



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL
PARASITOIDISMO DE CILIADOS *Collinia* SPP. EN
EUFÁUSIDOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

Mario Josué Aguilar Méndez

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2008

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 8 del mes de Julio del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Diversidad bacteriana asociada al parasitoidismo de ciliados *Collinia* spp., en eufáusidos del Golfo de California"

Presentada por el alumno:

Mario Josué Aguilar Méndez

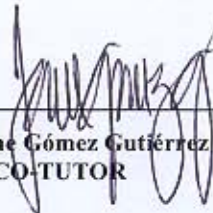
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



LA COMISION REVISORA

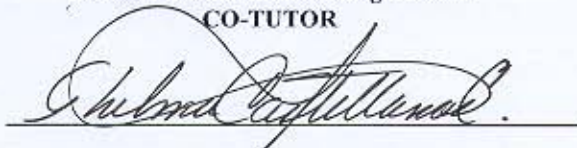
Dr. Alejandro López Cortés
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Jaime Gómez Gutiérrez
CO-TUTOR



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
CO-TUTOR



**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

COMITÉ TUTORIAL:

Director

Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Tutor

Dr. Jaime Gómez Gutiérrez
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional

Tutor

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. /Unidad Mazatlán en
Acuacultura y Manejo Ambiental

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Director

Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Tutor

Dr. Jaime Gómez Gutiérrez
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional

Tutor

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. /Unidad Mazatlán en
Acuacultura y Manejo Ambiental

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Director

Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Tutor

Dr. Jaime Gómez Gutiérrez
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional

Tutor

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. /Unidad Mazatlán en
Acuacultura y Manejo Ambiental

Suplente

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

RESUMEN

Se describe por vez primera la diversidad bacteriana del estómago de dos especies de eufáusidos subtropicales *Nyctiphanes simplex* y *Nematoscelis difficilis* y aquella asociada al tejido infectado de *N. simplex* por el ciliado del género *Collinia* spp. *N. simplex* es el eufáusido numéricamente dominante en el noroeste de México. En Bahía Magdalena y en el Golfo de California se encontraron bacterias en el hemocele de *N. simplex* infectados y en asociación a los ciliados en la etapa de vida libre. Un ensamble de componentes microbianos bacteria-ciliado, producto del proceso de parasitoidismo resultan en filamentos mucilaginosos con forma y tamaño similar a nieve marina. Se contaron y se aislaron cepas bacterianas del estómago de ambas especies y tejido infectado de *N. simplex*. También se extrajo ADN de estómagos sanos de ambas especies de krill e infectados de *N. simplex*. La identificación bacteriana fue realizada mediante la secuenciación del 16S ARNr tanto de cultivos como de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) recuperadas mediante geles de electroforesis en gradiente desnaturante (DGGE). Los antecedentes sobre la diversidad bacteriana en estómagos de krill se han inferido únicamente empleando métodos cultivo-dependientes, y sólo para especies de krill con distribuciones zoogeográficas en áreas templadas y polares. En este estudio se presenta el análisis de comunidades de bacterias asociadas a especies de krill saludables e infectados, previamente desconocidas, de una zona de transición climática-oceanográfica con influjo de masas de agua templada y tropical. Los estómagos de *N. simplex* y *N. difficilis* saludables presentaron entre ellos una carga bacteriana similar. Durante la infección temprana se observó una reducción de la densidad bacteriana cultivable, el incremento de las unidades formadoras de colonias en la infección tardía se relaciona con el abatimiento del sistema inmune del krill debido al proceso de parasitoidismo. El análisis de las comunidades bacterianas mediante DGGE mostró valores altos de dominancia para la etapa de infección tardía y durante el proceso de formación de filamentos, la mayor diversidad de OTUs no cultivables se relaciona a la etapa de fase libre del ciliado. La estrategia polifásica complementó el análisis de donde resultaron al menos 17 géneros de bacterias, cuatro pertenecieron a OTUs no cultivados y el 73% de las secuencias correspondieron al linaje de las γ -proteobacteria. A partir de la similitud encontrada entre las bacterias del estómago de krill sano e infectado así como entre el hemocele infectado y los filamentos proponemos que el mecanismo de infección del ciliado es de origen trófico.

