudios de maestría.
- A todo el personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas y del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de investigaciones Ocenológicas, mediante los recursos otorgados por CONACyT por la beca No. 189730 y el proyecto interno del IIO No. CO1 47658 otorgado por CONACyT.



ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VII
Resumen	IX
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo General.	10
3.2 Objetivos Particulares.	10
4. Metodología	11
4.1 Colecta de organismos.	11
4.2 Inducción al desove, colecta de organismos y fertilización.	11
4.3 Mantenimiento de la larva.	12
4.4 Generación de biopelículas (<i>en condiciones de laboratorio</i>).	14
4.5 Inducción a la metamorfosis mediante biopelículas.	15
4.6 Evaluación de la inducción a la metamorfosis.	16
4.7 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas.	16
4.8 Preservación y almacenamiento de las cepas aisladas.	17
4.9 Generación de películas bacterianas monoespecíficas.	18
4.10 Ensayos de inducción a la metamorfosis con películas bacterianas monoespecíficas.	20
4.11 Identificación de las cepas bacterianas inductoras de la metamorfosis.	21
4.11.1 Morfología.	21
4.11.2 Pruebas Bioquímicas.	22
4.11.3 Identificación de las cepas bacterianas.	23
4.12 Análisis Estadísticos.	23
5. Resultados	25
5.1 Inducción al desove, colecta de organismos y fertilización.	25
5.2 Inducción a la metamorfosis mediante biopelículas.	26

Continuación..	Página
5.2.1 Biopelículas de 1, 2, 4 y 6 días de formación.	26
5.2.2 Biopelículas de 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación.	29
5.3 Obtención de cepas bacterianas a partir de las biopelículas inductoras a la metamorfosis en larvas de erizo blanco.	34
5.4 Generación de películas bacterianas monoespecíficas.	36
5.5 Inducción a la metamorfosis mediante películas bacterianas monoespecíficas.	36
5.5.1 Cepas aisladas de la biopelícula de erizo blanco de 15 días de formación.	36
5.5.2 Inducción a la metamorfosis mediante cepas bacterianas aisladas de biopelículas en presencia de erizos blancos adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	41
5.5.3 Inducción a la metamorfosis mediante cepas bacterianas aisladas de biopelículas en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y biología del Desarrollo (IIO).	44
5.6 Identificación morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas.	48
5.6.1 Cepas bacterianas aisladas de las biopelículas en presencia de erizo blanco de 15 días de formación.	48
5.6.2 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizo blanco obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	55
5.6.3 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizo morado (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>) obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	60
6. Discusión	65
7. Conclusiones	74
8. Referencias	76
Apéndice I	86
1.1 Medios de cultivo para crecimiento bacteriano	86

Continuación..

1.2 Medios de cultivo para las pruebas bioquímicas	87
Apéndice II	91
2.1 Tablas de densidad bacteriana de los cultivos para ensayos de inducción a la metamorfosis mediante películas bacterianas monoespecíficas	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Fig. 1. Inducción al desove de erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> mediante KCl.	12
Fig. 2. Mantenimiento de la larva del erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> .	13
Fig. 3. Evaluación de la metamorfosis.	16
Fig. 4. Identificación morfológica de cepas bacterianas.	21
Fig. 5. Inducción al desove, fertilización y mantenimiento de la larva de erizo blanco <i>Lytechinus pictus</i> .	26
Fig. 6. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (<i>Lytechinus pictus</i>) a las 12 y 24h de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar con 1, 2, 4 y 6 días de formación.	28
Fig. 7. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (<i>Lytechinus pictus</i>) después de 12 horas de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar con 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación.	30
Fig. 8. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (<i>Lytechinus pictus</i>) después de 24 horas de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar con 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación.	31
Fig. 9. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (<i>Lytechinus pictus</i>) después de 48 horas de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar con 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación.	33
Fig. 10. Cepas bacterianas aisladas de las diferentes biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de invertebrados marinos, erizo blanco, erizo morado y agua de mar.	35

Continuación..

- Fig. 11.** Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 12 y 24h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de la biopelícula de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos. 37
- Fig. 12.** Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 48h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de la biopelícula de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos. 38
- Fig. 13.** Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 72h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de la biopelícula de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos. 40
- Fig. 14.** Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 24 y 48h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos. 42
- Fig. 15.** Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 12 y 24h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos. 45
- Fig. 16.** Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 48 y 72h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos. 47
- Fig. 17.** Cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días de formación generadas en presencia de erizos blancos adultos (*Lytechinus pictus*). 49
- Fig. 18.** Tinciones de Gram. de las cepas aisladas de la biopelícula de 15 días de formación generadas en presencia de erizos blancos adultos (*L. pictus*). 50

Continuación..

Fig. 19. Resultados de las pruebas de identificación rápida API 20E.	51
Fig. 20. Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos blancos adultos (<i>L. pictus</i>), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	55
Fig. 21. Tinciones de Gram. de las cepas de erizo blanco obtenidas del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	56
Fig. 22. Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO).	60
Fig. 23. Tinciones de Gram. de las cepas de erizo morado obtenidas del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas bacterianas inductoras, mediante de la elaboración de medios de cultivo.	22
Tabla II. Número de cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar.	34
Tabla III. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días en presencia de erizos blancos adultos.	48
Tabla IV. Pruebas de identificación bioquímica de las cepas bacterianas aisladas de la biopelícula de 15 días generada en presencia de erizos blancos adultos.	55-53
Tabla V. Posibles familias o géneros a los que pertenecieron las diversas cepas bacterianas aisladas de la biopelícula de 15 días de formación generada en presencia de erizos blancos adultos.	54
Tabla VI. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos blancos adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	55
Tabla VII. Pruebas de identificación bioquímica de las cepas bacterianas aisladas de erizo blanco (<i>L. pictus</i>), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	57-58
Tabla VIII. Posibles familias o géneros a los que pertenecieron las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques con presencia de erizos blancos adultos (<i>L. pictus</i>), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	59
Tabla IX. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	60

Continuación..

Tabla X. Pruebas de identificación bioquímica de las cepas bacterianas aisladas de erizo morado (<i>S. purpuratus</i>), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	62-63
Tabla XI. Posibles familias o géneros a los que pertenecieron las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques con presencia de erizos morados adultos (<i>S. purpuratus</i>), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	64
Tabla XII. Densidad bacteriana de los cultivos monoespecíficos de bacterias aisladas de la biopelícula de 15 días generada en presencia de erizos blancos adultos.	91
Tabla XIII. Densidad bacteriana de los cultivos monoespecíficos de bacterias aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	92
Tabla XIV. Densidad bacteriana de los cultivos monoespecíficos de bacterias aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).	93

Inducción a la metamorfosis en larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas

Resumen


El desarrollo larvario de los erizos de mar involucra un periodo de vida larval que culmina con la metamorfosis, la cual se produce en respuesta a estímulos producidos por biopelículas. Estas biopelículas son agregaciones de microorganismos, principalmente bacterias. La formación y composición bacteriana de las biopelículas en el ambiente marino es de suma importancia ya que se ha visto que son las responsables de determinar la distribución espacio-temporal de una gran variedad de invertebrados marinos. El presente trabajo tiene como objetivos evaluar la capacidad inductora a la metamorfosis en larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* mediante biopelículas generadas en condiciones de laboratorio en presencia de erizos blancos adultos, identificar mediante pruebas bioquímicas la composición bacteriana viable-cultivable aisladas a partir de las biopelículas y evaluar la capacidad inductora a la metamorfosis en larvas de *L. pictus* mediante películas bacterianas monoespecíficas. Las biopelículas fueron generadas en acuarios en presencia de erizos blancos adultos, erizos morados adultos (*Strongylocentrotus purpuratus*), invertebrados marinos diversos y agua de mar, por un lapso de 2 a 15 días. Las películas bacterianas monoespecíficas fueron generadas por un lapso de 24 a 48 horas. La evaluación de la inducción a la metamorfosis se realizó a las 12, 24, 48 y 72 horas de exposición. La identificación de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas con el kit de identificación rápida API 20 E y API 20 NE. Se observó el mayor porcentaje de inducción a metamorfosis de las larvas de erizo blanco en presencia con las biopelículas generadas con un mayor tiempo de formación (9 – 15 días) y con las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos. En las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos se encontraron bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* y de la familia *Enterobacteriaceae*. En las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos se encontraron los generos *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Delega*, *Marinobacter* y de la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias del genero *Aeromonas* aisladas a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos fueron las principales que indujeron a la metamorfosis a las larvas de erizo blanco. Las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados, no indujeron a la metamorfosis a las larvas de erizo blanco. Se concluyó que existe una cierta especificidad en la respuesta de las larvas de erizo blanco, para metamorfizarse sobre biopelículas generadas en presencia de adultos de su misma especie, probablemente debido a ciertos grupos bacterianos específicos que se encuentran en estas biopelículas, ya que se encontró diferencias en cuanto a la composición bacteriana de las biopelículas de erizo blanco y erizo morado.



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Director de Tesis



Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal



M.C. Roberto Escobar Fernández
Sinodal



M.C. Conal David True
Sinodal

1. Introducción

La mayoría de los invertebrados marinos presentan un fase de vida planctónica (producción de larvas pelágicas) que precede a la fase de vida bentónica (juvenil/adulto). La transición entre ambas fases ocurre mediante los procesos de asentamiento y metamorfosis (Nielsen 2000). La selección del hábitat adecuado para llevar acabo el asentamiento y metamorfosis de las larvas, es determinante en la sobrevivencia de los juveniles y adultos y por lo tanto, la distribución y abundancia de los organismos (Pawlik y Hadfield, 1990).

Larvas de un gran número de invertebrados marinos llevan acabo el asentamiento y metamorfosis selectivamente en sustratos donde se presentan las condiciones necesarias para su crecimiento y sobrevivencia, para esto, las larvas responden a ciertas claves o factores ambientales ya sean físicas (intensidad de luz, velocidad de flujo, temperatura) (Moss, 1999; Pineda y López, 2002), o químicas de origen biológico (metabolitos, neurotransmisores, hormonas)(Hadfield y Paul, 2001) presentes sobre los sustratos. Estas claves ambientales químicas de origen biológico, son producidas por macroalgas (Morse y Morse, 1984; Heyward y Negri 1999; Williamson et al. 2000; Suenaga et al. 2004; Swanson et al. 2004), conespecíficos adultos (Pearce y Scheibling, 1990; Tamburri et al. 1992; Toonen y Pawlik, 2001), y por las bacterias que se

encuentran formando las biopelículas (Lau y Qian, 2001; Rahim et al. 2004; Huggett et al. 2006) principalmente.

Las biopelículas juegan un papel fundamental en los procesos de inducción o inhibición del asentamiento y metamorfosis en una gran variedad de larvas de invertebrados marinos incluyendo anélidos poliquetos (Kirchman et al. 1982, Unabia y Hadfield, 1999, Lau y Qian, 2001, Lau et al. 2002), corales (Negri et al. 2001, Webster et al. 2004), crustáceos (Maki et al. 1990, Thiyagarajan et al. 1999), equinodermos, (Rahim et al. 2004; Huggett et al. 2006) moluscos (Weiner et al. 1985). De esta manera, ha sido de gran interés en los últimos años, el estudio enfocado en el papel que juegan las biopelículas (y por ende las bacterias que se encuentran asociadas a estas), principalmente en la inducción a la metamorfosis.

Una biopelícula es un conjunto de células microbianas principalmente bacterias (también se encuentran diatomeas, protozoarios y hongos), las cuales se encuentran dentro de una matriz constituida de exo-polisacáridos que ellas mismas generan. Esta matriz le da ciertas ventajas a las bacterias que se encuentran dentro, por ejemplo, les provee resistencia a la resequedad, protección contra a los rayos ultravioleta, y a la depredación (Watnick y Kolter 2000; Donlan 2002). Las biopelículas pueden desarrollarse en una gran variedad de superficies, sean naturales (rocas, tejido vivo) o artificiales (plástico, vidrio). En relación a la composición de especies bacterianas, una biopelícula puede estar constituida por una sola especie (monoespecíficas) o bien por múltiples

especies, y se ha visto que esto depende de varias condiciones ambientales como son: disponibilidad de alimento, hidrodinámica, composición de la comunidad microbiana (Donlan 2002). Así mismo, las biopelículas juegan un papel muy importante en la producción y degradación de materia orgánica, contaminantes ambientales y del reciclamiento de nitrógeno, sulfuro y de muchos otros metales (Davey y O'toole 2000).

El erizo de mar *Lytechinus pictus* (Verrill 1867) es una de las 11 especies de erizo dentro del género *Lytechinus*. Las especies de este género se distribuyen a lo largo del continente americano, encontrándose desde California hasta las islas Galápagos en el Océano Pacífico y desde Bermuda hasta Brasil en el Océano Atlántico (Zigler y Lessios, 2004).

El erizo blanco *Lytechinus pictus* mide menos de 4 cm de diámetro de testa y presenta espinas cortas. Pertenece al Phylum Echinodermata, en el orden *Temnopleuroidea* en la familia *Toxopneustidae*. Habita desde la zona intermareal hasta una profundidad de 20 m, teniendo una distribución que va desde las costas de California hasta las Islas Galápagos en Ecuador (Allen, 1980; Zigler y Lessios, 2004).

A pesar de que *Lytechinus pictus* no representa una importancia económica, ha sido muy utilizado como un organismo modelo para entender ciertos procesos ecológicos como la reproducción (Ettensohn y McClay, 1988; Sherwood y McClay, 1999) y rutas de transducción metamórfica (Bishop y

Brandhorst, 2001). De esta manera, en el presente trabajo utilizamos al erizo de mar *Lytechinus pictus* como modelo para poder entender el papel que juegan las bacterias que forman biopelículas en la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco a un nivel de microescala. Como ya se mencionó anteriormente las biopelículas pueden ser las responsables de determinar en qué sustratos es posible que se lleve a cabo el asentamiento y la metamorfosis en el ambiente marino, por lo tanto, ecológicamente podrían determinar la sobrevivencia, distribución (dispersión) y abundancia de las poblaciones de erizo. Los resultados derivados de este trabajo, podrían ser muy útiles sobretodo para especies con importancia comercial como el erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), ya que podrán ayudar a entender los procesos ecológicos de estas especies y en un futuro desarrollar programas de protección de áreas de reproducción y reclutamiento con fines de conservación, pesca y acuaculturales.

El presente trabajo pretende evaluar la respuesta a la inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* mediante biopelículas generadas en presencia de erizos blancos y morados adultos en condiciones de laboratorio, así como también, evaluar la inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco mediante películas bacterianas mono-específicas y finalmente, la identificación bioquímica de las cepas de bacterias inductoras a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco.

2. Antecedentes

La presencia de biopelículas en las superficies marinas es un requisito necesario para que se lleve a cabo el asentamiento y metamorfosis de larvas de un amplio grupo de invertebrados marinos (Kirchman y Graham, 1982; Maki et al., 1990; Heyward y Negri, 1999; Thiyagarajan et al., 1999). Como ya se ha mencionado, estas biopelículas pueden formarse en cualquier tipo de superficie (natural o artificial).

Se ha visto que las macroalgas inducen al asentamiento y metamorfosis en ciertas especies de invertebrados marinos mediante la producción de compuestos (metabolitos secundarios) (Aileen y Daniel, 1984; Walters et al. 1996; Williamson et al. 2000; Takahashi et al. 2002), pero en realidad muchos de estos compuestos son generados por bacterias que se encuentran formando biopelículas sobre la superficie de las algas (Johnson et al. 1991; Negri et al. 2001). Por lo que el estudio de las biopelículas generadas sobre las macroalgas ha sido ampliamente documentado. Johnson y Sutton (1994) encontraron que la alga coralina incrustante *Lithothamnium pseudosorum* inducía a la metamorfosis a la estrella de mar *Acanthaster planci* mediante la generación de compuestos, pero en realidad estos compuestos eran producidos por bacterias que formaban biopelículas sobre la planta. Por lo tanto, el determinar en que casos la inducción a la metamorfosis es realmente producida por las algas marinas o por las bacterias que forman biopelículas sobre las algas ha sido objeto de estudio. Negri et al. (2001) encontraron que la bacteria *Pseudoalteromonas* cepa A3

aislada de la superficie del alga coralina incrustante *Hydrolithon onkodes* inducía a la metamorfosis a larvas del coral *Acropora willisae* en proporciones superiores al 51%. Huggett et al. (2006) asilaron 250 cepas bacterianas a partir de varias especies de algas coralinas y encontraron que las bacterias pertenecientes al genero *Pseudoalteromonas* eran las principales cepas inductoras a la metamorfosis en el erizo de mar *Heliocidaris erythrogramma*. Por otro lado, Webster et al. (2004) encontraron que las larvas de varias especies de coral respondieron por arriba del 40% de inducción a la metamorfosis en presencia de biopelículas de 4 a 8 semanas de formación a diferencia de extractos de macroalgas.

La respuesta de larvas de invertebrados marinos en la inducción a la metamorfosis mediante biopelículas (generadas en el ambiente marino así como en condiciones de laboratorio en sustratos artificiales o naturales), también ha sido muy estudiada. En equinodermos se ha visto que para los erizos de mar *Pseudocentrotus depressus* y *Anthocidaris crassispina*, las larvas respondieron arriba del 70% de inducción a la metamorfosis en presencia de biopelículas de 15 a 25 días de formación en el ambiente marino (Rahim et al. 2004). Para el caso de la galleta de mar *Echinarachnius parma* se encontró una respuesta arriba del 60% de inducción al asentamiento y metamorfosis en arena acondicionada con organismos adultos, a diferencia de arena sin organismos adultos (Pearce y Scheibling, 1990), en donde se consideró que las biopelículas pudieran ser las principales responsables de la inducción. Por otra parte, en

crustáceos, Maki et al. (1990) encontraron que las biopelículas en el ambiente marino, inducen al asentamiento y metamorfosis en larvas del balano *Balanus amphitrite*, además también encontraron que las biopelículas con 4 días de formación así como algunas cepas bacterianas individuales, podían inhibir el asentamiento y metamorfosis de las larvas de esta especie.

En corales se ha visto que biopelículas de 4 a 8 semanas de formación inducen a la metamorfosis por arriba del 41% en larvas del coral *Acropora microphthalma*. En poliquetos, principalmente en *Hydroides elegans*, se ha visto que responden al asentamiento y metamorfosis por arriba del 50% en presencia de biopelículas marinas (Hadfield et al. 1994; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Unabia y Hadfield, 1999; Lau y Qian, 2001). La inhibición al asentamiento y metamorfosis ha sido documentada por Thiyagarajan et al. (1999), quienes encontraron que las biopelículas de 1 a 5 días de formación inhibían al asentamiento y metamorfosis en el balano *Balanus reticulatus*.

En cuanto a la composición bacteriana de las biopelículas, se han aislado una gran cantidad de bacterias a partir de biopelículas generadas en el ambiente marino, en donde se han encontrado una gran diversidad de especies bacterianas (Unabia y Hadfield, 1999; Huang y Hadfield, 2003). En el poliqueto *Hydroides elegans* se ha visto que éstos responden al asentamiento e inducción a la metamorfosis principalmente en presencia de bacterias de los géneros *Vibrio*, *Alteromonas* o *Pseudoalteromonas* (Lau et al., 2002).

Se han realizado pocos trabajos en donde se pueda determinar la especificidad de una especie bacteriana la cual sea la principal responsable de promover la inducción a la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos (Leitz y Wagner, 1993). En el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Ocenológicas (IIO) se ha documentado que las larvas de erizo morado y erizo blanco responden con la inducción a la metamorfosis cuando están en contacto con biopelículas generadas en presencia de erizos adultos, pero no se conoce la composición bacteriana de estas biopelículas, ni tampoco los metabolitos que éstas producen. De hecho a nivel mundial, se conoce muy poco acerca de los metabolitos que estas bacterias producen, y las cuales resultan responsables de inducir a la metamorfosis. Harder et al. (2002) probaron los extractos metabólicos de cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Micrococcus*, *Rhodovulum* y *Roseobacter* y encontraron que las cepas bacterianas presentaron metabolitos muy semejantes, los cuales inducían arriba del 60% el asentamiento y metamorfosis en larvas del poliqueto *Hydroides elegans*.