Palabras Clave: *Collinia*, asociación bacteria-ciliado, krill.

ABSTRACT

The bacterial diversity of the stomach of two subtropical euphausiid species, *Nyctiphanes simplex* and *Nematoscelis difficilis* and those associated with the infected tissue of *N. simplex* by the parasitoid ciliate of the genera *Collinia*, are described. *N. simplex* is the numerically dominant euphausiid throughout northeastern Mexico. Bacteria were discovered in the hemocoel of infected *N. simplex* and associated with the free-swimming ciliate stages from krill samples collected at Bahía Magdalena and the Gulf of California. The parasitoidism of *N. simplex* includes a bacteria-ciliate assemblage that form mucilaginous filaments similar in form and size to “marine snow”. Bacterial strains were counted and isolated. DNA was extracted from the stomach of healthy specimens of both krill species and from infected tissue of *N. simplex*. Bacteria were identified using the 16S rRNA sequences from bacterial strains and from the operational taxonomic units (OTUs) retrieved by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Previous studies to estimate bacterial diversity in krill have been inferred using culture-dependent methods exclusively in temperate and polar krill species. We describe a novel bacterial community associated with healthy and infected temperate and tropical krill species. The stomach of healthy *N. simplex* and *N. difficilis* had similar counts of colony forming units. During the early infection phase, a reduction of bacterial load was observed and during the late infection the viable bacteria increased, probably associated with the compromised immune system of the krill caused by parasitoid ciliate histophagy. The DGGE community analysis showed high dominance during the late infection and filament-forming process. The highest diversity of uncultured OTUs was related to the free-swimming ciliate stage. A polyphasic methodological approach was used to complement the analysis, resulting in identification of at least 17 bacteria genera, four of them belonging to uncultured OTUs. About 73% of the sequences correspond to the γ -proteobacteria lineage. From the high similarity of the bacterial community of healthy and infected *N. simplex* and the similarity between the bacterial community in infected hemocoels and the filaments, we concluded that *Collinia* infection is a trophic mechanism.

Keywords: *Collinia*, Bacteria-ciliate assemblage, krill.

DEDICATORIA.

A mi madre Ma. Esthela Méndez Ortega y a mis abuelos por su incondicional cariño y apoyo, que aun desde lejos ha permitido que este sueño se realice.

A Beatriz del Carmen Aguilar Maza, que ha sido mi soporte y confidente a lo largo de este proyecto, sin tu infinito cariño este proyecto jamas se hubiera realizado.

A mi hijo Dante Josué Aguilar Salazar por ser el constante temple y la fortaleza de mi vida.

En memoria de:

Ing. Gregorio Méndez Orendain.

Don Goyo “como, al igual que el Popocatepetl, los residentes de sus faldas lo llaman cariñosamente”

AGRADECIMIENTOS

“No man is an island” (John Donne)

Esta investigación fue financiada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. a través del proyecto Fiscal PC4.2 “Diversidad Microbiana”, el proyecto SEP-CONACyT 45914/A-1 “Diversidad Microbiana: Fuente de innovación en biotecnología”, por el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional con los proyectos de investigación institucional: SIP20040013, SIP20050082, SIP20060856, SIP20070279, el proyecto SEMARNAT-CONACyT 2004-C01-01-144 “Monitoreo de la producción secundaria, dinámica poblacional y parasitismo de especies claves del zooplancton mediante incubaciones *in situ* y métodos hidroacústicos en el Golfo de California, el proyecto SAGARPA-CONACyT S007-2005-1-11717 Ecología de crustáceos galatheidos (fase pelágica) e ictioplancton con énfasis en especies béntico-demersales en el Golfo de California y por la Universidad Nacional Autónoma de México con los proyectos de investigación ‘Dinámica del ecosistema pelágico de Bahía Magdalena (DEPBAMA) y ‘Cardumenes de peces pelágicos menores en el Golfo de California’ (CAPEGOLCA) (PAPIIT IN219502 y IN210622). Se agradece a CONACyT por el otorgamiento de la beca de maestría número 200966 y al departamento de Posgrado del CIBNOR por el apoyo económico durante cinco meses.

Agradezco a Ariel Cruz Villacorta (CIBNOR) por su valiosa ayuda en las observaciones de ciliados y bacterias mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Al Biol. Mar. Samuel Martínez Gómez por proveer los datos y la realización de los mapas de distribución y abundancia de *N. simplex*. A la tripulación del B/O El Puma,

al grupo del Laboratorio de Ecología de Pesquerías del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL-UNAM) y CICIMAR por su cooperación durante los cruceros DEPBAMA y CAPEGOLCA, particularmente al Dr. Carlos Robinson Mendoza por su apoyo logístico de tiempo de buque y al personal científico participante en el crucero CAPEGOLCA II realizado en enero de 2007.

A Dr. Bruno Gómez Gil y al grupo del laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., (CIAD), Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental por su apoyo antes y después del crucero oceanográfico CAPEGOLCA II.

Al grupo del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR por su valiosa ayuda y acertados consejos durante el procesamiento de las muestras.

A mis asesores: Dr. Alejandro López Cortés, Dr. Jaime Gómez Gutiérrez y Dr. Bruno Gomez Gil por compartir varias horas de su valioso tiempo así como por su paciencia y atinados comentarios durante el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a mi mujer Beatriz del Carmen Aguilar Maza por brindarme su enorme comprensión y apoyo durante la realización de este proyecto. A mi familia por su comprensión (y paciencia) a lo largo de mi formación y a mis amigos por compartir conmigo este tiempo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	7
1.1.1 <i>Microbiota intestinal de krill</i>	10
1.1.2 <i>Densidad bacteriana en krill</i>	11
1.1.3 <i>Riqueza específica o microbiota en tracto digestivo de los eufáusidos</i>	12
1.1.4 <i>Ciliados parasitoides de krill</i>	13
1.2 Hipótesis general	16
1.3 Objetivo general	17
1.4 Objetivos particulares	17
2. MATERIALES Y METODOS	18
2.1 Recolección de eufáusidos	18
2.2 Disección.	21
2.2.1 <i>Disección del estómago.</i>	21
2.2.2 <i>Disección del tejido endoparasitado.</i>	22
2.2.3 <i>Obtención de filamentos conformados por ciliados Collinia y bacterias</i>	23
2.3 Análisis dependiente del cultivo de la comunidad bacteriana.	23
2.3.1 <i>Primo-aislamiento y condiciones de incubación.</i>	23
2.3.2 <i>Determinación de las unidades formadoras de colonias</i>	24
2.3.3 <i>Aislamiento y caracterización morfológica de cepas.</i>	25
2.3.4 <i>Mantenimiento y criopreservación de las cepas aisladas.</i>	25
2.4 Microscopia Electronica de Barrido (SEM).	26
2.4.1 <i>Fijación y deshidratación.</i>	26
2.4.2 <i>Montaje y visualización de las muestras.</i>	26
2.4.3 <i>Morfometría bacteriana a partir de imágenes de SEM.</i>	27
2.5 Análisis molecular de comunidades bacterianas.	27
2.5.1 <i>Extracción de ácidos nucleicos.</i>	27
2.5.2 <i>Amplificación del Fragmento 341-907 del 16S ADNr bacteriano para DGGE.</i>	28
2.5.3 <i>Amplificación del fragmento 8-1952 del 16S ADNr bacteriano.</i>	30
2.6 Geles de electroforesis con gradiente desnaturalizante (DGGE).	31
2.6.1 <i>Estructura de DGGE.</i>	31
2.6.2 <i>Condiciones de DGGE.</i>	32
2.6.3 <i>Tinción del DGGE.</i>	33
2.6.4 <i>Análisis de comunidades bacterianas a partir del DGGE</i>	34
2.6.5 <i>Recuperación de bandas y reamplificación</i>	36
2.7 Análisis filogenéticos	37
2.7.1 <i>Calificación y edición de las secuencias.</i>	37
2.7.2 <i>Construcción de árboles filogenéticos.</i>	37
3. RESULTADOS	39
3.1 Distribución de los organismos parasitados en el Golfo de California.	39
3.2 Carga bacteriana de eufáusidos sanos e infectados.	40
3.3 Formación de filamentos.	41