En general, se han aislado muy pocos compuestos del medio marino que resulten los responsables de inducir al asentamiento y metamorfosis en las larvas de invertebrados marinos (Hadfield y Paul 2001; Harder et al. 2002; Suenaga et al. 2004; Swanson et al. 2004). Por lo tanto el entendimiento de cómo actúan estos compuestos una vez que las larvas perciben la molécula (o moléculas) inductora (rutas de transducción metamórfica) (Morse 1990; Holm et

al. 1998; Zimmer y Butman 2000), ha sido documentado mediante la utilización de compuestos artificiales que inducen a las larvas al asentamiento y metamorfosis en una gran gama de invertebrados marinos (equinodermos: Naidenko, 1996, Saito et al. 1998, Rahmani y Ueharai 2001, Carpizo-Ituarte et al. 2002, Amador-Cano et al. 2006; crustáceos: Forward et al. 2001, Khadeparker 2002, Dobretsov y Qian, 2003; poliquetos: Pawlik 1990, Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998, Pechenik y Qian, 1998, Jin y Qin, 2004, Lam et al. 2005; moluscos: Yool et al. 1986, Bonar et al. 1990, Beiras y Windows, 1995 Fukazawa et al. 2001; ascidios: Tsukamoto et al. 1999, Zega et al. 2005; y otros invertebrados marinos (Pawlik y Hadfield, 1990).

De esta manera, con la contribución de este trabajo queda abierta la posibilidad para proyectos posteriores en donde se pueda llevar acabo la identificación de metabolitos secundarios producidos a partir de las principales cepas bacterianas involucradas en la inducción a metamorfosis en larvas del erizo blanco previamente aisladas e identificadas en este trabajo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad inductora a la metamorfosis y caracterizar por métodos bioquímicos las cepas bacterianas aisladas a partir de biopelículas generadas en condiciones de laboratorio, involucradas en la inducción a metamorfosis en larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus*.

3.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la capacidad inductora de la metamorfosis en larvas de erizo blanco por biopelículas generadas en presencia de adultos de erizos blancos (*L. pictus*) y morados (*Strongylocentrotus purpuratus*) e invertebrados marinos diversos.
- Evaluar la capacidad inductora de la metamorfosis en larvas de erizo blanco, mediante cepas individuales de bacterias aisladas de las biopelículas generadas en presencia de adultos de erizos blancos (*L. pictus*) y erizos morados (*S. purpuratus*).

4. Metodología

4.1 *Colecta de los Organismos*

Los erizos blancos adultos así como el resto de los organismos fueron colectados en la Bahía de Todos Santos en Ensenada Baja California, México (Latitud: 31° 51', longitud: 116° 53') durante el periodo de Agosto a Noviembre del año 2005.

4.2 *Inducción al desove, colecta de gametos y fertilización*

Para estimular la liberación de los gametos, los organismos fueron inyectados con 0.5mL de KCl (530mM). Los gametos se colectaron por separado (óvulos y espermatozoides) en frascos de vidrio de 100mL (Fig. 1). Para realizar la fertilización *in vitro*, los huevos fueron lavados previamente con agua de mar filtrada a $.2\mu\text{m}$ y esterilizada mediante luz ultravioleta y autoclave (AMF). Mediante el uso de tamices con una luz de malla de $60\mu\text{m}$ se retiró el exceso de materia orgánica producida por los organismos al momento de realizar el desove. Posteriormente, la fertilización se llevó acabo colocando el total de óvulos de todas las hembras en un envase de 5L en donde se agregó una cuarta parte del total del esperma colectado de todos los machos (entre 500mL y 1L). Después de agregar el esperma, la solución se dejó reposar por 25 minutos para que todos los óvulos se fertilizaran.

En total se realizaron 8 inducciones al desove con diferencia de tiempo de una semana entre cada desove. De 6 a 8 erizos blancos adultos se utilizaron en cada desove.

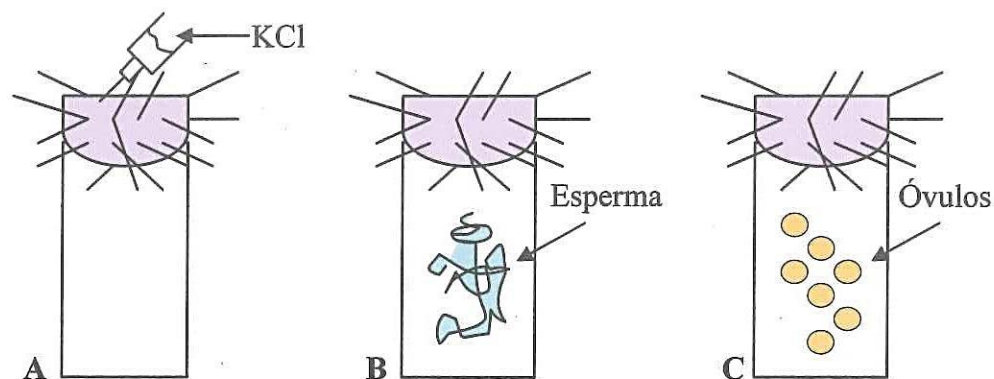


Fig. 1. Inducción al desove de erizo blanco *Lytechinus pictus* mediante KCl. (A) inyección de 0.5ml de KCl, (B) liberación de espermatozoides por un macho, (C) liberación de óvulos por una hembra.

Una vez fertilizados, los óvulos fueron enjuagados con AMF para eliminar el exceso de espermatozoides, posteriormente fueron colocados en recipientes de 10 litros en donde se llevó a cabo el desarrollo embrionario hasta alcanzar el estadio de larva prisma. Cuando la larva llegó a este estadio, fue transferida a tanques de 45 L con aeración continua en donde fue alimentada y mantenida hasta que alcanzó el estadio de larva competente.

4.3 Mantenimiento de la larva

La larva fue mantenida a una densidad de 2 larvas por mililitro en tanques cónicos de 45 L a una temperatura entre 20 y 22°C y fue alimentada

diariamente con la microalga *Rhodomonas* sp. hasta alcanzar el estadio de competencia (Fig. 2).

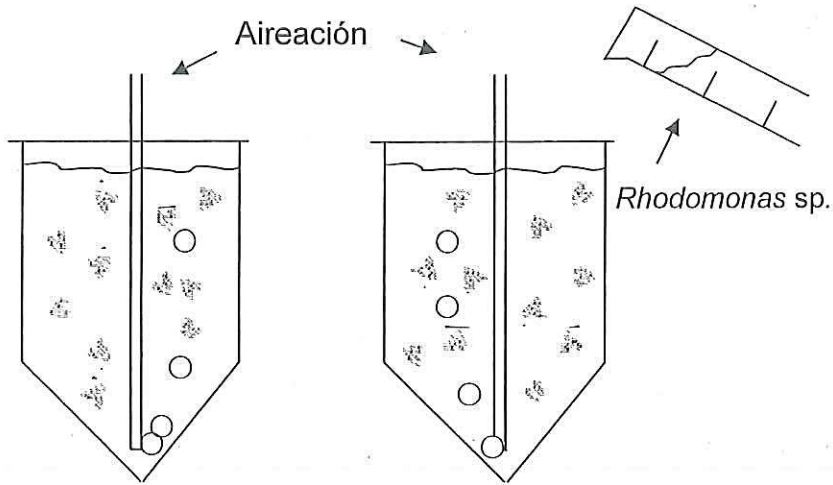


Fig. 2. Mantenimiento de la larva del erizo blanco *Lytechinus pictus*, en tanques cónicos de 45L, con aireación continua y alimentación diaria con la microalga *Rhodomonas* sp. hasta llegar al estadio de larva competente.

Se realizó la limpieza de tanques al 100% una vez a la semana y cada 48hrs al 50%. La limpieza al 100% comprendió en retirar toda la larva del tanque para limpiar el fondo del mismo y hacer recambio completo de agua. En el recambio al 50% la larva fue mantenida dentro del tanque pero se realizó el recambio de agua de la mitad del tanque mediante la utilización de tamices con luz de malla menor al tamaño de la larva (por lo general se utilizaron tamices de 70 a 200 μ m).

4.4 Generación de biopelículas (en condiciones de laboratorio)

Alrededor de 15 a 20 erizos blancos y morados adultos (por separado) fueron mantenidos en acuarios de 45 litros con flujo de agua de mar continuo (velocidad de flujo de agua entre 1.5 y 1.9L min⁻¹), en donde se indujo la formación de las biopelículas. Cajas de 6 pozos (BD Falcon, Cat. EF24890Q Daigger,) estériles fueron introducidas en los acuarios de erizos blancos y morados adultos durante varios días para favorecer la formación de la biopelícula a una temperatura ambiente entre 24 y 26°C. Las cajas permanecieron dentro de los acuarios por 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13 y 15 días. Una vez que las cajas tuvieron la edad de formación requerida, fueron retiradas del acuario y enjuagadas con agua de mar filtrada y esterilizada para retirar el exceso de materia orgánica. Posteriormente se les adicionaron 5mL de agua de mar filtrada y esterilizada para realizar el ensayo de inducción a la metamorfosis.

En forma separada, fueron mantenidos otros acuarios. Un acuario se mantuvo solamente con flujo de agua de mar proveniente de la tubería de entrada al laboratorio, el otro acuario fue mantenido con invertebrados marinos diversos (principalmente Gasterópodos), excepto erizos. En estos acuarios también se generaron biopelículas con los mismos días de formación que en los acuarios de erizos blancos y morados adultos. Estas biopelículas fueron utilizadas para determinar la especificidad de la larva de erizo blanco a las biopelículas generadas en otras condiciones.

4.5 Inducción a la metamorfosis mediante biopelículas

Los experimentos de inducción a metamorfosis se realizaron con 6 réplicas en cada tratamiento. Las cajas de 6 pozos (en donde se generaron las biopelículas) fueron retiradas de todos los acuarios y posteriormente fueron enjuagadas con agua de mar filtrada y esterilizada para remover el exceso de materia orgánica y enseguida se adicionaron 5mL de agua de mar filtrada y esterilizada. En cada pozo fueron introducidas de 20 a 30 larvas competentes para cada uno de los tratamientos. Los experimentos fueron divididos en 2 partes, el primero consistió en la inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco utilizando las biopelículas de 1, 2, 4 y 6 días de formación. En el segundo experimento se utilizaron las biopelículas de 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación.

Asimismo, se utilizó un control negativo el cual consistió en la adición de 20 a 30 larvas competentes a una caja de 6 pozos estéril (sin biopelícula) con agua de mar filtrada y esterilizada (AMF). El control positivo consistió en la adición de 20 a 30 larvas competentes en agua de mar filtrada y esterilizada que contenía KCl a una concentración final de 100mM. En esta solución las larvas permanecieron por un tiempo de 15 a 20 minutos.

Posteriormente las larvas fueron retiradas y puestas en 5mL de agua de mar filtrada y esterilizada. Los controles también fueron realizadas 6 replicas.

4.6 Evaluación de la inducción a la metamorfosis

La evaluación del porcentaje de inducción a la metamorfosis se llevo a cabo cuantificando el número de postlarvas en cada pozo, multiplicando por 100 el total de estas y dividiendo el resultado entre el total de larvas en el pozo (Fig. 3A). El procedimiento anterior se realizó para cada una de las réplicas. Se consideraron como postlarvas cuando se observó la presencia de espinas, pies ambulacrales y la reabsorción del epitelio larval (Fig. 3B). Tanto los tratamientos de inducción a la metamorfosis como los controles fueron evaluados a las 12, 24, 48 y 72h después de poner la larva en cada uno de los tratamientos.

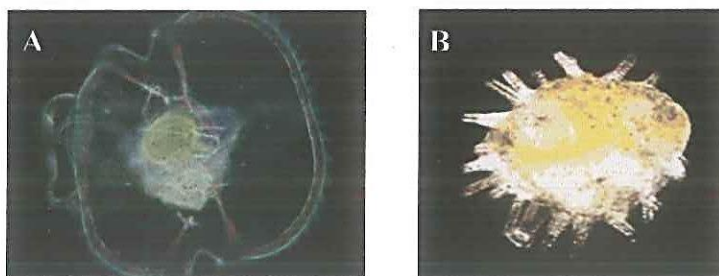


Figura 3. Evaluación de la metamorfosis. (A) larva de erizo competente, (B) postlarva de erizo blanco donde se aprecia la presencia de espinas, pies ambulacrales y se observa la reabsorción del epitelio larval.

4.7 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

De los tratamientos de inducción a la metamorfosis realizados en donde se observó un mayor porcentaje de metamorfosis de las larvas de erizo blanco, se tomó una muestra de 1cm² de la biopelícula mediante la utilización de hisopos estériles. Posteriormente, el hisopo fue introducido en 9ml de agua de

mar estéril y agitado varias veces para que las bacterias se resuspendieran. Se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en un volumen final de 10mL de agua de mar estéril. De cada tubo de dilución así como del tubo original se tomaron 100 μ L, y se sembraron en cajas de Petri con medio (agar) Zobell (ver Medios de Cultivo). Las colonias se cultivaron durante 7 días a una temperatura comprendida entre 22 y 25°C.

Todas las colonias encontradas tanto en las diluciones así como en el tubo original fueron seleccionadas con base en características morfológicas como el color, el tamaño, la forma y la elevación de la colonia. Los diferentes morfotipos bacterianos encontrados, fueron sembrados por separado en medio Zobell.

Para la purificación de las cepas bacterianas encontradas, se realizaron de 3 a 5 transferencias de las cepas originales a medio líquido y sólido Zobell.

4.8 Preservación y almacenamiento de las cepas aisladas

Las cepas bacterianas asiladas y purificadas fueron cultivadas en 10mL de medio Zobell líquido por un periodo que varió entre 24 y 48hr a una temperatura de 23 a 25°C. Posteriormente en tubos de microcentrífuga de 1.5mL se adicionó 1mL de cultivo de cada cepa por separado. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 500 μ L de glicerol al 10%, y se centrifugaron a 13,000g para al final decantar el sobrenadante procurando dejar un poco de medio de

cultivo con el pelet. Una vez realizado lo anterior, las cepas fueron almacenadas a -70°C .

4.9 Generación de películas bacterianas monoespecíficas

Cada cepa bacteriana aislada se cultivó en 10mL de medio líquido Zobell por un periodo que varió entre 24 y 48hr hasta que alcanzaron una densidad mayor a 10^7 células mL^{-1} . Posteriormente, en cajas de plástico de 6 pozos se adicionó un volumen determinado de bacterias en cada pozo (dependiendo de la concentración bacteriana de cada cepa) con medio líquido Zobell en un volumen final de 5mL, con la finalidad de que todas las cepas bacterianas tuvieran la misma densidad inicial de 10^7 células mL^{-1} al momento de empezar la formación de la película monoespecífica. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el volumen de cultivo bacteriano necesario para iniciar la formación de la película bacteriana a una concentración bacteriana de 10^7 células mL^{-1} (Ec. 1). Los volúmenes que fueron adicionados de cada cepa bacteriana se resumen en las tablas XI, XII y XIII (ver apéndice II).

Ec. 1:

$$\text{Volumen a Adicionar} = \frac{\text{Concentración deseada}}{\text{Concentración del medio de cultivo}} * 5\text{mL}$$

Las cajas de seis pozos fueron mantenidas a una temperatura de 22 a 25°C durante 48h para favorecer el crecimiento bacteriano y la formación de la

película en los pozos. Transcurridas 48h, se retiró el medio de cultivo y se enjuago la película de 1 a 2 veces con agua de mar filtrada y esterilizada para eliminar el exceso de bacterias. Por último se adicionaron 5mL de agua de mar estérilizada para los experimentos de inducción a la metamorfosis.

En el presente trabajo se utilizaron cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en acuarios en presencia de erizos blancos adultos, las cuales fueron nombradas con el código PBB (Tabla IV) , donde las letras PB significan *Proyecto Biopelículas* y la segunda letra B significa que fueron aisladas en presencia de erizos blancos. También fueron utilizadas cepas bacterianas obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), las cuales fueron aisladas a partir de biopelículas generadas en estanques con presencia de erizos blancos y morados adultos (por separado) por la estudiante Margarita González como parte de su trabajo de licenciatura. Las cepas bacterianas aisladas de erizo blanco se les nombró con el código BA y BB, en donde la primera letra B significa que fueron aisladas de estanques que contenían erizo blanco y la segunda letra A y B corresponden al número de experimentos realizados, es decir, experimento A y experimento B. De igual manera, las cepas bacterianas aisladas en presencia de erizo morado se nombraron con el código MA y MB, en donde, la letra M significa que fueron aisladas de estanques que contenían erizo morado y la letra A y B corresponden al número de experimentos realizados.

4.10 Ensayos de inducción a la metamorfosis con películas bacterianas monoespecíficas

A las cajas de 6 pozos con las películas bacterianas monoespecíficas se les adicionaron de 20 a 30 larvas competentes en cada pozo. Se realizaron tres réplicas por cada cepa bacteriana utilizada. Asimismo, se utilizó un control negativo que consistió en colocar de 20 a 30 larvas competentes en una caja de 6 pozos estéril (sin biopelícula) en 5mL de agua de mar filtrada y esterilizada (AMF) y un control positivo en donde se adicionaron de 20 a 30 larvas competentes en 5ml de agua de mar filtrada y esterilizada con KCl a una concentración final de 100mM. En esta solución las larvas permanecieron durante 15 minutos. Posteriormente las larvas fueron retiradas y pasadas a 5mL de agua de mar filtrada y esterilizada. Los controles también se realizaron por triplicado y se evaluó en cada tratamiento el porcentaje de metamorfosis a las 12, 24, 48 y 72 horas después de adicionadas las larvas.

4.11 Identificación de las cepas bacterianas inductoras de la metamorfosis

La identificación de las cepas bacterianas inductoras de la metamorfosis se llevó a cabo de acuerdo a su morfología y mediante el uso de pruebas bioquímicas.

4.11.1 Morfología

En la figura 4 se observan algunos de los aspectos que fueron tomados en cuenta para llevar a cabo la diferenciación de las cepas bacterianas de acuerdo a características morfológicas de las colonias.

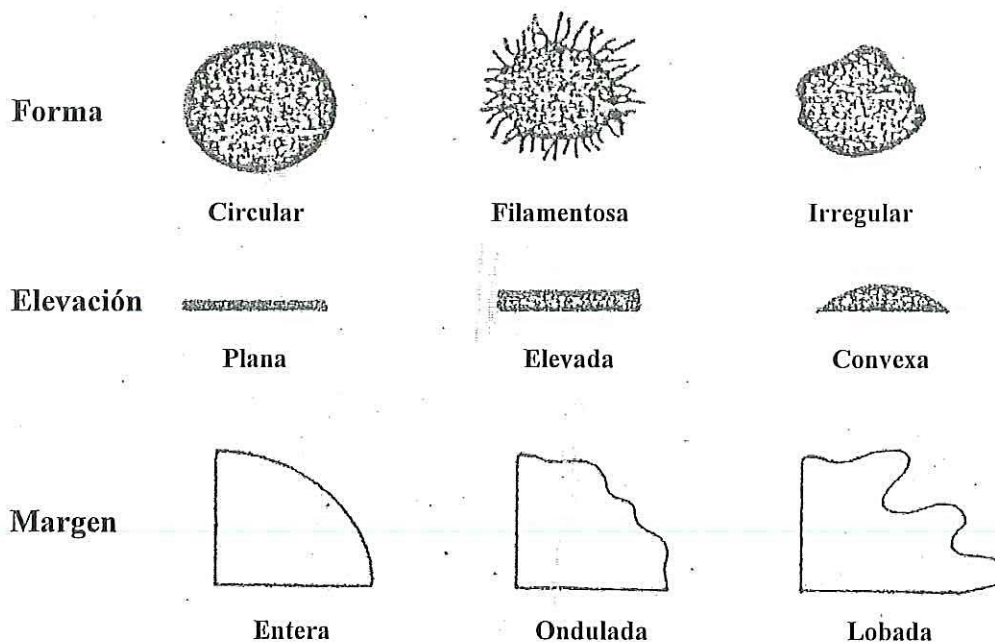


Figura 4. Identificación morfológica de cepas bacterianas. Aspectos morfológicos de las cepas bacterianas, para la identificación de las cepas bacterianas inductoras de la metamorfosis.

4.11.2 Pruebas bioquímicas

Para la identificación de las cepas bacterianas inductoras de la metamorfosis en larvas de erizo blanco, se realizaron diferentes pruebas bioquímicas. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las recomendaciones de Hansen y Sorheim (1991), para aislados marinos (ver tabla I y preparación de medios).

Tabla I. Pruebas fenotípicas, fisiológicas y bioquímicas usadas para la identificación de las cepas bacterianas.

Tinción de Gram.	Voges Proskauer
Oxidación / Fermentación	Sensibilidad al 0/129
Catalasa	Medio TCBS
Oxidasa	Salinidad 0%
Movilidad	Salinidad 6%
Indol	Salinidad 8%
Rojo de Metilo	Medio McConkey

También se realizaron otras pruebas bioquímicas mediante el uso del Kit de identificación rápida API 20 para bacterias entéricas y no entéricas (API 20E: Cat. 20160, API 20NE: Cat. 20050, BioMerieux). Este sistema de identificación rápida se diseñó originalmente para la identificación de bacterias de interés clínico, pero debido a la gran variedad de pruebas bioquímicas que contiene, es de gran utilidad para realizar de manera rápida y eficaz más de 30 pruebas

bioquímicas, con lo cual se puede llegar a una mejor identificación de las cepas bacterianas.

4.11.3 Identificación de las cepas bacterianas

La identificación de las cepas bacterianas inductoras se realizó mediante el uso del Manual Bergey's (Holt et al., 1994), así como de diferentes esquemas taxonómicos para la identificación de bacterias marinas (Oliver, 1982; Muroga et al. 1987; Alsina y Blanch, 1994a; Alsina y Blanch, 1994b).

4.12 Análisis Estadísticos

A los datos de porcentaje de metamorfosis, se les realizó la transformación arco-seno antes de realizar los análisis estadísticos. Las réplicas que presentaban valores de cero inducción a la metamorfosis se les dio un valor de $\frac{1}{4}n$ (n = número de larvas en cada réplica), con el fin de mejorar la transformación. Las diferencias estadísticas fueron probadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($\alpha = 0.05$). Cuando la normalidad de los residuos (Kolmogorov-Smirnov, prueba q-q) y la homogeneidad de varianzas no se cumplió, se realizó un ANOVA por rangos de Kruskal-Wallis.

Las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba de mínimos cuadrados (Fisher's LSD) y la prueba Student-Newman-Keuls (SNK).

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de los programas Sigma Stat software ver. 2.0 (Jandel Scientifics) y Statgraphics Plus ver. 1.4.

5. Resultados

5.1 Inducción al desove, colecta de gametos y fertilización

En todos los desoves realizados los erizos respondieron con liberación de gametos. Como observamos en la figura 5 (A), en los extremos se encuentran 2 hembras con liberación de óvulos, en el centro la liberación de espermatozoides de un macho, en la figura 5(B) se aprecian los óvulos sin fertilizar, mientras que en la figura 5(C) se observan los óvulos fertilizados.

En general, en casi todos los desoves, se encontraron más machos que hembras, en una relación de 2 :1. Las larvas mantenidas en los tanques cónicos (Fig. 5D) alcanzaron el estadio de competencia alrededor de los 22 y 25 días después de la fertilización a una temperatura entre 20 y 22°C.

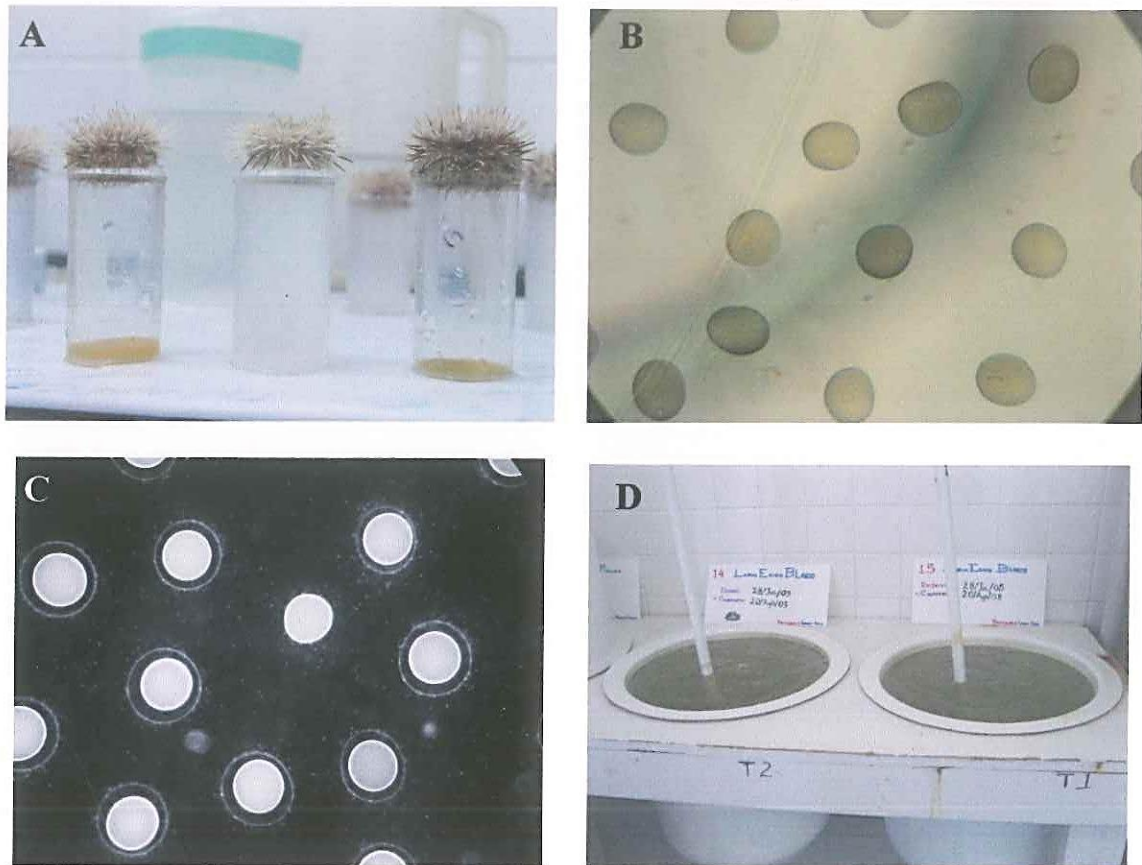


Figura 5. Inducción al desove, fertilización y mantenimiento de la larva de erizo blanco *Lytechinus pictus*. (A) liberación de gametos, en los extremos se observan dos hembras, en el centro un macho. (B) óvulos sin fertilizar. (C) óvulos fertilizados en donde se observa la membrana de fertilización y (D) tanques de 45L donde se mantuvieron las larvas hasta alcanzar el estadio de competencia.

5.2 Inducción de la metamorfosis mediante biopelículas

5.2.1 Biopelículas de 1, 2, 4 y 6 días de formación

La inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco después de 12 horas de exposición a las biopelículas mostró muy poca diferencia en la respuesta de las larvas a los diferentes tratamientos (Fig. 6A)(Kruskal-Wallis, $P < 0.05$). Se obtuvieron porcentajes similares de inducción a la metamorfosis con

las biopelículas de erizo blanco (10.5%) y las biopelículas generadas con invertebrados marinos (10.8%) (SNK, $P > 0.05$); mientras que las biopelículas generadas en presencia de erizo morado y agua de mar presentaron porcentajes un poco menores (8.5%). Las biopelículas generadas en presencia de invertebrados marinos y erizo blanco de 4 y 6 días de formación presentaron diferencias significativas con respecto a las biopelículas de erizo morado y agua de mar (SNK, $P < 0.05$), también presentaron diferencias significativas con el control negativo (SNK, $P < 0.05$). Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al control positivo (KCl) (SNK, $P < 0.05$)(Fig. 6A).

El mismo patrón de inducción a la metamorfosis fue observado a las 24 horas de exposición de las larvas de erizo blanco a las biopelículas, en donde se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $P < 0.05$)(Fig. 6B). Porcentajes similares fueron observados en las biopelículas de erizo blanco (15.2%) y las biopelículas de invertebrados marinos (14.6%) (LSD, $P > 0.05$), por otro lado las biopelículas de erizo morado y agua de mar presentaron valores mas bajos (9.5%). De la misma manera a lo observado en la evaluación a las 12 horas, se encontraron diferencias significativas de las biopelículas de erizo blanco e invertebrados marinos con respecto a las de erizo morado y agua de mar (LSD, $P < 0.05$), así también se encontraron diferencias con respecto al control negativo (LSD, $P < 0.05$). Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticas en relación con el control positivo (LSD, $P > 0.05$)(Fig. 6B).

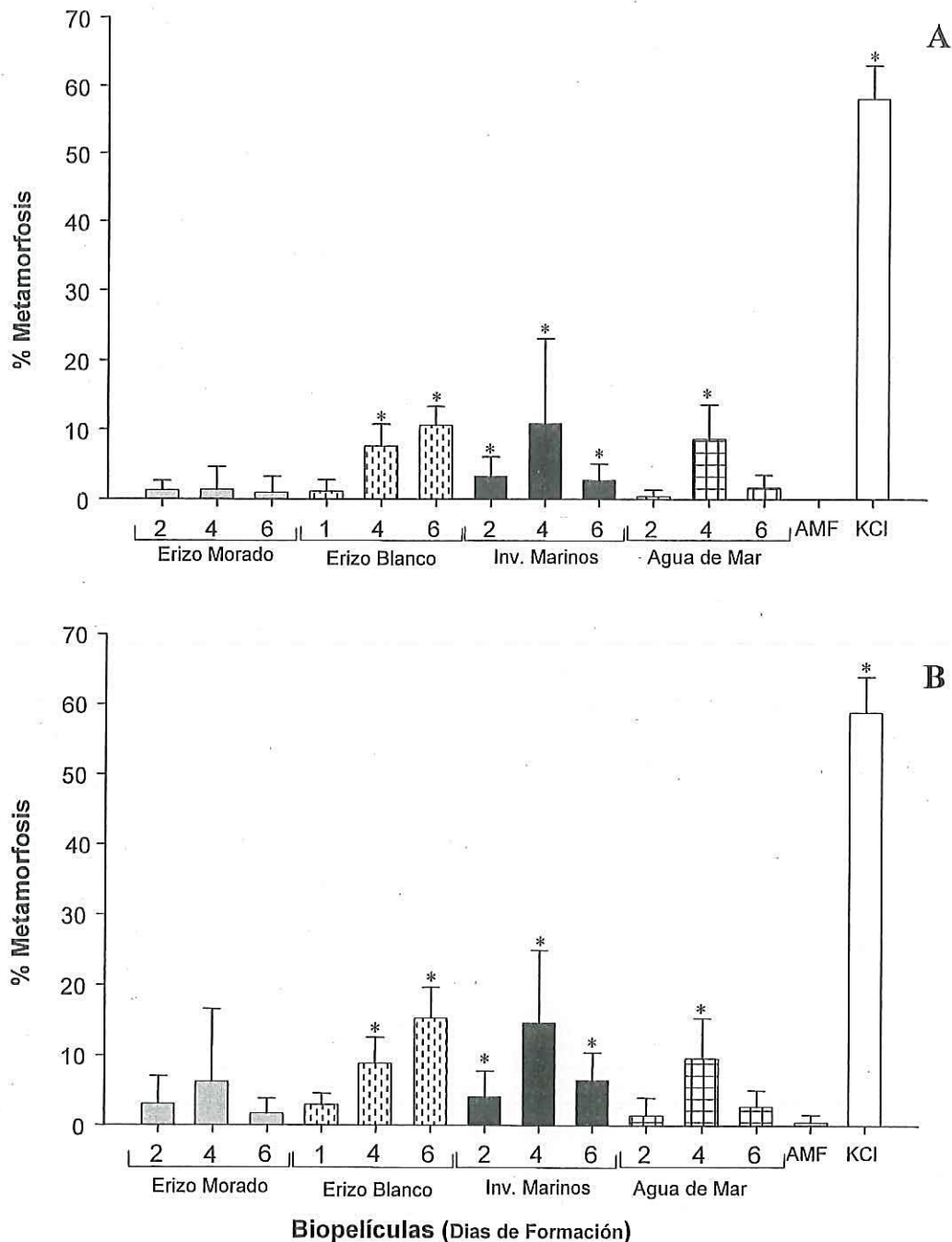


Fig. 6. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 12h (A) y 24h (B) de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco, erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar ($n=6$). Las biopelículas se generaron por periodos de 1, 2, 4 y 6 días en todos los tratamientos. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $0.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCI = Inducción con KCI 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento.

5.2.2 Biopelículas de 5, 9, 11, 13 y 15 días de formación

Después de 12 horas de exposición de las larvas a las diferentes biopelículas, encontramos que las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos favorecieron la inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco (Fig. 7). Los porcentajes de inducción a metamorfosis más altos fueron muy similares en las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos (73.2%). Por otro lado, porcentajes de inducción a metamorfosis menores fueron encontrados en todas las biopelículas de erizo morado (36.2%), invertebrados marinos (23%) y agua de mar (24.7%)(Fig. 7). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $P < 0.05$), siendo las biopelículas de erizo blanco diferentes al resto de los tratamientos (erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar) y al control negativo (LSD, $P < 0.05$), pero no hubo diferencias con el control positivo (LSD, $P > 0.05$). La mayoría de los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo (LSD, $P < 0.05$)(Fig. 7).

Porcentajes de metamorfosis observados a las 24 horas en presencia de biopelículas de erizo blanco permanecieron siendo los más altos (84.3%) y similares entre si (Fig. 8). Valores menores y similares fueron encontrados en presencia de las biopelículas de erizo morado (46.25%), invertebrados marinos (44.6%) y agua de mar (38%) a excepción de la biopelícula de agua de mar de 13 días de formación, en donde se observó un porcentaje de metamorfosis de 63.3% (Fig. 8).

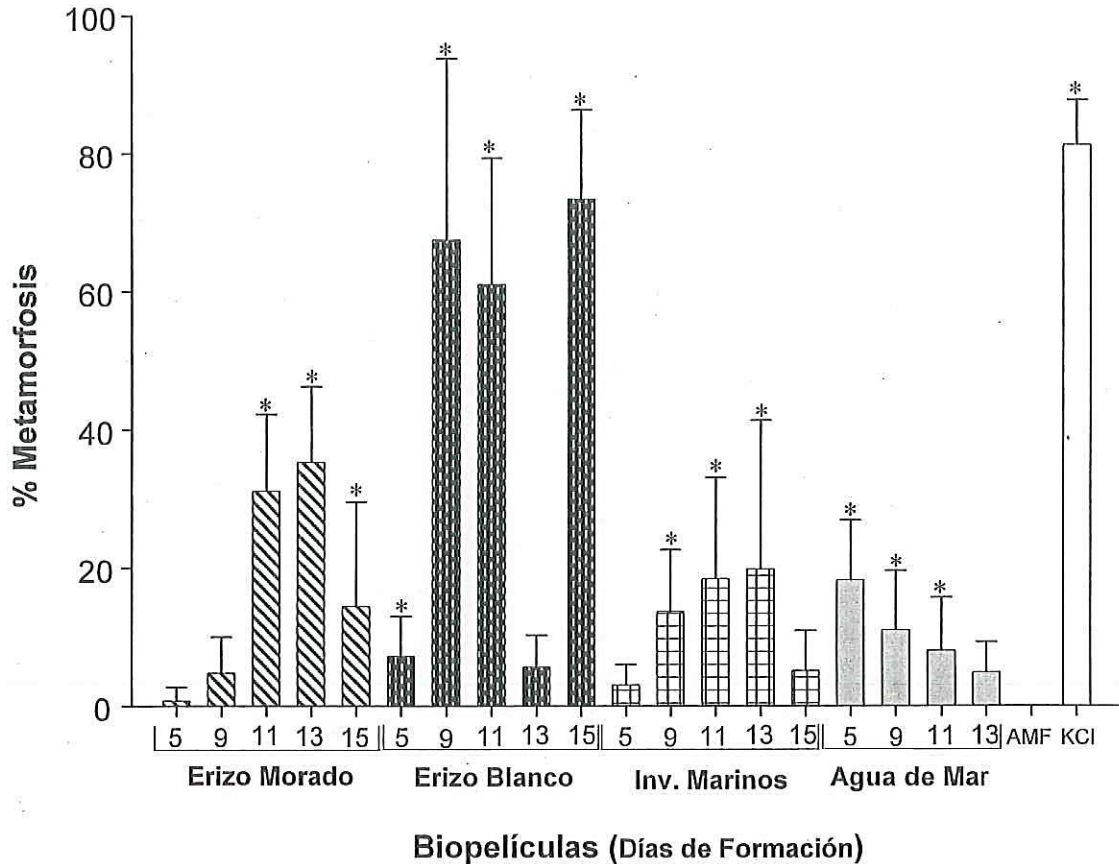


Fig. 7. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (*Lytechinus pictus*) después de 12h de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo morado, erizo blanco, invertebrados marinos y agua de mar ($n=6$). Las biopelículas se generaron por periodos de 5, 9, 11, 13 y 15 días en todos los tratamientos. Las líneas delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $P < 0.05$), en donde las biopelículas de erizo blanco presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (erizo morado, invertebrados marinos y agua de mar) y el control negativo (LSD, $P < 0.05$), pero no presentaron diferencias con el control positivo (LSD, $P > 0.05$). También, la biopelícula obtenida del tratamiento con agua de mar de 13 días presentó

diferencias significativas con el resto de los tratamientos y ambos controles (LSD, $P < 0.05$). Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo (LSD, $P < 0.05$)(Fig. 8).

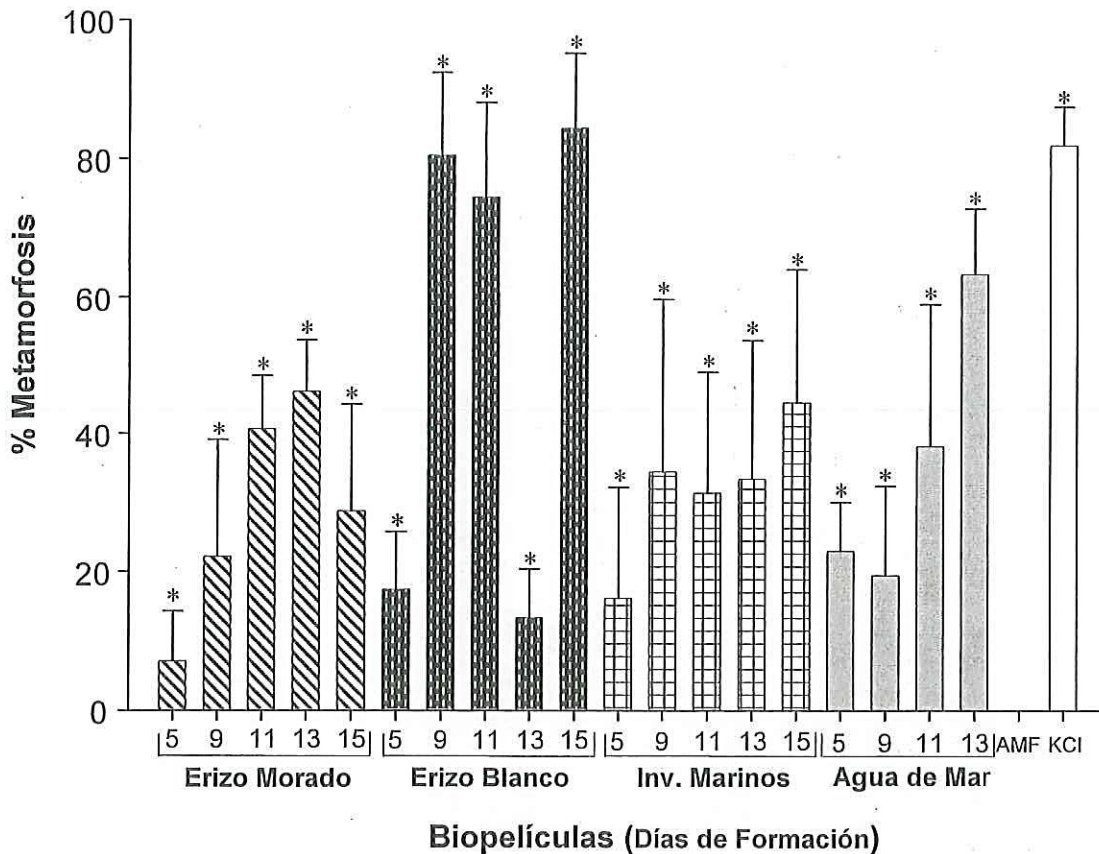


Fig. 8. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (*Lytechinus pictus*) después de 24h de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo morado, erizo blanco, invertebrados marinos y agua de mar ($n=6$). Las biopelículas se generaron por periodos de 5, 9, 11, 13 y 15 días en todos los tratamientos. Las líneas delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento.