3.4	<i>Aislamiento e identificación de la microbiota cultivable.</i>	42
3.5	<i>Análisis de las comunidades bacterianas asociadas al proceso de parasitoidismo.</i>	44
3.6	<i>Relaciones filogenéticas de las secuencias del 16S ARNr bacteriano.</i>	47
3.7	<i>Modelo conceptual de la sucesión bacteriana a través del proceso de infección.</i>	67
4.	DISCUSIÓN.	71
4.1	<i>Distribución de los organismos parasitados</i>	72
4.2	<i>Microbiota asociada al estómago del krill subtropical.</i>	74
4.2.1	<i>Densidad bacteriana</i>	74
4.2.2	<i>Componentes de la comunidad.</i>	75
4.2.3	<i>Gradientes latitudinales (diferencias de ecosistemas) en las comunidades bacterianas de eufáusidos.</i>	80
4.3	<i>Microbiota asociada al sistema parasitoide.</i>	83
4.3.1	<i>Densidad bacteriana</i>	83
4.3.2	<i>Componentes de la comunidad bacteriana.</i>	87
4.3.3	<i>Mecanismo de infección.</i>	92
4.4	<i>Identidad filogenética de los componentes de la comunidad bacteriana.</i>	98
5.	CONCLUSIONES.	104
6.	REFERENCIAS.	106
7.1	<i>Morfología colonial de los primo-aislamientos recuperados durante este estudio.</i>	116
7.6	<i>Protocolo de extracción de ácidos nucleicos para bacterias Gram. negativas de tejidos fijados en etanol por medio del paquete de extracción DNeasy de Quiagen.</i>	125

LISTA DE FIGURAS

- Figura. 1. Micrografía de microscopia electrónica de barrido (SEM) de las bacterias (bacilos) y los ciliados del género *Collinia* spp., detectados dentro del hemocele del eufáusido *Nyctiphanes simplex*. Las flechas indican los bacilos sobre la membrana del ciliado. Micrografía tomada por Jaime Gómez-Gutiérrez y Ariel Cruz Villacorta. 15
- Figura. 2. Derrotero del crucero oceanográfico CAPEGOLCA II realizado a bordo del B/O “El Puma” del 10 al 31 de enero, 2007. Los puntos azules representan las estaciones oceanográficas donde se realizaron los muestreos de zooplancton con registro de variables ambientales por medio de CTD y la línea roja muestra ruta del derrotero del crucero oceanográfico iniciando por la parte central del Golfo de California..... 19
- Figura. 3. Diagrama de flujo del análisis de bacterias cultivadas y de OTUs directamente obtenidos de los eufáusidos mediante DGGE. Las líneas rojas muestran los productos de PCR de las muestras de campo (comunidad *in situ*) y las verdes los productos de PCR de las cepas aisladas que sirven como marcador en el DGGE (carril 1) (Fotografías de eufáusidos tomadas por Jaime Gómez Gutiérrez). 38
- Figura 4. Distribución de los eufáusidos muestreados durante el crucero Capegolca-II. Los organismos infectados se encontraron en áreas cercanas a la costa..... 39
- Figura. 5. Densidad bacteriana en el estómago de eufáusidos saludables de *Nyctiphanes simplex* y *Nematoscelsis difficilis* y en el tejido infectado de *N. simplex* en etapa temprana y avanzada del proceso. Las barras representan el error estandar de los datos. 41
- Figura. 6. Micrografía de SEM de los ciliados del género *Collinia* spp. (A), durante la fase de vida libre obtenidos pocos minutos después de la muerte de un eufáusido *Nyctiphanes simplex* en infección avanzada. La agregación en “racimo” de los protozoarios indica el comienzo del proceso de formación de filamentos (B). 42
- Figura. 7. Imágenes de los geles de electroforesis de gradiente desnaturizante (DGGE). El gradiente de desnaturización fue de 30% a 70% (últimos 157 mm). La electroforesis se realizó a 60° C, 100 V durante 16 h. Los carriles indican la fase de infección parasitoide (T= infección temprana, A= Infección Avanzada, C= ciliados de vida libre (transmisión) y F= filamentos de bacterias-ciliados) y número serial que identifica a la muestra. Se añadieron tres carriles estandar (M) en cada gel..... 45
- Figura 8. Localización de bandas (OTUs) analizadas a partir de la técnica DGGE utilizando el programa GelComprar II V 4.602. Los puntos rojos indican la posición de las bandas identificadas, las flechas señalan aquellas bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas..... 46