Se realizó una última evaluación de todos los tratamientos a las 48 horas, en donde se encontró que las biopelículas generadas en presencia de erizos

blancos adultos permanecían siendo las que mejor indujeron a la metamorfosis a las larvas de erizo blanco, alcanzando porcentajes de inducción hasta del 88.9%. También se observó otro valor de inducción a la metamorfosis alto, el cual correspondió a la biopelícula de agua de mar de 13 días, promoviendo una inducción a la metamorfosis de 70.5%, la cual resultó un poco mayor a lo observado a las 24 horas durante el mismo experimento. El resto de las biopelículas presentaron valores mas bajos y muy similares entre si. Las biopelículas de erizo morado alcanzaron un porcentaje de 52%, las biopelículas de invertebrados marinos un 52.3% y las biopelículas de agua de mar un 45.1% de inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco (Fig. 9. Diferencias significativas fueron encontradas entre todos los tratamientos (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$).

De manera similar a lo encontrado en la evaluación a las 12 y 24 horas, los porcentajes de metamorfosis obtenidos con las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (SNK, $P < 0.05$), pero no presentaron diferencias con los porcentajes obtenidos con la biopelícula de 13 días de formación generada en presencia de agua de mar ni con el control positivo (SNK, $P > 0.05$). De igual manera, los porcentajes obtenidos en el tratamiento con la biopelícula de 13 días generada en agua de mar presentaron diferencias significativas con el resto de las biopelículas generadas en presencia de erizos e invertebrados (SNK, $P < 0.05$), sin embargo, no presentó diferencias con respecto al control positivo (SNK, $P > 0.05$). De nuevo todos los tratamientos presentaron diferencias

significativas con respecto al tratamiento donde las larvas permanecieron en presencia de agua de mar filtrada y esterilizada (control negativo) (SNK, $P < 0.05$)(Fig. 9).

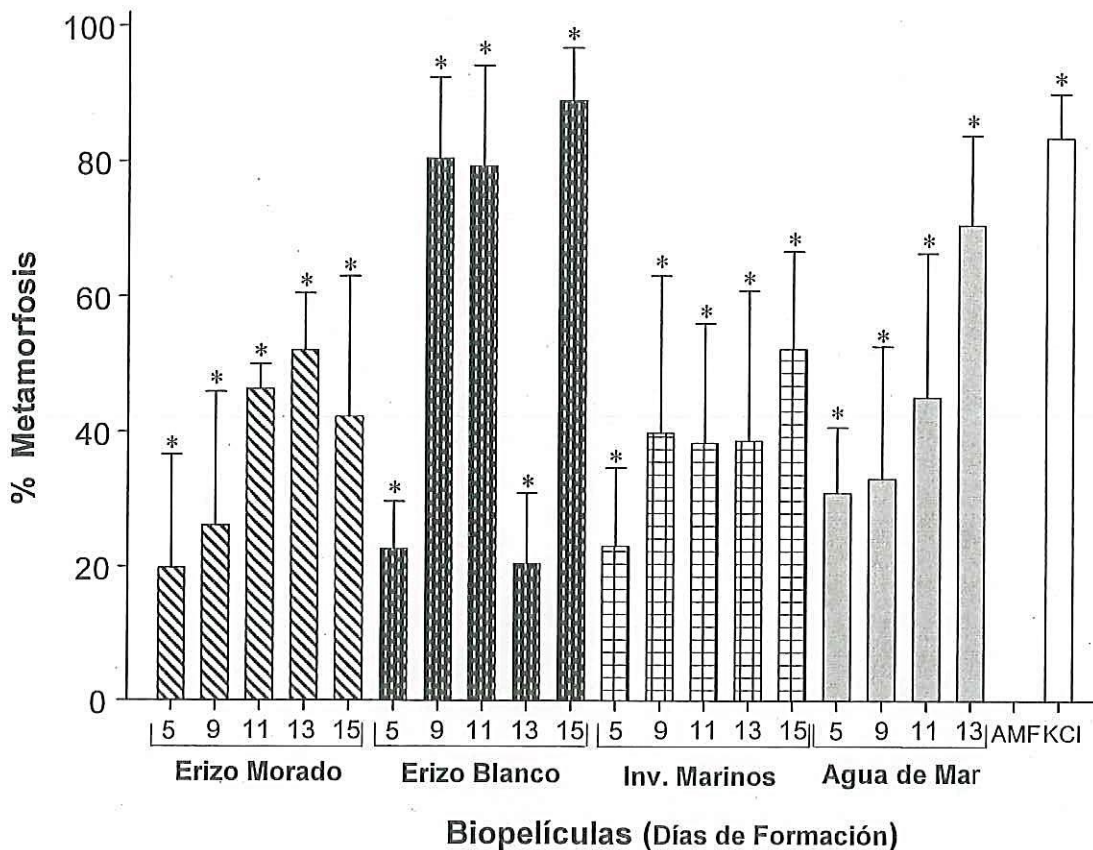


Fig. 9. Inducción a la metamorfosis del erizo blanco (*Lytechinus pictus*) después de 48h de exposición a biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de Erizo Morado, Erizo Blanco, invertebrados marinos (Inv. Marinos) y Agua de Mar ($n=6$). Las biopelículas se generaron por periodos de 5, 9, 11, 13 y 15 días en todos los tratamientos. Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento.

5.3 Obtención de cepas bacterianas a partir de las biopelículas inductoras a la metamorfosis en larvas de erizo blanco

Se aislaron las cepas bacterianas a partir de las biopelículas de 15 días de formación en presencia de erizo blanco e invertebrados marinos, debido a que en la biopelícula de estos días de formación se observó el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis. De la misma manera, para las biopelículas de erizo morado y agua de mar, las cepas bacterianas fueron aisladas de las biopelículas de 13 días de formación. En la siguiente tabla se muestra la cantidad de cepas bacterianas aisladas de cada una de las biopelículas.

Tabla II. Número de cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de erizo blanco (*Lytechinus pictus*), erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*), invertebrados marinos y agua de mar.

Biopelícula	Cepas Bacterianas
Erizo Blanco	9
Erizo Morado	8
Invertebrados Marinos	7
Agua de Mar	10

Se encontraron bacterias muy diferentes en cuanto a forma de las colonias, elevación y coloración de las colonias. En la figura 10, observamos las colonias aisladas del tratamiento de invertebrados marinos (A), en donde se puede apreciar las diferentes formas de las colonias y la presencia de una cepa

oscuro. La figura 10(B) muestra las cepas aisladas del tratamiento de erizo blanco en donde la mayoría de las cepas presentaron una coloración semejante. La figura 10 (C y D) nos muestran las cepas aisladas de las biopelículas obtenidas de acuarios con adultos de erizo morado y agua de mar respectivamente. Las cepas de erizo morado presentaron una variación de color, principalmente colonias amarillas, mientras que las de agua de mar presentaron colonias amarillas y naranjas.

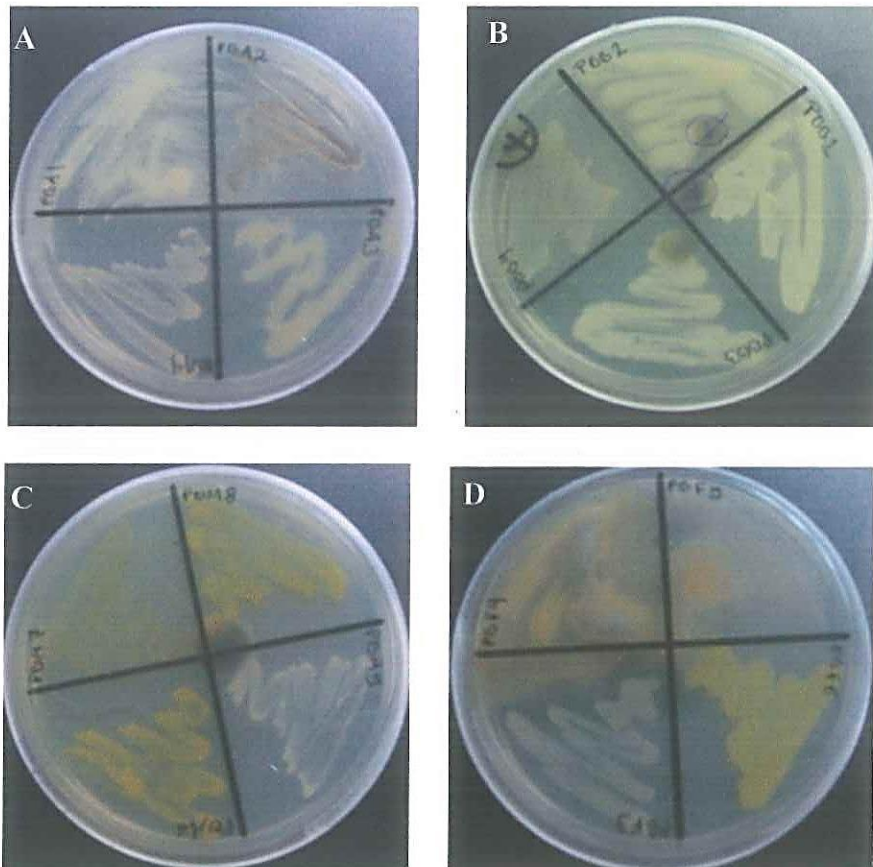


Figura 10. Cepas bacterianas aisladas de las diferentes biopelículas generadas en presencia de organismos adultos de (A) invertebrados marinos, (B) erizo blanco (*Lytechinus pictus*), (C) erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y (D) agua de mar.

5.4 Generación de películas bacterianas monoespecíficas

Los valores de absorbancia y concentración bacteriana (células mL⁻¹) utilizados para la generación de las películas bacterianas monoespecíficas (concentración inicial de 10⁷ células mL⁻¹) se resumen en las tablas XI, XII y XIII (ver apéndice).

5.5 Inducción a la metamorfosis mediante películas bacterianas monoespecíficas

5.5.1 Cepas aisladas de la biopelícula de erizo blanco de 15 días de formación

Se realizaron ensayos de respuesta de las larvas de erizo blanco a la inducción a metamorfosis en presencia de 8 cepas bacterianas. La cepa bacteriana con el código PBB9 no pudo ser utilizada debido a que se presentaron problemas en el manejo de la misma.

El porcentaje de inducción a la metamorfosis a las 12 horas fue prácticamente nulo (Fig. 10). Los valores de metamorfosis observados en presencia de la cepa PBB4 y PBB8 fueron de 1.6%. No se encontraron diferencias significativas de estos tratamientos con respecto al control negativo (Kruskal-Wallis > 0.05)(Fig. 11A), pero si se encontraron diferencias significativas con respecto al control positivo con KCl (SNK, $P < 0.05$).

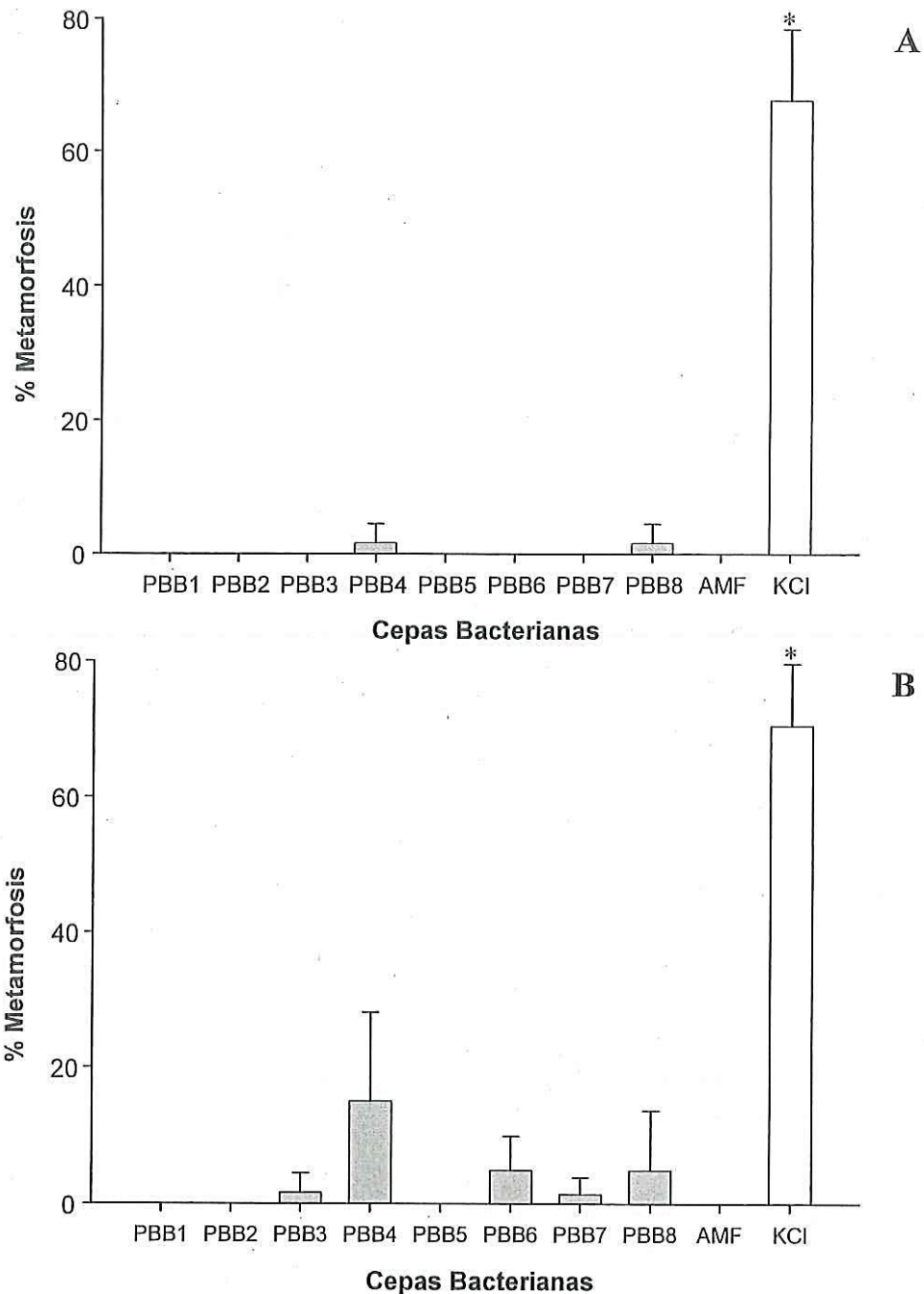


Fig. 11. Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 12 (A) y 24h (B) de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de biopelículas de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento.

Se observó un incremento en el porcentaje de inducción a metamorfosis en las larvas de erizo blanco en presencia de la cepa PBB4 (15%) a las 24 horas de exposición (Fig. 11B). El resto de las cepas bacterianas presentaron porcentajes de inducción más bajos (5%). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo (Kruskal-Wallis, $P > 0.05$), pero si se encontraron diferencias significativas con respecto al control positivo con KCl (SNK, $P < 0.05$)(Fig. 11B).

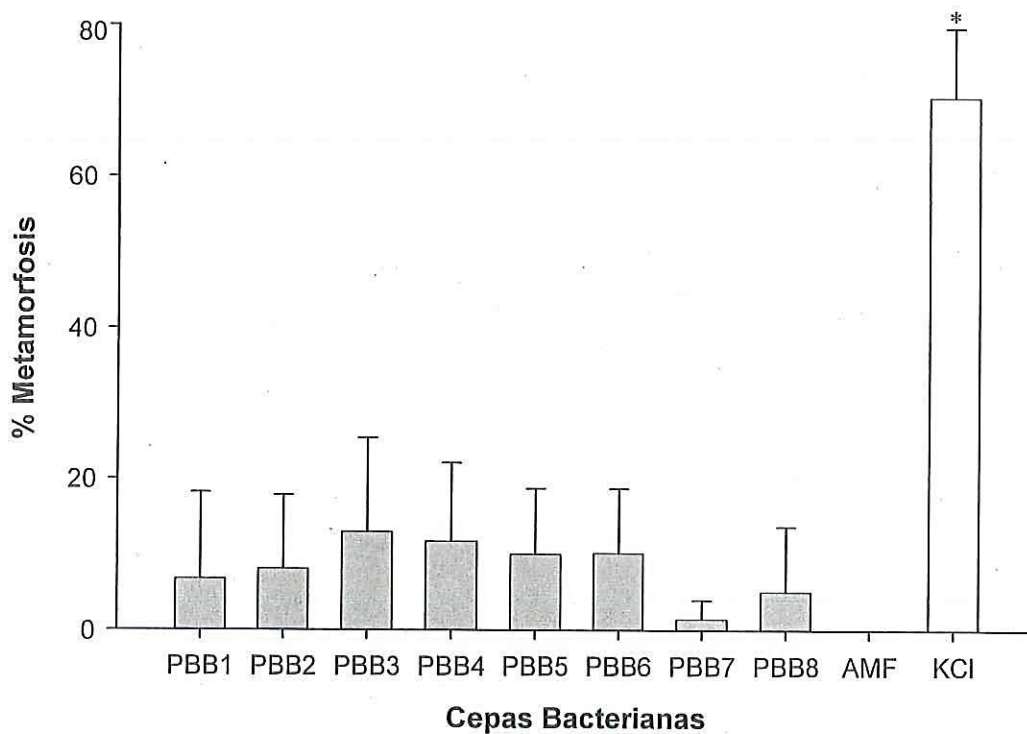


Fig. 12. Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 48h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de la biopelícula de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento. El significado del código individual de las cepas bacterianas esta referido en el texto en la sección de metodología (Generación de películas bacterianas mono-específicas).

A las 48 horas de evaluación, los porcentajes de inducción a la metamorfosis obtenidos fueron muy similares entre las diferentes cepas bacterianas utilizadas en forma individual (12 – 16%)(Fig. 12). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo con AMF (ANOVA 1-vía, $P > 0.05$), pero si se encontraron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control positivo con KCl (LSD, $P < 0.05$).

Porcentajes de inducción a la metamorfosis entre el 15 y 25% fueron observados en los tratamientos con las cepas bacterianas PBB2 – PBB6 a las 72 horas de evaluación (Fig. 13). En los tratamientos con las cepas bacterianas restantes se presentaron valores similares y estuvieron por debajo del 8%. Se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos (ANOVA 1-vía, $P < 0.05$). Los tratamientos con las cepas bacterianas PBB2 – PBB6 presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo con AMF (LSD, $P < 0.05$), el resto de las cepas bacterianas no presentaron diferencias con el AMF (LSD, $P > 0.05$). Todas las cepas bacterianas presentaron diferencias significativas con el control positivo con KCl y el porcentaje de metamorfosis obtenido con estas, siempre fue menor (LSD, $P < 0.05$).

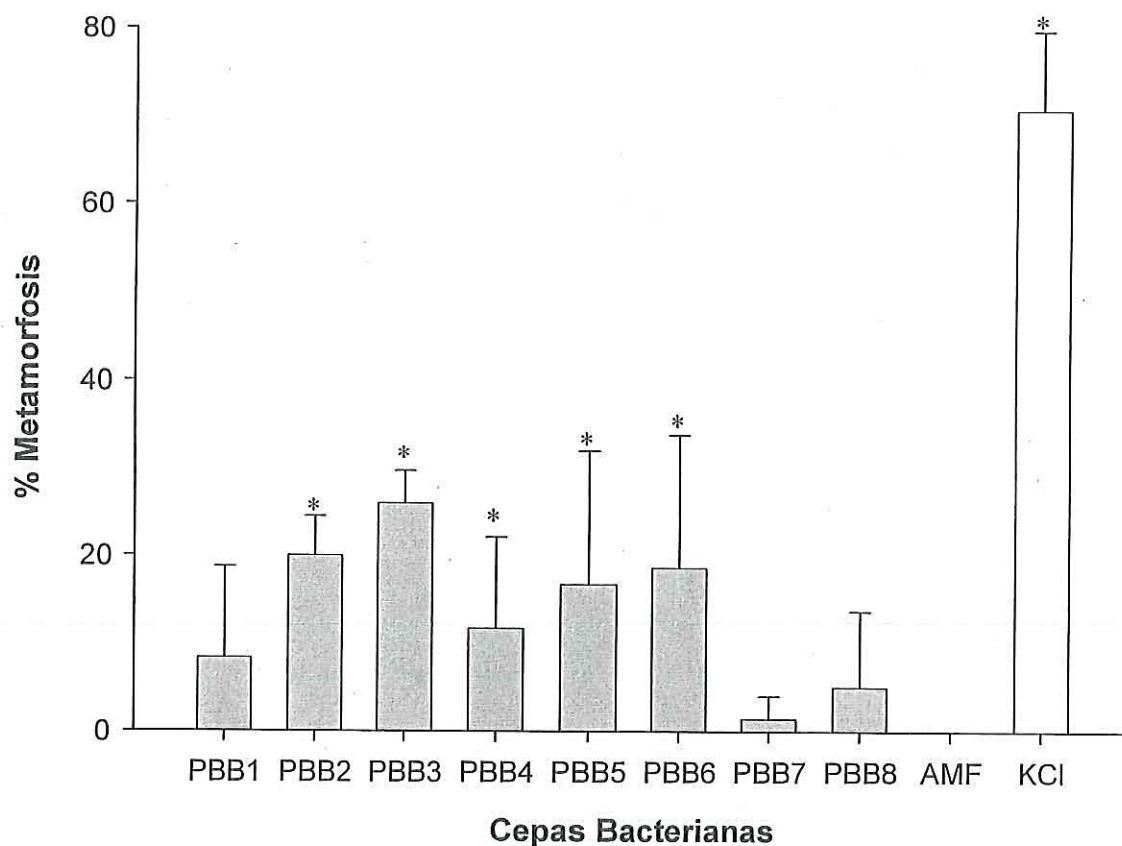


Fig. 13. Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 72h de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas a partir de las biopelículas de 15 días de formación en presencia de erizos blancos adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento. El significado del código individual de las cepas bacterianas esta referido en el texto en la sección de metodología (Generación de películas bacterianas mono-específicas).

5.5.2 Inducción a la metamorfosis mediante cepas bacterianas aisladas de biopelículas en presencia de erizos blancos adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

La respuesta de las larvas de erizo blanco a las cepas bacterianas a las 24 horas de exposición fue dividida en 2 grupos. En el primer grupo encontramos a las cepas bacterianas en donde se observó el mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis. Encontramos 6 cepas bacterianas (BA5, BA6, BA11, BB3, BB6 y BB9), en donde se obtuvieron porcentajes similares (15 - 24%) de inducción a la metamorfosis (Fig. 14A). El segundo grupo lo comprendieron las cepas bacterianas BA3, BA9, BA10, BA12 y BB7, en donde se observaron porcentajes de inducción a la metamorfosis más bajos (1 - 5%). Existieron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-via, $P < 0.05$), en donde las cepas bacterianas del grupo 1, siempre resultaron con porcentajes de inducción a la metamorfosis mayores con respecto a las cepas bacterianas del grupo 2 y con el control negativo con AMF (LSD, $P < 0.05$). Por otro lado, las cepas bacterianas del grupo 2 no presentaron diferencias con el control negativo (LSD, $P > 0.05$). Todas las cepas presentaron diferencias significativas con respecto al control positivo con KCl (LSD, $P < 0.05$) (Fig. 14A).

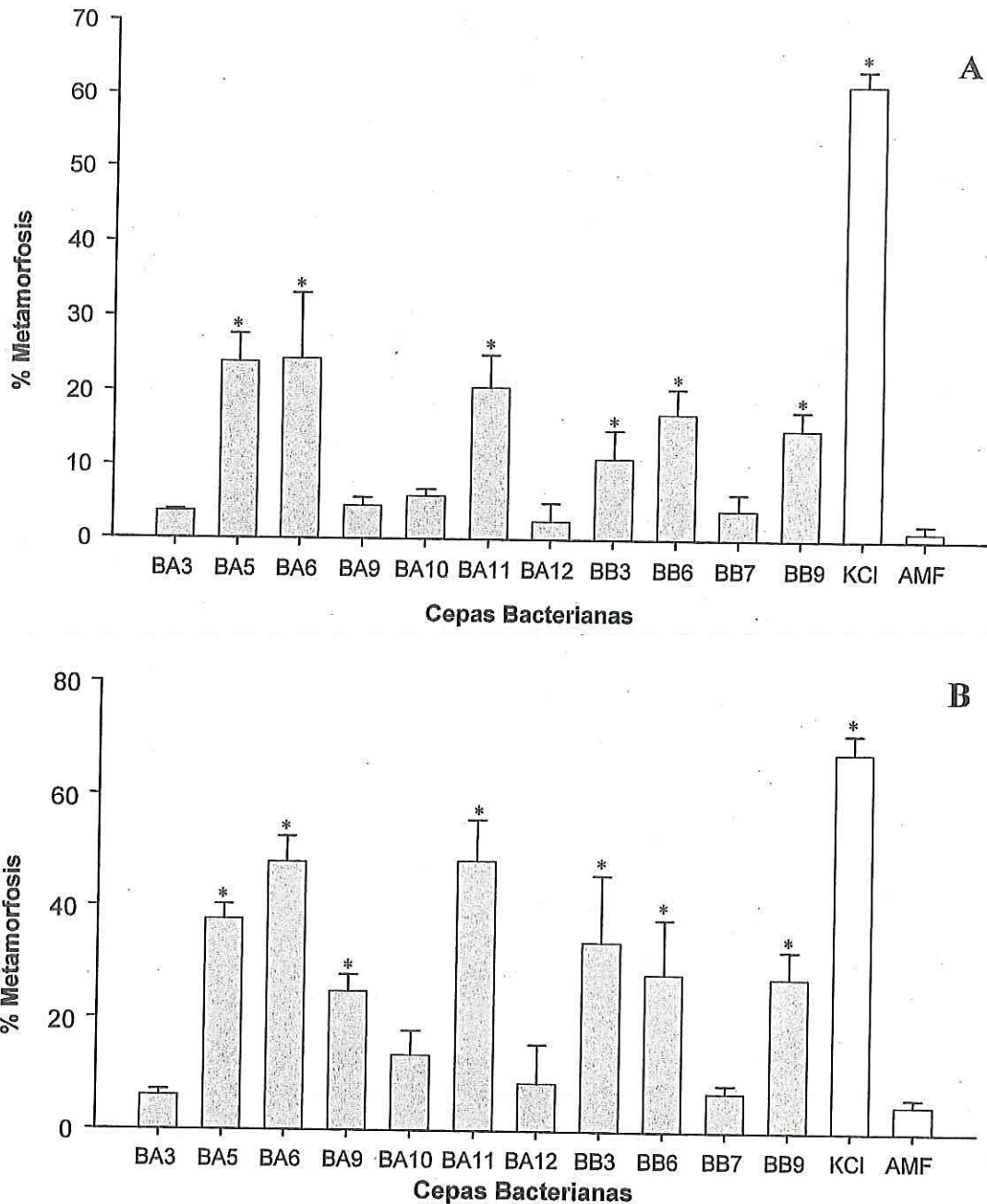


Fig. 14. Porcentaje de la inducción a metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 24(A) y 48(B) horas de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento. El significado del código individual de las cepas bacterianas esta referido en el texto en la sección de metodología (Generación de películas bacterianas mono-específicas).

A las 48 horas de evaluación de exposición de las larvas a las películas bacterianas fue posible dividir las cepas bacterianas en tres grupos de acuerdo a los valores de inducción a la metamorfosis observados en las larvas de erizo blanco. El grupo 1 lo comprendieron las cepas BA6 y BA11, las cuales, presentaron los valores más altos de inducción a la metamorfosis en las larvas de erizo blanco (48%)(Fig. 14B). En el grupo 2 encontramos a las cepas BA5, BA9, BB3, BB6 y BB9, éstas presentaron porcentajes similares de inducción a la metamorfosis (26 – 34%), pero un poco menores en relación a las del grupo 1. El resto de las cepas bacterianas (BA3, BA10, BA12, BB7) comprenden el grupo 3, en donde se observaron valores de inducción a metamorfosis por debajo del 13% (Fig. 14B).

Estadísticamente, las cepas del grupo 1 no presentaron diferencias significativas con respecto a las del grupo 2 y el control positivo con KCl (LSD, $P > 0.05$), pero ambos grupos si presentaron diferencias significativas con el grupo 3 y con el control negativo con AMF (LSD, $P < 0.05$). Las cepas del grupo 3 no presentaron diferencias significativas con respecto al control con AMF (LSD, $P > 0.05$), pero si presentaron diferencias con el control positivo con KCl (LSD, $P < 0.05$)(Fig. 14B).

5.5.3 Inducción a la metamorfosis mediante cepas bacterianas aisladas de biopelículas en presencia de erizos morados adultos obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

Los porcentajes de la inducción a metamorfosis en larvas de erizo blanco a las 12 horas de exposición con cepas bacterianas aisladas en presencia de erizos morados adultos fueron muy bajos. La cepa MA5 alcanzó un valor de 11.1%, el resto de las cepas bacterianas alcanzaron valores menores al 1.5% o en su defecto valores nulos (0%)(Fig. 15A). Se encontraron diferencias significativas entre la cepa MA5 y el resto de las cepas bacterianas (SNK, $P < 0.05$), así como con los controles con AMF y KCl (SNK, $P < 0.05$). A las 24 horas se obtuvieron porcentajes similares en las cepas MA5, MA11 y MB3 (7 -11%). Valores de inducción por debajo del 3% se observaron en las cepas restantes (Fig. 15B). Hubo diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $P < 0.05$), en donde los tratamientos con las cepas bacterianas que presentaron los porcentajes mayores de inducción a la metamorfosis (MA5, MA11 y MB3) fueron significativamente diferentes con el resto de la cepas bacterianas (MA6, MA14 y MB2) y con ambos controles (LSD, $P < 0.05$). Los tratamientos con las cepas bacterianas que presentaron valores por debajo del 3% de inducción a metamorfosis no tuvieron diferencias significativas con respecto al control negativo con AMF (LSD, $P > 0.05$), pero si se encontraron diferencias con el control positivo con KCl (LSD, $P < 0.05$)(Fig. 14B).

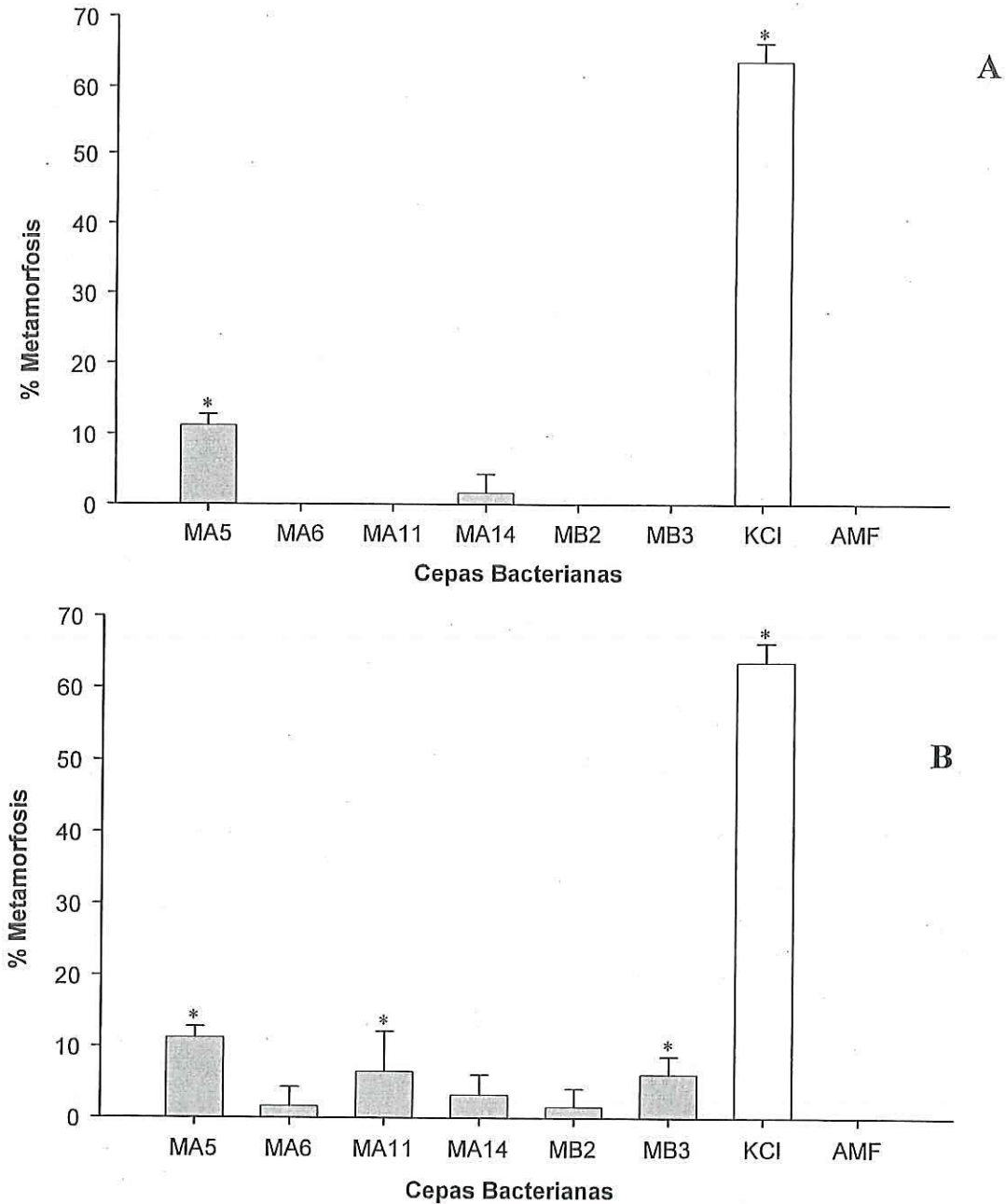


Fig. 15. Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 12(A) y 24(B) horas de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $0.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCI = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento. El significado del código individual de las cepas bacterianas esta referido en el texto en la sección de metodología (Generación de películas bacterianas mono-específicas).

Porcentajes similares de inducción a la metamorfosis entre los tratamientos fueron observados a las 48 horas de exposición de las larvas de erizo blanco a las cepas bacterianas. Las cepas MA5 y MA6 presentaron valores similares de inducción a la metamorfosis, equivalentes al 17%. Por otro lado, valores un poco menores fueron observados en las cepas MA14 y MB3 (12%). Por último las cepas MA11 y MB2 mostraron valores de inducción a la metamorfosis menores al 6% (Fig. 16A). Aun así, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (SNK, $P > 0.05$), tampoco en relación con el control negativo con AMF (SNK, $P > 0.05$), pero si se encontraron diferencias significativas de los tratamientos con el control positivo con KCl, en donde en este último se obtuvieron siempre porcentajes de metamorfosis mayores a los obtenidos en los tratamientos (SNK, $P < 0.05$)(Fig. 16A). La respuesta de la larva a metamorfosear en presencia de las cepas bacterianas a las 72 horas de evaluación, fue muy similar a lo obtenido a las 48 horas. La cepa MA6 presentó el valor mas elevado de inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco (26%); porcentajes menores fueron observados en las cepas MA5, MA14 y MB3 (17%) y valores por debajo del 8% fueron observados en las cepas MA11 y MB2 (Fig. 16B). De igual manera que lo encontrado en la evaluación a las 48 horas, a las 72 horas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (SNK, $P > 0.05$), tampoco se encontraron diferencias significativas de los tratamientos con el control negativo con AMF (SNK, $P > 0.05$) y si existieron diferencias significativas de los tratamientos con el control positivo con KCl, en donde este último siempre fue mayor (SNK, $P < 0.05$)(Fig. 16B).

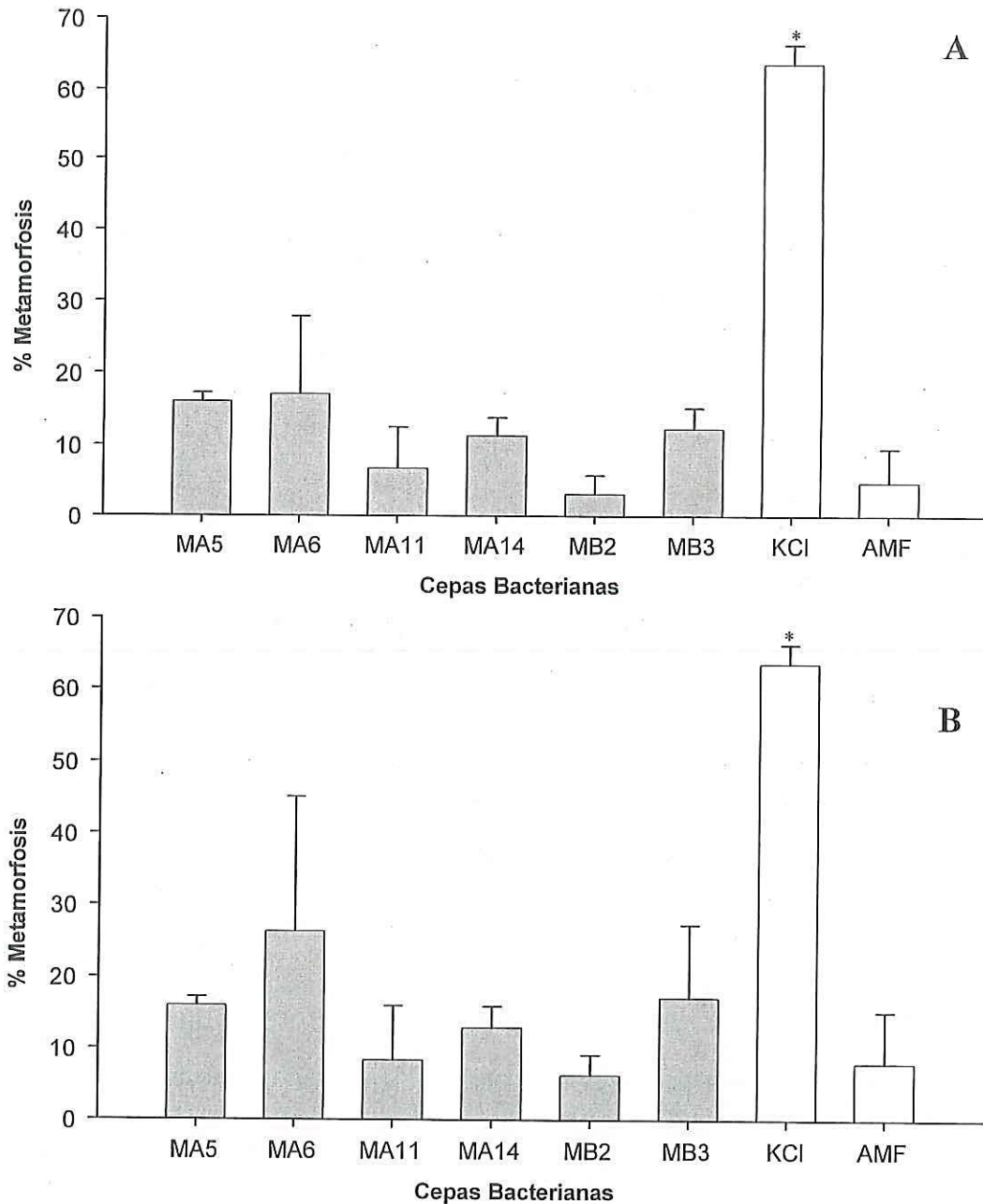


Fig. 16. Porcentaje de la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* a las 48(A) y 72(B) horas de exposición a películas bacterianas mono-específicas obtenidas del cepario del laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO) a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos ($n=3$). Las barras delgadas representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las columnas (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). AMF = Agua de mar filtrada a $.22\mu\text{m}$ y esterilizada. KCl = Inducción con KCl 100mM por 15 min y luego en AMF por el resto del experimento. El significado del código individual de las cepas bacterianas esta referido en el texto en la sección de metodología (Generación de películas bacterianas mono-específicas).

5.6 Identificación morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas

5.6.1 Cepas bacterianas aisladas de las biopelículas en presencia de erizo blanco de 15 días de formación

En la tabla III, se resumen las diferentes características encontradas para las diferentes cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días de formación generadas en presencia de erizos blancos adultos y en la figura 17 se muestran algunos ejemplos de las cepas aisladas.

Tabla III. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días en presencia de erizos blancos adultos.

Cepa Bacteriana	Características (forma, elevación, margen, color)
PBB1	Circular, convexa, entera, blanca
PBB2	Irregular, levantada, lobada, crema-amarillo
PBB3	Circular, umbonada, entera, translúcida
PBB4	Irregular, plana, lobada, opaca, amarilla-crema
PBB5	Circular, convexa, entera, opaca, amarilla-crema
PBB6	Circular, umbonada, entera, opaca, amarilla-crema
PBB7	Circular, convexa, entera, crema-blanca
PBB8	Irregular, plana, lobada, translúcida brillante
PBB9	Circular, pulvinada, entera, naranja brillante

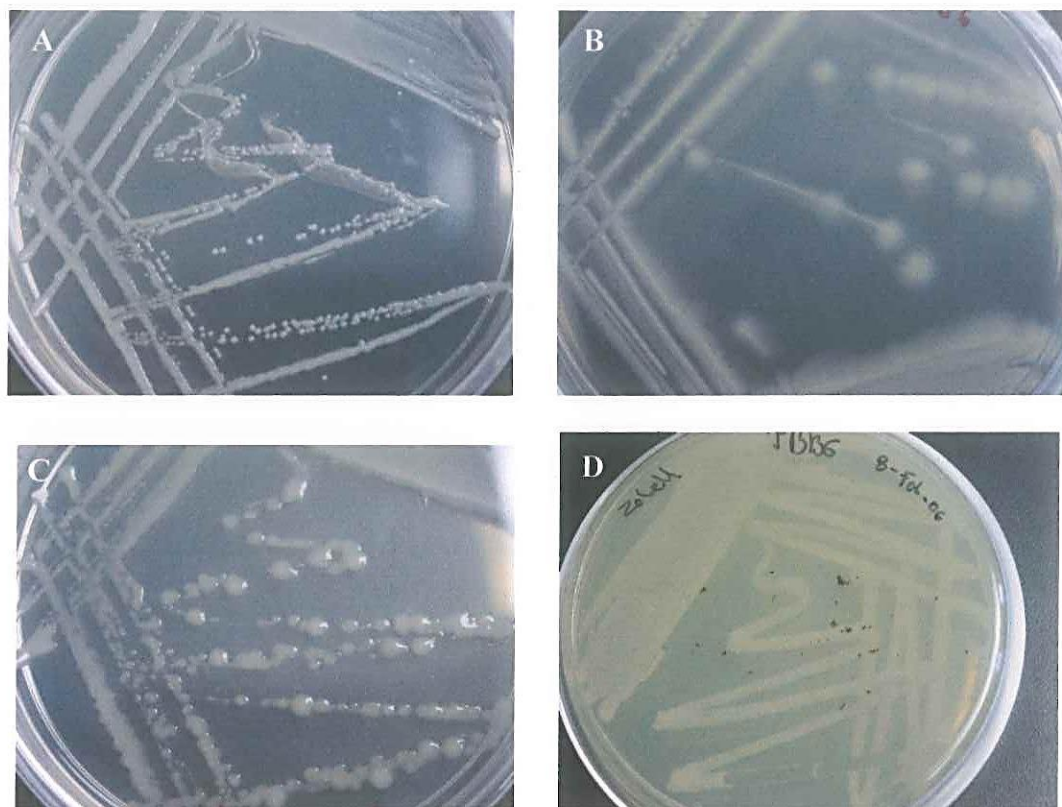


Figura 17. Cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días de formación generadas en presencia de erizos blancos adultos (*Lytechinus pictus*). (A) PBB1, (B) PBB2, (C) PBB3 y (D) PBB6. El código de las cepas se indica en el texto en la sección de metodología.

De acuerdo con la tinción de Gram, todas las cepas aisladas pertenecieron al grupo de las Gram-negativas. Se encontraron formas de cocos y bacilos. En cuanto a los bacilos, encontramos formas de bacilos cortos y largos. En la figura 18, se muestran algunos ejemplos.

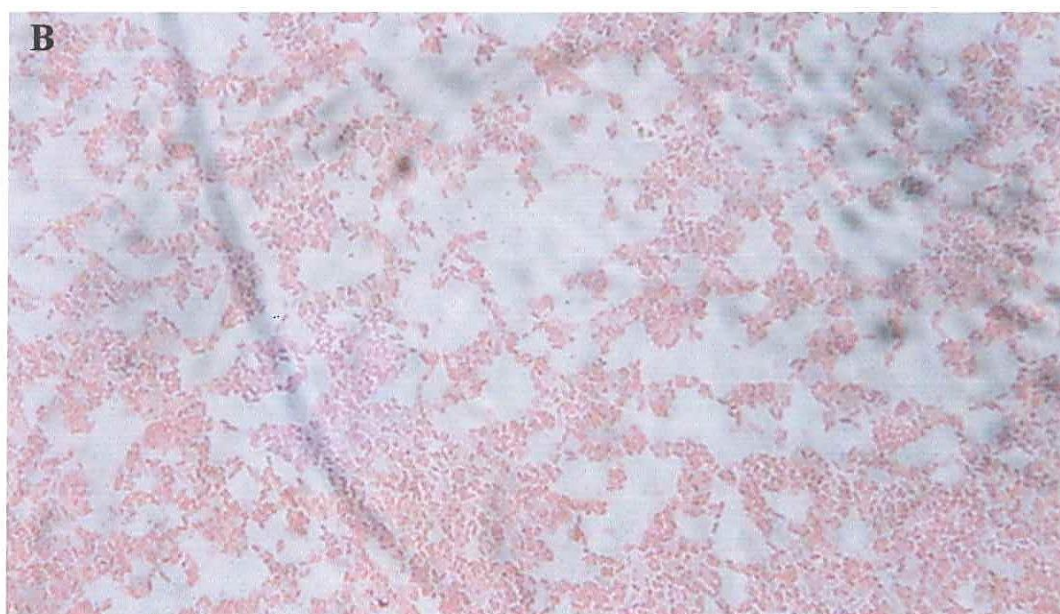


Figura 18. Tinciones de Gram. de las cepas aisladas de la biopelículas de 15 días de formación generada en presencia de erizos blancos adultos. (A) cepa PBB7, cocos Gram-negativos, (B) cepa PBB8, bacilos cortos Gram-negativos. El código de las cepas se indica en el texto en la sección de metodología.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, se realizaron varias pruebas mediante la elaboración de medios de cultivo (ver metodología), y pruebas de identificación rápida API E y NE (Fig. 19). En la tabla IV, se muestran los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas. No se pudo realizar las pruebas a la cepa PBB4 ya que al momento de crecer la bacteria en medio líquido y sólido no presentó crecimiento y a pesar de que se realizaron varios sembrados para intentar recuperar la cepa en ninguno hubo crecimiento.

En cuanto a la cepa PBB8 se realizaron las primeras pruebas bioquímicas mediante la elaboración de medios de cultivo (Ver tabla I), pero se presentó un problema semejante a lo ocurrido con la cepa PBB4 al momento de realizar las pruebas bioquímicas con el Kit API 20 E y NE. Por lo tanto para la cepa PBB8, no se pudieron realizar las pruebas con los kit de identificación rápida.



Figura 19. Resultados de las pruebas de identificación rápida API 20E. Cada uno de los tubos representa una prueba bioquímica diferente. Mediante la variación de color en el tubo es posible determinar si la cepa bacteriana es positiva o negativa a la reacción.

Tabla IV. Cepas bacterianas aisladas de la biopelícula de 15 días generada en presencia de erizos blancos adultos.

<i>Característica</i>	<i>PBB1</i>	<i>PBB2</i>	<i>PBB3</i>	<i>PBB5</i>	<i>PBB6</i>	<i>PBB7</i>	<i>PBB8</i>	<i>PBB9</i>
Oxidación	-	+	-	-	+	-	+	-
Fermentación	+	+	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	-	-	+	-	+	-
Movilidad	-	+	+	+	+	-	+	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	-	+	-	-	+	-	-	-
0/129 – 10µg (crecimiento)	+	+	+	+	+	+	+	+
0/129 – 150 µg (crecimiento)	+	+	+	+	+	+	-	-
TCBS (crecimiento)	+	+	-	+	-	+	-	-
Salinidad 0%	+	+	+	+	+	+	+	+
Salinidad 6%	+	+	+	+	+	+	+	-
Salinidad 8%	+	-	+	+	+	+	-	-
API NE (no entérico)								
Reducción nitratos (NO ₃)	+	+	+	-	-	+		+
Glucosa, fermentación	-	+	-	-	-	-		-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-	-		-
Esculina hidrólisis	+	-	+	+	+	+		+
Gelatina hidrólisis	+	+	+	+	-	+		+
PNPG	+	+	+	-		+		+
D-glucosa (asimilación)	+	+	+	+	+	+		-
L-arabinosa (asimilación)	+	+	+	+	+	+		+
D-manosa (asimilación)	+	+	+	+	+	+		+
D-manitol (asimilación)	+	+	+	+	+	+		+
N-acetil-glucosamina (asimilación)	-	+	-	+	+	+		+
D-maltosa (asimilación)	+	+	+	+	+	+		+
Gluconato potásico (asimilación)	+	+	+	+	+	+		+

Tabla IV. (continuación)

<i>Característica</i>	<i>PBB1</i>	<i>PBB2</i>	<i>PBB3</i>	<i>PBB5</i>	<i>PBB6</i>	<i>PBB7</i>	<i>PBB8</i>	<i>PBB9</i>
Acido cáprico (asimilación)	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido adípico (asimilación)	-	+	-	+	-	-	-	+
Acido málico (asimilación)	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato trisódico (asimilación)	+	+	+	+	-	+	-	-
Acido fenilacético (asimilación)	+	-	-	-	-	+	-	-
API E (entérico)								
ONPG	+	+	+	-	-	+	-	-
Lisina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiosulfato sódico	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea hidrólisis	-	+	-	-	-	-	-	-
Triptófano desaminasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	+	-	+	-	-
D-glucosa (Fer/Ox)	-	+	-	-	-	-	-	-
D- manitol (Fer/Ox)	-	+	-	-	-	-	-	-
Inositol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
D- sorbitol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
L- ramnosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
D- sacarosa (Fer/Ox)	-	+	-	-	-	-	-	-
D- melibiosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
L- arabinosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato potásico (NO ₂)	+	+	+	-	-	+	-	+
Nitrato potásico (N ₂)	-	-	-	+	+	-	-	-
MacConkey (crecimiento)	+	+	-	+	-	+	-	-

(+) reacción positiva, (-) reacción negativa

Mediante las pruebas bioquímicas realizadas, se pudo llegar a determinar a que grupo pertenecen las cepas bacterianas mediante el uso de esquemas de identificación y el manual Bergey's (1994), aun así, no fue posible la identificación al nivel de especie.

Se encontró tres cepas que pertenecieron a la familia de las Enterobacterias (*Enterobacteriaceae*), pero no fue posible determinar el género de dichas cepas bacterianas. Se encontraron también bacterias del género *Aeromonas* pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* y bacterias de los género *Flavobacterium* y *Paracoccus* que pertenecen al subgrupo 4A (Bacilos y cocos aerobios Gram-negativos) de acuerdo al Manual Bergey's (1994). En la tabla V se presenta a que familia o género pertenecieron cada una de las cepas bacterianas aisladas.

Tabla V. Posibles familias o géneros a los que pertenecen las diversas cepas bacterianas aisladas de la biopelícula de 15 días de formación generadas en presencia de erizos blancos adultos (*Lytechinus pictus*).

Cepa Bacteriana	Posible Familia o Género
PBB1	<i>Enterobacteriaceae</i>
PBB2	<i>Aeromonas</i>
PBB3	<i>Paracoccus</i>
PBB5	<i>Enterobacteriaceae</i>
PBB6	<i>Aeromonas</i>
PBB7	<i>Enterobacteriaceae</i>
PBB8	<i>Aeromonas</i>
PBB9	<i>Flavobacterium</i>

5.6.2 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizo blanco obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

En la tabla VI se resumen las características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos blancos adultos (*L. pictus*), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO) y en la figura 20 se muestran algunos ejemplos de las cepas bacterianas.

Tabla VI. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos blancos adultos (*Lytechinus pictus*), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).

Cepa Bacteriana	Características (forma, elevación, margen, color)
BA3	Irregular, plana, entera, beige
BA5	Circular, convexa, entera, beige
BA6	Circular, plana, entera, beige
BA9	Circular, plana, entera, beige
BA10	Circular, plana, entera, beige
BA11	Circular, convexa, entera, blanca brillante
BA12	Irregular, plana, entera, blanca brillante
BB3	Circular, convexa, entera, beige
BB6	Circular, convexa, entera, blanca brillante
BB7	Puntiforme, plana, entera, beige
BB9	Puntiforme, plana, entera, amarilla



Figura 20. Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos blancos adultos (*L. pictus*), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO). (A) cepa BA3, (B) cepa BA9 y (C) Cepa BB7. El código de las cepas se indica en el texto en la sección de metodología.

De acuerdo a la tinción de Gram todas las cepas pertenecieron al grupo de las Gram-negativas, presentaron forma de bacilos cortos y bacilos largos (Fig. 21). En la tabla VII se resumen los resultados de las pruebas bioquímicas.

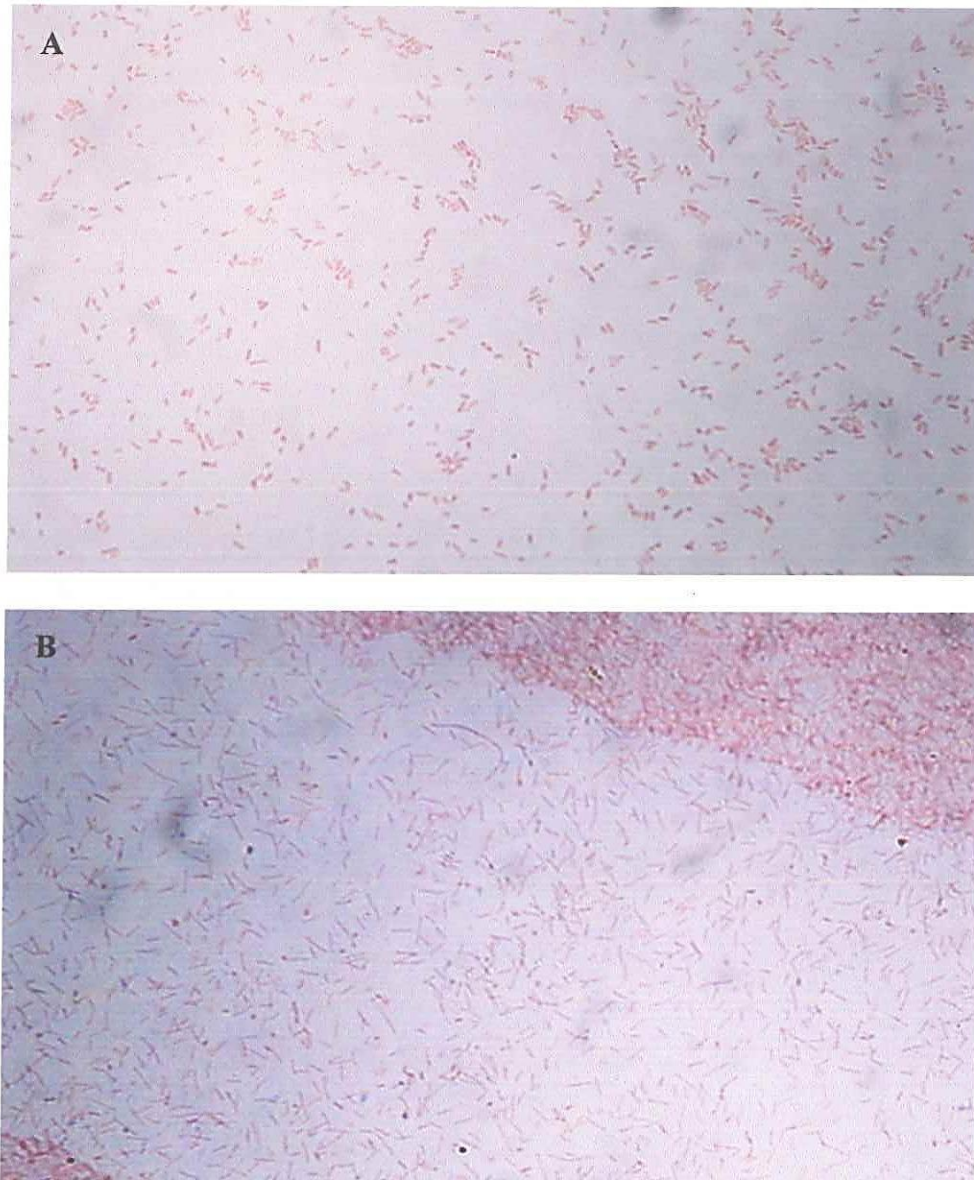


Figura 21. Tinciones de Gram. de las cepas de erizo blanco obtenidas del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (LIO). (A) cepa BA5, bacilos cortos Gram-negativos, (B) cepa BA6, bacilos largos Gram-negativos. El código de las cepas se indica en el texto en la sección de metodología.

Tabla VII. Cepas bacterianas aisladas de erizo blanco (*L. pictus*) obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

<i>Característica</i>	BA3	BA5	BA6	BA9	BA10	BA11	BA12	BB3	BB6	BB7	BB9
Oxidación	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Fermentación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Movilidad	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Rojo de Metilo	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Sensibilidad al 0/129 – 10µg	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Sensibilidad al 0/129 – 150 µg	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
TCBS (crecimiento)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Salinidad 0%	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Salinidad 6%	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Salinidad 8%	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
API NE (no entérico)											
Reducción nitratos (NO ₃)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Glucosa, fermentación	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Arginina dihidrolasa	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Esculina hidrólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina hidrólisis	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
PNPG	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-glucosa (asimilación)	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
L-arabinosa (asimilación)	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
D-manosa (asimilación)	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
D-manitol (asimilación)	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
N-acetil-glucosamina (asimilación)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-maltosa (asimilación)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+

Tabla VII. (Continuación)

<i>Característica</i>	BA3	BA5	BA6	BA9	BA10	BA11	BA12	BB3	BB6	BB7	BB9
Gluconato potásico (asimilación)	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Acido cáprico (asimilación)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Acido adípico (asimilación)	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Acido málico (asimilación)	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Acido fenilacético (asimilación)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
API E (entérico)											
ONPG	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Lisina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato trisódico	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
Tiosulfato sódico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea hidrólisis	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Triptófano desaminasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
D-glucosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D- manitol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Inositol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D- sorbitol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L- ramnosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D- sacarosa (Fer/Ox)	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
D- melibiosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Amigdalina (Fer/Ox)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
L- arabinosa (Fer/Ox)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nitrato potásico (NO ₂)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Nitrato potásico (N ₂)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
MacConkey (crecimiento)	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-

(+) reacción positiva, (-) reacción negativa

De acuerdo con todos los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y la utilización de esquemas de identificación y el manual Bergey's (1994), se pudo determinar que la mayoría de las cepas bacterianas pertenecieron a la familia *Vibrionacea*, dentro de la cual se encontraron los géneros *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Vibrio*. También se encontró una cepa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, pero no fue posible determinar a que género pertenece. Aun con todas las pruebas bioquímicas realizadas no fue posible identificar las cepas al nivel de especie y solamente se llegó al nivel de familia o género. En la tabla VIII se muestran las posibles familias o géneros a los que pueden pertenecer las cepas bacterianas.

Tabla VIII. Posibles familias o géneros a los que pertenecen las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques con presencia de erizos blancos adultos (*Lytechinus pictus*), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (LIO).

Cepa Bacteriana	Posible Familia o Género
BA3	<i>Aeromonas</i> ó <i>Vibrio</i>
BA5	<i>Aeromonas</i>
BA6	<i>Aeromonas</i>
BA9	<i>Aeromonas</i>
BA10	<i>Aeromonas</i>
BA11	<i>Aeromonas</i>
BA12	<i>Aeromonas</i>
BB3	<i>Vibrio</i> ó <i>Photobacterium</i>
BB6	<i>Vibrio</i> ó <i>Photobacterium</i>
BB7	<i>Aeromonas</i> ó <i>Vibrio</i>
BB9	<i>Enterobacteriaceae</i>

5.6.3 Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

En la tabla IX se resumen las características morfológicas de las cepas bacterianas de erizo morado que ya se tenían en el laboratorio. En la figura 22 se muestran algunos ejemplos de las cepas bacterianas.

Tabla IX. Principales características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos morados, obtenidas del cepario del Laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO).

Cepa Bacteriana	Características (forma, elevación, margen, color)
MA5	Irregular, plana, lobada, blanca
MA6	Circular, convexa, entera, beige
MA11	Circular, plana, entera, amarillo brillante
MA14	Puntiforme, plana, entera, beige
MB2	Irregular, plana, lobada, blanca
MB3	Irregular, convexa, ondulada, blanca

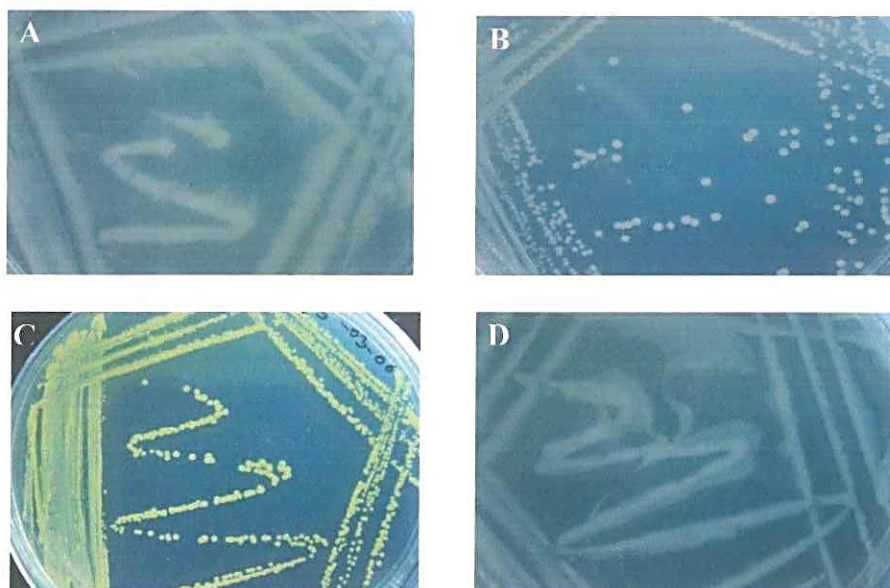


Figura 22. Cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Biología del Desarrollo (IIO). (A) cepa MA5, (B) cepa MA6 y (C) cepa MA11, (D) cepa MB2. El código de las cepas se explica en el texto en la sección de metodología.

A las cepas de erizo morado se les realizó la tinción de Gram para determinar su forma y al grupo al que pertenecían. Encontramos que todas fueron Gram-negativas y presentan formas de bacilos y cocobacilos (Fig. 23). En la tabla X se resumen las pruebas bioquímicas realizadas.

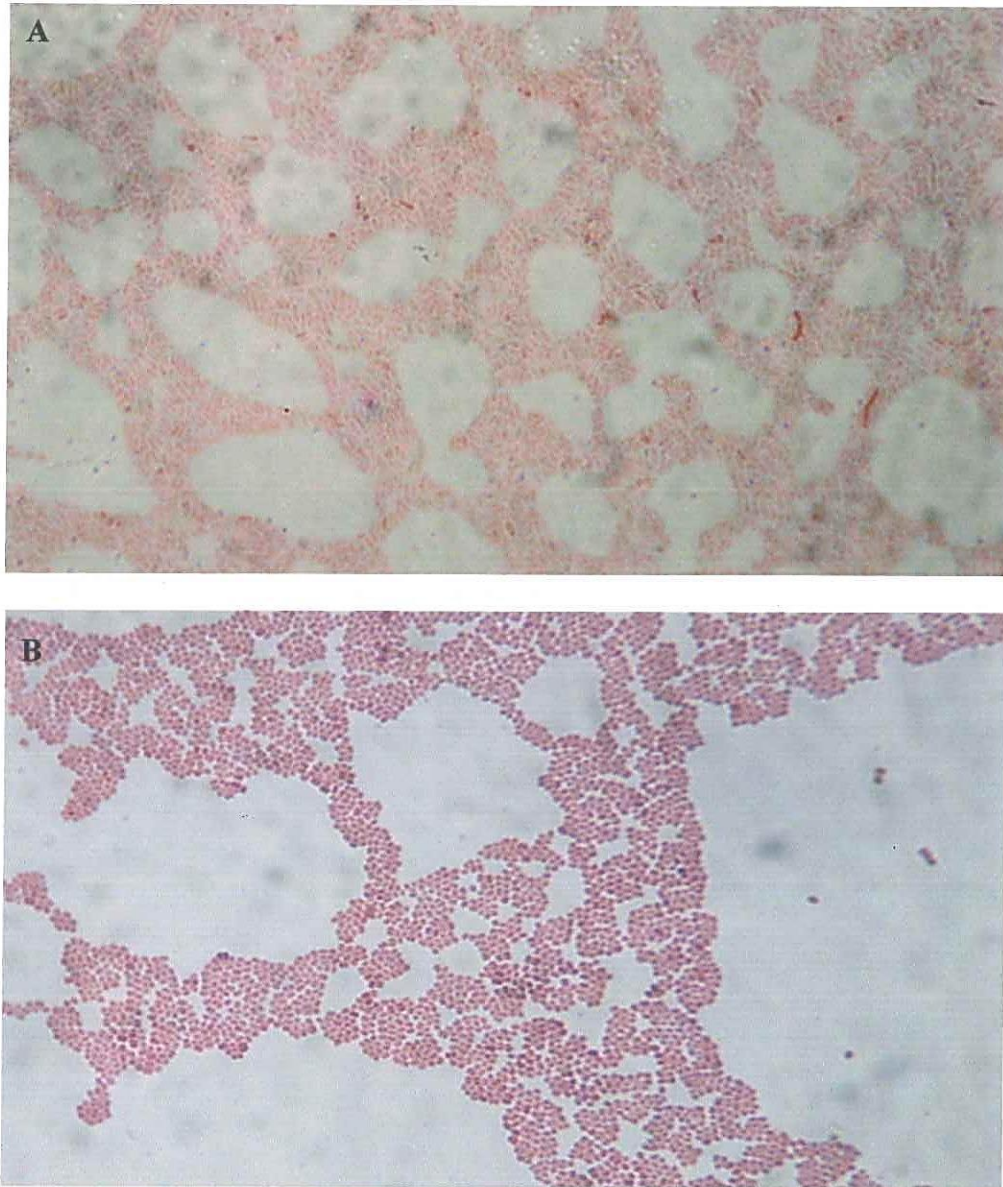


Figura 23. Tinciones de Gram, de las cepas de erizo morado obtenidas del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (LIO). (A) cepa MA5, bacilos cortos Gram-negativos, (B) cepa MA11, cocobacilos Gram-negativos. El código de las cepas se explica en el texto en la sección de metodología

Tabla X. Cepas bacterianas aisladas de erizo morado (*S. purpuratus*) obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

<i>Característica</i>	<i>MA5</i>	<i>MA6</i>	<i>MA11</i>	<i>MA14</i>	<i>MB2</i>	<i>MB3</i>
Oxidación	-	-	+	-	-	+
Fermentación	+	-	+	-	-	+
Oxidasa	+	+	-	+	+	+
Movilidad	-	+	-	+	-	+
Producción de Indol	+	+	-	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	-	+	-	+	-
Sensibilidad al 0/129 – 10µg	-	-	-	-	-	-
Sensibilidad al 0/129 – 150 µg	-	+	-	-	-	-
TCBS (crecimiento)	+	-	+	-	+	-
Salinidad 0%	-	-	+	+	-	-
Salinidad 6%	+	+	+	+	+	+
Salinidad 8%	+	-	+	+	+	+
API NE (no entérico)						
Reducción nitratos (NO ₃)	+	-	-	-	+	-
Glucosa, fermentación	+	-	-	-	+	-
Arginina dihidrolasa	+	-	+	+	+	-
Esculina hidrólisis	+	+	+	+	+	+
Gelatina hidrólisis	+	-	+	-	+	-
PNPG	-	+	-	+	+	+
D-glucosa (asimilación)	+	-	+	+	+	-
L-arabinosa (asimilación)	+	-	-	-	+	-
D-manosa (asimilación)	+	-	-	-	+	-
D-manitol (asimilación)	+	-	-	+	+	-
N-acetil-glucosamina (asimilación)	+	-	-	-	+	-
D-maltosa (asimilación)	+	-	+	-	+	-

Tabla X. (continuación)

<i>Característica</i>	<i>MA5</i>	<i>MA6</i>	<i>MA11</i>	<i>MA14</i>	<i>MB2</i>	<i>MB3</i>
Gluconato potásico (asimilación)	+	-	+	+	+	-
Acido cáprico (asimilación)	-	-	-	-	-	-
Acido adípico (asimilación)	+	-	-	+	+	-
Acido málico (asimilación)	+	-	+	+	+	-
Citrato trisódico (asimilación)	+	-	-	-	+	-
Acido fenilacético (asimilación)	-	-	+	-	-	-
API E (entérico)						
ONPG	-	-	-	-	-	-
Lisina decarboxilasa	+	-	-	+	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	-	-	+	+	-
Tiosulfato sódico	+	-	-	-	-	-
Urea hidrólisis	-	-	+	-	-	+
Triptófano desaminasa	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	-	-	-	+	-
D-glucosa (Fer/Ox)	+	-	-	-	+	-
D- manitol (Fer/Ox)	+	-	-	-	-	-
Inositol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-
D- sorbitol (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-
L- ramnosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-
D- sacarosa (Fer/Ox)	+	-	-	-	+	+
D- melibiosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-
Amigdalina (Fer/Ox)	+	-	-	-	+	-
L- arabinosa (Fer/Ox)	-	-	-	-	-	-
Nitrato potásico (NO ₂)	+	-	-	-	+	-
Nitrato potásico (N ₂)	-	-	-	-	-	-
MacConkey (crecimiento)	+	-	-	-	+	-

(+) reacción positiva, (-) reacción negativa

Con la realización de las pruebas bioquímicas y el uso de esquemas de identificación y el manual Bergey's (1994), se pudo determinar que las cepas bacterianas pertenecieron a grupos muy variados. Encontramos cepas del género *Aeromonas* o *Vibrio* que pertenecen a la familia *Vibrionaceae*. Por otro lado, se encontraron también cepas que pertenecen al género *Pseudomonas*, las cuales pertenecen al subgrupo 4A (Bacilos y cocos aerobios Gram-negativos). Como se observa en la tabla XI, se encontraron dos cepas que no fue posible hacer una identificación (marcadas con un signo de interrogación). En el caso de la cepa MA6, no se pudo determinar si pertenece al género *Deleya* o bien al género *Marinobacter*, los cuales pertenecen al subgrupo 4A del manual Bergey's. Lo mismo sucedió para la cepa MA11, en donde no se pudo determinar si pertenece a la familia de las Enterobacterias (*Enterobacteriaceae*) o al género *Cytophaga*.

Tabla XI. Posibles familias o géneros a los que pertenecen las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en estanques con presencia de erizos morados adultos (*Strongylocentrotus purpuratus*), obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).

Cepa Bacteriana	Posible Familia o Género
MA5	<i>Aeromonas</i>
MA6	<i>Deleya</i> ó <i>Marinobacter</i> (?)
MA11	<i>Enterobacteriaceae</i> ó <i>Cytophaga</i> (?)
MA14	<i>Pseudomonas</i>
MB2	<i>Pseudomonas</i>
MB3	<i>Aeromonas</i> o <i>Vibrio</i>

6. Discusión

En este trabajo se encontró que las biopelículas de 1 a 5 días de formación en presencia de erizos blancos y morados adultos, así como invertebrados marinos diversos y agua de mar en condiciones de laboratorio, indujeron muy poco a la metamorfosis en larvas de erizo blanco, alcanzando valores máximos de metamorfosis de 15.2%, a diferencia de lo que se encontró en biopelículas de 9 a 15 días de formación en donde la inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco fue significativamente mayor (> 85%).

Hoy se sabe que las larvas de muchas especies de invertebrados marinos llevan acabo el asentamiento y metamorfosis en respuesta a estímulos producidos por bacterias que se encuentran formando biopelículas (Thiyagarajan et al. 1999; Huang y Hadfield, 2003; Huggett et al. 2006) y lo anterior se corrobora para el erizo blanco *Lytechinus pictus*.

Es notable que las larvas de erizo blanco respondieron de mejor manera a la inducción a la metamorfosis en presencia de biopelículas con un mayor tiempo de formación que en biopelículas con menor tiempo de formación. Algo similar fue observado en el trabajo de Rahim et al. (2004), en donde encontraron que las especies de erizos *Pseudocentrotus depressus* y *Anthocidaris crassispina* respondían a la inducción a la metamorfosis en presencia de biopelículas de 8 a 23 días de formación, teniendo valores de metamorfosis arriba del 60%.

Por otro lado, Webster et al. (2004), encontraron que las larvas de varias especies de coral respondían de mejor manera a la metamorfosis en presencia de biopelículas de 4 a 8 semanas de formación, alcanzando valores de inducción a la metamorfosis del 42%. En poliquetos, Kirchman y Graham, (1982), encontraron que la especie *Janua* (*Dexiospira*) *brasiliensis*, presentaba una inducción a la metamorfosis de 70 a 80%, en presencia de biopelículas de 7 días de formación. Resultados semejantes fueron reportados por Huang y Hadfield (2003), para el poliqueto *Hydroides elegans*, en donde se observó una respuesta de inducción al asentamiento y metamorfosis del 80% en presencia de biopelículas de 5 días de formación.

En contraste a lo que se ha mencionado, Maki et al. (1990), observaron que larvas del balano *Balanus amphitrite* respondían de mejor manera a la metamorfosis en biopelículas con menos días de formación en relación con biopelículas con un mayor tiempo de formación. Es probable que los grupos bacterianos responsables de la inducción a la metamorfosis en esta especie de balano, se encuentren en las primeras fases de desarrollo de la biopelícula, y no en biopelículas con mayor tiempo de formación en donde la composición de grupos bacterianos pudiera ser diferente. De esta manera, con lo mencionado anteriormente, es probable que los grupos bacterianos responsables de la inducción a metamorfosis en larvas de erizo blanco, empiezan a colonizar las biopelículas a partir de los 9 días de formación o bien a la concentración de bacterias y por lo tanto a la concentración de los metabolitos secundarios.

Probablemente esto se deba a que estos grupos bacterianos necesitan ciertas condiciones tanto físicas (temperatura, luz, flujos de agua) como químicas y biológicas (disponibilidad de nutrientes, selección de sustrato), para poder incorporarse a la biopelícula, en donde se ha visto que estos factores son muy importantes y determinan la formación y composición bacteriana de las biopelículas (Davey y O'toole, 2000; Donlan, 2002).

También se observó que las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos, fueron mejores inductoras para las larvas de la misma especie en donde se generaron las biopelículas (erizo blanco), en relación con las biopelículas generadas en presencia de otros organismos (erizo morado, invertebrados marinos diversos y agua de mar). Se ha documentado que la presencia de conoespecíficos adultos inducen al asentamiento y metamorfosis en larvas de diversos invertebrados marinos (Burke, 1986; Toonen y Pawlik, 2001) como lo observado por Pearce y Scheibling (1990), en donde encontraron que las larvas de la galleta de mar *Echinarachnius parma* respondía mejor a la metamorfosis en arena acondicionada con organismos adultos de su misma especie a diferencia de sustratos en donde no había presencia de estos. De esta manera, es probable que los organismos adultos jueguen un papel importante en cuanto a la selección de la comunidad bacteriana que forma las biopelículas alrededor de las poblaciones de organismos adultos.

En otro trabajo realizado por Johnson et al. (1991), se encontró que la composición bacteriana de las biopelículas formadas sobre las superficies de algas coralinas era diferente a biopelículas formadas en sustratos aledaños y en biopelículas formadas en cajas de vidrio en la columna de agua; por lo tanto, estos autores concluyeron que existe una fuerte relación entre alga y bacteria en donde estas últimas utilizan los compuestos derivados de las algas para su crecimiento y desarrollo, por lo tanto, se observó que existe una selección bacteriana en cuanto a la composición de las biopelículas que se forman sobre las superficies de las algas.

La composición bacteriana que se encontró en las biopelículas que se generaron en condiciones de laboratorio en presencia de erizo blanco y erizo morado fueron diferentes en cuanto a familias y géneros bacterianos, por lo tanto es probable que ocurra algo similar a lo observado por Jonson et al. (1991), en donde los erizos blancos, pueden generar ciertos compuestos que sirvan como nutrientes que favorecen la fijación y el crecimiento de ciertos grupos bacterianos específicos y al mismo tiempo, favorezcan la inducción al asentamiento y a la metamorfosis de las larvas de su propia especie.

Sin embargo, también se observó que las larvas tuvieron la capacidad de metamorfizarse (aunque en menor porcentaje) con el resto de las biopelículas (erizo morado, invertebrados marinos diversos y agua de mar). Esto hace pensar que las larvas tienen la capacidad de responder a otros estímulos producidos por biopelículas que no sean generados en presencia de sus conoespecíficos

adultos y por lo tanto, esto podría favorecer la capacidad de dispersión y sobretodo a la sobrevivencia de las larvas y de la especie.

Aun así, se observó que las larvas de erizo blanco responden a la metamorfosis preferentemente en presencia de biopelículas generadas con erizos blancos adultos, por lo tanto, es posible que las larvas de erizo blanco prefieran metamorfizarse en presencia de ciertos grupos bacterianos que conforman las biopelículas generadas en presencia de erizos de su misma especie, a diferencia de grupos bacterianos que conforman las biopelículas generadas en presencia de otros organismos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inducción a la metamorfosis realizados con películas bacterianas monoespecíficas, se encontró que las cepas aisladas a partir de las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos inducían a la metamorfosis en mayor porcentaje a las larvas de erizo blanco, llegando a registrar porcentajes de inducción a metamorfosis de 25 a 48%, a diferencia de la respuesta de la larva de erizo blanco a metamorfosearse en presencia de cepas bacterianas aisladas a partir de biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos, en donde se observó que inducían a la metamorfosis a las larvas en porcentajes de 8 a 17%. Esta diferencia puede ser debida, a que la composición bacteriana encontrada en las biopelículas generadas en presencia tanto de erizos blancos y erizos morados fue diferente. Las cepas bacterianas que fueron aisladas de las

biopelículas en presencia de erizos blancos adultos, pertenecieron a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* ó *Photobacterium*, *Flavobacterium*, *Paracoccus* y bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias del género *Aeromonas* fueron las más representativas y las principales responsables de la inducción a la metamorfosis en las larvas de erizo blanco (48%).

Por otro lado, las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos, pertenecieron a los géneros *Pseudomonas*, *Deleya* o *Marinobacter*, *Aeromonas* y *Cytophaga*, en donde las más representativas fueron las del género *Pseudomonas*, pero las que presentaron los valores mas altos de inducción a metamorfosis en las larvas de erizo blanco fueron las del género *Deleya* o *Marinobacter* (17%). De esta manera se encontró, que la composición bacteriana de las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos y morados adultos fue diferente y por lo tanto, es posible que exista una relación entre erizos adultos y bacterias, en donde se favorezca la fijación y el crecimiento de ciertos grupos bacterianos específicos que conforman las biopelículas, los cuales favorecen la inducción a la metamorfosis a las larvas de erizo su propia especie, como en este caso se vio para las larvas de erizo blanco.

En otras especies de invertebrados marinos también se ha documentado la importancia de varios grupos bacterianos que forman parte de las biopelículas que promueven la inducción al asentamiento y metamorfosis de las larvas.

Negri et al. (2001), aislaron cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudoalteromonas* a partir de biopelículas generadas sobre algas coralinas incrustantes. Ellos encontraron que una cepa bacteriana, inducía más del 51.1% a la metamorfosis de larvas de corales *Acropora willisae* y *A. millepora*, mientras que las demás cepas presentaban valores de inducción por debajo del 20%; de esta manera los resultados indican que estas especies de coral responden principalmente a bacterias pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*.

En trabajos realizados con varias especies de poliquetos, principalmente con el serpúlido *Hydroides elegans*, se ha visto que bacterias pertenecientes al grupo de las *Roseobacter* y principalmente al grupo de las *Proteobacterias*, son las principales responsables del asentamiento y metamorfosis (Lau y Qian, 2001), donde el grupo de las *Proteobacterias* se encontraron especies pertenecientes al género *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, asimismo también se encontraron bacterias pertenecientes al grupo de las Gram-positivas entre las cuales se encontraron los géneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*, así como bacterias pertenecientes al género *Cytophaga*, en donde se observó que fueron las principales inductoras al asentamiento y metamorfosis en esta especie de poliqueto (Lau et al. 2002; Huang y Hadfield, 2003).

Leitz y Wagner (1993) encontraron que la cepa bacteriana *Alteromonas espejiana*, inducía más del 50% a la metamorfosis de larvas de *Hydractinia echinata*, aun así la inducción a la metamorfosis en este organismo, no se restringe a esta cepa bacteriana y es posible que existan otras bacterias que

estén involucradas en la inducción a la metamorfosis. Por lo tanto, es posible que la respuesta a la metamorfosis de los diferentes invertebrados marinos sea determinada por ciertos grupos bacterianos específicos que conforman las biopelículas presentes en cada hábitat.

Actualmente no se han realizado muchos trabajos en donde se compruebe que exista una relación entre organismos adultos y bacterias, en donde se seleccionen ciertos grupos bacterianos que promuevan el asentamiento y metamorfosis de las larvas de invertebrados marinos, pero con los resultados obtenidos en el presente trabajo, y como ya se ha mencionado anteriormente, es probable que exista este tipo de relación entre organismos adultos y bacterias, en donde se favorezca la selección de grupos bacterianos específicos responsables de inducir al asentamiento y metamorfosis de larvas de su misma especie. Lo anterior posiblemente tenga una repercusión importante en el asentamiento y posterior reclutamiento de los organismos bentónicos y en particular de las diferentes especies de erizo.

Por otra parte, en un planeta en donde la alteración del hábitat por actividad antropogénica y cambios climáticos de escala global, pudieran alterar la distribución de las comunidades bacterianas en el océano. Lo anterior tendría como consecuencia un elemento más que repercutiera en la distribución de las especies de erizo en particular y de las comunidades del bentos marino en general. Futuras investigaciones en relación con la variación de las comunidades bacterianas en el océano y su influencia en la inducción a la metamorfosis de

larvas de invertebrados marinos, serán necesarias para entender las oscilaciones en los ecosistemas marinos costeros y poder seguir utilizándolos en el presente y conservarlos para generaciones futuras.

7. Conclusiones

- Las larvas de erizo blanco respondieron mejor a la metamorfosis en presencia de biopelículas (generadas en presencia de erizos blancos y morados adultos, invertebrados marinos diversos y agua de mar) con más días de formación (9 -15 días) que con biopelículas generadas con un menor tiempo de formación (1 – 6 días).
- Las larvas de erizo blanco inducidas a la metamorfosis con biopelículas generadas en presencia de adultos de erizo blanco respondieron en mayor porcentaje a la metamorfosis, en comparación con biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos, invertebrados marinos y agua de mar.
- Se observó una cierta especificidad en la respuesta de las larvas de erizo blanco, para metamorfosearse sobre biopelículas generadas en presencia de adultos de su misma especie, pero también se observó que las larvas tienen la capacidad de responder a biopelículas generadas en presencia de otros organismos (erizo morado e invertebrados marinos) y agua de mar.
- Las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de 15 días de formación, así como las obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO) aisladas de biopelículas generadas en

presencia de erizos blancos adultos, indujeron a la metamorfosis en porcentajes de 25% a 48% entre las 48 y 72 horas de evaluación, cuando fueron utilizadas individualmente para formar películas bacterianas monoespecíficas.

- Las cepas bacterianas aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizos morados, obtenidas del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (LIO) no resultaron ser buenas inductoras a la metamorfosis de las larvas de erizo blanco.
- La composición bacteriana encontrada en las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos, fue diferente a la composición bacteriana encontrada en las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos.
- Las cepas bacterianas encontradas en las biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos, pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* ó *Photobacterium*, *Flavobacterium*, *Paracoccus* y de la familia *Enterobacteriaceae*.
- Las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos se encontraron los géneros *Pseudomonas*, *Delega* ó *Marinobacter*, *Cytophaga*, *Aeromonas*, *Vibrio* y de la familia *Enterobacteriaceae*.

8. Referencias

- Aileen N. C. y Daniel E. M. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 75: 191 – 215.
- Allen K.R. 1980. Common Intertidal Invertebrates of Southern California. Edición revisada 1980. Peek Publications.
- Alsina M. y Blanch A. R. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology.* 76: 79 – 85.
- Alsina M. y Blanch A. R. 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology.* 77: 719 – 721.
- Amador-Cano G., Carpizo-Iltuarte E. y Cristino-Jorge D. 2006. Role of protein Kinase C, G-protein coupled receptors, and calcium flux during metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.* 210: 121 – 131.
- Beiras R. y Widdows J. 1995. Induction of metamorphosis in larvae of the oyster *Crassostrea gigas* using neuroactive compounds. *Mar. Biol.* 123: 327 – 334.
- Bishop C. D. y Brandhorst B. P. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Biol. Bull.* 201: 394 – 404.

- Bonar D. B., Coon S. L., Walch M., Weiner R. M., y Fitt W. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bull. Mar. Sci.* 46: 484 – 498.
- Burke R. D. 1986. Pheromones and the gregarious settlement of marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 39: 323 – 331.
- Carpizo-Ituarte E. y Hadfield M. G. 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 urchin and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas.* 28: 157 – 166.
- Davey M. E. y O'toole G. A. 2000. Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 4, 847-867.
- Dobretsov S. V. y Qian P. Y. 2003. Pharmacological induction of larval settlement and metamorphosis in the blue mussel *Mytilus edulis* L. *Biofouling.* 19(1): 57 – 63.
- Donlan R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 9, 881- 890.
- Ettensohn C. A. y McClay D. R. 1988. Cell lineage conversion in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 112: 383 – 390.

- Forward R. B., Tankersley R. A., y Rittschof D. 2001. Cues for metamorphosis of Brachyuran Crabs: An Overview. ***Amer. Zool.*** 41: 1108 – 1122.
- Fukazawa H., Hirai H., Hori H., Roberts R. D., Nukaya H., Ishida H., y Tsuji K. 2001. Induction of abalone larval metamorphosis by thyroid hormones. ***Fisheries Science.*** 67: 985 – 988.
- Hadfield M. G., Unabia C. C., Smith. C. M., y Michael T. M. 1994. Settlement preferences of the ubiquitous fouler *Hydroides elegans*. En: M. F. Thompson, R. Nagabhushanam, R. Sarojini, and M. Fingerman. (Eds). Recent Developments in Biofouling Control. Oxford and IBH Pub. Co., New Delhi. p.p 67 – 74.
- Hadfield M. G. y Paul. V. J. 2001. Chapter 13: Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine-invertebrate larvae. ***Mar. Chem. Ecol.*** CRC Press Publications.
- Harder T., Lau S. C. K., Dahms H. U., y Qian P. Y. 2002. Isolation of bacterial metabolites as natural inducers for larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). ***J. Chem. Ecol.*** 28: 2029 – 2043.
- Hansen G. H. y Sorheim R. 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. ***J. Microbiological Methods.*** 13: 231 – 241.
- Heyward A. J. y Negri A. P. 1999. Natural inducers for coral larval metamorphosis. ***Coral Reefs.*** 18: 273 – 279.

- Holm E. R., Nedved B. T., Carpizo-Ituarte E., y Hadfield M. G. 1998. Metamorphic-signal transduction in *Hydroides elegans* (Polychaeta: Serpulidae) Is not mediated by a G protein. **Biol. Bull.** 195: 21 – 29.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., y Williams S. T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9na Edicion. Lippincott Williams and Wilkins Impressions.
- Huang S. y Hadfield M. G. 2003. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 260: 161 – 172.
- Huggett M. J., Williamson J. E., De Nys R., Kjelleberg S., y Steinberg P. D. 2006. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae. **Oecologia.** 149: 604 – 619.
- Jin T. y Qian P. Y. 2004. Effect of amino acids on larval metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 267: 209 – 218.
- 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. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 74: 281 – 294.
- Johnson C. R. y Sutton D. C. 1994. Bacteria on the surface of crustose coralline algae induced metamorphosis of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*. **Mar. Biol.** 120: 305 – 310.

- Khandeparker L., Anil A. C., y Raghukumar S. 2002. Exploration and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica) cyprids: significance of sugars and adult extract. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281: 77 – 88.
- Kirchman D., Graham S., Reish D., y Mitchell R. 1982. Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) Brasiliensis* grube (Polychaeta: Spirorbidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56: 153 – 163.
- Lam C., Harder T., y Qian P. Y. 2005. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by extracellular polymers of benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286: 145 – 154.
- 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. *Mar. Biol.* 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*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226: 301 – 310.
- Leitz T. y Wagner T. 1993. The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*. *Mar. Biol.* 115: 173 – 178.
- Maki J. S., Rittschof D., Samuelsson M.-O., Szewzyk U., Yule A. B., Kjelleberg S., Costlow J. D. y Mitchell R. 1990. Effect of marine bacteria and their

- exopolymers on the attachment of barnacle cypris larvae. *Bull. Mar. Sci.* 46: 499 – 511.
- Morse D. E. 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bull. Mar. Sci.* 46: 465 – 483.
- Morse A. N. C. y Morse D. E. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 75: 191 – 215.
- Moss G. 1999. Factors affecting settlement and early post-settlement survival of the New Zealand abalone *Haliotis australis*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* . 33: 271 – 278.
- Muroga K., Higashi M., y Keitoku H. 1987. The isolation of instestinal microflora of farmed Red Seabream (*Pagrus major*) and black Seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*. 65: 79 – 88.
- Naidenko T. K. 1996. Induction of metamorphosis of two species of sea urchin from Sea of Japan. *Mar. Biol.* 126: 685 – 692.
- Negri A. P., Webster N. S., Hill R. T. y Heyward A. J. 2001. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 223: 121 – 131.
- Nielsen C. 2000. The origin of metamorphosis. *Evolution and development*. 2:3, 127-129.

- Oliver J. D. 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Research*. 29(6A): 795 – 798.
- Pawlik J. R. 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma Lapidosa Californica* (Polychaeta: Sabellariidae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 46: 512 – 536.
- Pawlik J. R. y Hadfield M. G. 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: introduction and perspective. *Bull. Mar. Sci.* 46: 450 – 454.
- Pearce C. M. y Scheibling R. E. 1990. Induction of settlement and metamorphosis in the sand dollar *Echinarachnius parma*: evidence for an adult-associated factor. *Mar. Biol.* 107: 363 – 369.
- Pechenik J. A. y Qian P. Y. 1998. Onset and maintenance of metamorphic competence in the marine polychaete *Hydroides elegans* Haswell in response to three chemical cues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 51 – 74.
- Pineda J. y López M. 2002. Temperatura, stratification and barnacle larval settlement in two Californian sites. *Continental Shelf Research*. 22: 1183 – 1198.
- Rahim S. A., Li J. Y. y Kitamura H. 2004. Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina* in response to microbial films. *Mar. Biol.* 144: 71 – 78.

- Rhamani M. A. y Ueharai T. 2001. Induction of metamorphosis and substratum preference in four sympatric and closely related species of sea urchin (Genus *Echinometra*) in Okinawa. **Zoological Studies**. 40(1): 29 – 43.
- Saito M., Seki M., Amemiya S., Yamasu K., Suyemitsu T., y Ishihara K. 1998. Induction of metamorphosis in the sand dollar *Peronella japonica* by thyroid hormones. **Develop. Growth Differ.** 40: 307 – 312.
- Sherwood D. R. y McClay D. R. 1999. LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo. **Development**. 126: 1703 – 1713.
- Suenaga K., Hori H., Ishida H., Nukaya H., Roberts R. D., y Tsuji K. 2004. Inducing substance for abalone larval metamorphosis from the crustose coralline alga *Hydrolithon samoense*. **Fisheries science**. 70: 342 – 344.
- Swanson R. L., Williamson J. E., De Nys R., Kumar N., Bucknall, M. P. y Steinberg P. D. 2004. Induction of settlement of larvae of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by histamine from a host alga. **Biol. Bull.** 206: 161 – 172.
- Takahashi Y., Itoh K., Ishii M., Suzuki M., y Itabashi Y. 2002. Induction of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by glycoglycerolipids from the green alga *Ulvella lens*. **Mar. Biol.** 140: 763 – 771.
- Tamburri M. N., Zimmer-Faust R. K., y Tamplin M. L. 1992. Natural sources and properties of chemical inducers mediating settlement of oyster larvae: A re-examination. **Biol. Bull.** 183: 327 – 338.

- Thiyagarajan V., Sriyutha P. M., Nancharaia Y. V., Venugopalan V. P., Fair K. V. K. y Subramoniam T. 1999. Biofilm. Influence of biofilms on the larval settlement of *Balanus reticulatus* Ulitinomi (Cirripedia: Crustacea). **Biofilm Journal**. Vol 4. paper 1 (BF99001) <http://bioline.bdt.org.br/bf>.
- Toonen R. J. y Pawlik J. R. 2001. Settlement of the gregarious tube worm *Hydroides dianthus* (Polychaeta: Serpulidae). I. Gregarious and nongregarious settlement. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 224: 103 – 114.
- Tsukamoto S., Kato H., Hirota H., y Fusetani N. 1999. A larval metamorphosis-inducing substance in the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Eur. J. Biochem.** 264: 785 – 789.
- Unabia C. R. C. y Hadfield M. G. 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. **Mar. Biol.** 133: 55 – 64.
- Walters L. J., Hadfield M. G. y Smith C. M. 1996. Waterborne chemical compounds in tropical macroalgae: positive and negative cues for larval settlement. **Mar. Biol.** 126: 383 – 393.
- Watnick P. y Kolter R. 2000. City of Microbes. **Journal of Bacteriology**. 182:10, 2675- 2679.
- Webster N. S., Smith L. D., Heyward A. J. Watts J. E. M., Webb R. I., Blackall L. L., y Negri A. P. 2004. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. **App. Env. Microbiol.** 70(2): 1213 – 1221.

- Weiner R. M., Segall A. M., y Colwell R. R. 1985. Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the eastern oyster). *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 83 – 90.
- Williamson J. E., De Nys R., Kumar N., Carson D. G., y Steingberg P. D. 2000. Induction of metamorphosis in the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from algal host *Delisea pulchra*. *Biol. Bull.* 198: 332 – 345.
- Yool A. J., Grau S. M., Hadfield M. G., Jensen R. A., Markell D. A., y Morse D. E. 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. *Biol. Bull.* 170: 255 – 266.
- Zega G., Pennati R., Gropelli S., Sotgia C., y De Bernardi F. 2005. Dopamine and serotonin modulate the onset of metamorphosis in the ascidian *Phallusia mammillata*. *Dev. Biol.* 282: 246 – 256.
- Zigler K. S. y Lessios H. A. 2004. Speciation on the coasts of the New World: phylogeography and the evolution of bindin in the sea urchin genus *Lytechinus*. *Evolution.* 58: 1225 – 1241.
- Zimmer R. K. y Butman C. A. 2000. Chemical signaling processes in the marine environment. *Biol. Bull.* 198: 168 – 187.

Apéndice I

1.1 Medios de cultivo para crecimiento bacteriano

Medio Líquido

1 L.

Caldo marino 2216 (Difco) 37.4g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Disolver y esterilizar

Medio Solidó

1 L.

Caldo marino 2216 (Difco) 37.4g

Bacto agar 3g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar y esterilizar.

Enfriar sin que solidifique y vaciar en cajas de Petri.

1.2 Medios de cultivo para las Pruebas Bioquímicas

Oxidación – Fermentación

1 L

Caldo marino 2216 (Difco)	37.4g
Bacto Agar	3g
Rojo Fenol	0.01g
Tris HCl	0.50g
Agua desionizada	1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar y esterilizar.

Solución de Glucosa al 10% (1.0g en 10mL). Esterilizar.

En condiciones asépticas, a 90mL de medio estéril adicionar 10mL de la solución de Glucosa 10% estéril. Agitar vigorosamente y distribuir en tubos de ensayo estériles.

Distribuir 2mL en tubos de ensayo.

Preparar 2 tubos por cepa.

Movilidad

1 L.

Caldo Marino 2216 (Difco)	37.4 g
Agar (.05%)	5g
Agua desionizada	1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar.

Distribuir 2mL en tubos de ensayo y esterilizar.

Indol

1L.

Caldo Marino 2216 (Difco) 37.4 g

L – triptofano (0.04%) 0.4g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Distribuir 2mL en tubos de ensayo y esterilizar.

Sensibilidad a O/129 (concentraciones: $10\mu\text{gml}^{-1}$ y $150\mu\text{gml}^{-1}$)

1L.

Agar Marino 2216 (Difco) 55.1g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar. Esterilizar

Una vez esterilizado el medio, adicionar el O/129

1000 μg en 100mL de medio (o 1mg en 100mL) para $10\mu\text{gml}^{-1}$ conc. final

15000 μg en 100mL de medio (o 15mg en 100mL) para $150\mu\text{gml}^{-1}$ conc. final

Vertir en cajas de Petri.

Requerimiento de Sal (concentraciones: 0, 6 y 8%)

1L.

Bactopeptona	5g
Extracto de levadura	1g
Cloruro ferrico (solución 1%)	1mL
NaCl 0%	0g
NaCl 6%	60g (6g en 100mL)
NaCl 8%	80g (8g en 100mL)
Agar	13g
Agua desionizada	1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar. Esterilizar.

Verter en caja de Petri.

Rojo de Metilo y Voges Proskauer

Caldo Marino 2216 (Difco)	37.4g
Glucosa (1%)	10g
Agua desionizada	1L

pH 7.6

Distribuir 1mL en tubos de ensayo y esterilizar. Preparar 2 tubos por cepa.

Crecimiento en TCBS

1L.

Media agar TCBS (Difco)	89g
Agua de mar	450mL
Agua desionizada	550mL

pH 8.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar. **No esterilizar.**

Verter en caja de Petri.

Crecimiento en agar McConkey

1L.

Medio agar McConkey (Difco)	50g
Agua de mar	540mL
Agua desionizada	460mL

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar. Esterilizar.

Verter en cajas de Petri

Apéndice II

2.1 Tablas de densidad bacteriana de los cultivos para ensayos de inducción a la metamorfosis mediante películas bacterianas mono-específicas

Las siguientes tablas nos muestran la densidad bacteriana de los cultivos de cada una de las cepas bacterianas aisladas de las biopelículas de erizo blanco de 15 días y de las obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo.

Tabla XII. Densidad bacteriana de los cultivos mono-específicos de bacterias aisladas de la biopelícula de 15 días generadas en presencia de erizo blanco adultos.

Cepa Bacteriana	Absorbancia	Células / mL	Volumen adicionar Microlitros (μ L)
PBB1	1.836	9.18×10^8	54
PBB2	1.728	8.64×10^8	57
PBB3	1.459	7.29×10^8	68
PBB4	1.226	6.13×10^8	81
PBB5	0.152	7.58×10^7	659
PBB6	0.408	2.04×10^8	245
PBB7	0.262	1.31×10^8	381
PBB8	0.265	1.32×10^8	378
PBB9	-	-	-

Tabla XIII. Densidad bacteriana de los cultivos monoespecíficos de bacterias aisladas de biopelículas generadas en presencia de erizos blancos adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO)

Cepa Bacteriana	Absorbancia	Células / mL	Volumen adicionar Microlitros (μL)
BA3	0.294	1.47×10^8	340
BA5	0.386	1.93×10^8	259
BA6	0.784	3.92×10^8	126
BA9	0.422	2.11×10^8	237
BA10	0.430	2.15×10^8	233
BA11	0.382	1.91×10^8	262
BA12	0.379	1.90×10^8	263
BB3	0.421	2.11×10^8	237
BB6	0.397	1.98×10^8	252
BB7	0.552	2.76×10^8	181
BB9	0.377	1.89×10^8	264

Tabla XIV. Densidad bacteriana de los cultivos monoespecíficos de bacterias aisladas de las biopelículas generadas en presencia de erizos morados adultos, obtenidas del cepario del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO).

Cepa Bacteriana	Absorbancia	Células / mL	Volumen adicionar Microlitros (μL)
MA5	0.028	1.40×10^7	3570
MA6	0.265	1.33×10^8	375
MA11	0.598	2.99×10^8	167
MA14	0.023	1.13×10^7	4420
MB2	0.087	4.34×10^7	1150
MB3	0.059	2.93×10^7	1700