Figura. 9. Análisis de agrupamientos (clusters en inglés) a partir de los patrones de bandas detectados en el análisis de DGGE, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es un indicador de la abundancia relativa con los cuales se calcularon los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H), riqueza específica (R), dominancia (D) y equidad (E) para cada una de las comunidades bacterianas (bandas). Los superíndices K1 y K2 indican que el tejido analizado corresponde a un mismo individuo de eufáusido..... 47

Figura. 10. Relación filogenética de bacterias y OTUs inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr obtenidas de cada condición del proceso de parasitoidismo, sanos (negro), fase endoparasítica (infección temprana y tardía, en rojo) y fase de vida libre (ciliados libres y filamentos, en azul) utilizando el modelo de cálculo de distancias Weighbour. Se utilizó el archeon *Halorubrum trapanicum* (en gris) como raíz del filograma. Cada ramificación muestra el género más parecido para cada secuencia, la cepa o número de banda del DGGE y la clave de acceso de Genbank. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 48

Figura. 11. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más similares a la cepa (en azul) clasificada como *Staphylococcus* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Macrococcus hajekii* (Bacillales: Staphylococcaceae) como raíz del filograma. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 50

Figura. 12. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) y bandas de DGGE (en rojo) clasificadas dentro de la familia Flavobacteriaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Cryomorpha ignava* (Flavobacteriales: Cryomorphaceae) como referencia de la raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio. 51

Figura. 13. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) y bandas de DGGE (en rojo) clasificadas dentro de la familia Rhodobacteriaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Hyphomonas neptunium* (Rhodobacterales: Hyphomonadaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio. 53

Figura. 14. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Ralstonia* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Polynucleobacter necessarius* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 54

Figura. 15. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la banda de DGGE (en rojo) clasificada como *Arcobacter* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Campylobacter hominis* (Campylobacterales:

Campylobacteraceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 55

Figura. 16. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Shewanella* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Pseudidiomarina taiwanensis* (Alteromonadales: Idiomarinaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 57

Figura. 17. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Marinobacter* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Microbulbifer maritimus* (Alteromonadales: Alteromonadaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 58

Figura. 18. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) o bandas de DGGE (en rojo) clasificadas como *Alteromonas* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Microbulbifer maritimus* (γ -Proteobacteria: Alteromonadaeae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 59

Figura 19. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Pseudoalteromonas* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Algicola bacteriolytica* (Alteromonadales: Pseudoalteromonadaceae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio. 60

Figura 20. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas dentro de la familia Vibrionaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Succinimonas amyloplitica* (Alteromonadales: Succinivibrionaceae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio..... 62

Figura. 21. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Microbacterium* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Leucobacter albus* (Micrococcineae: Microbacteriaceae) como raíz..... 63

Figura 22. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Kytococcus* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Leucobacter albus* (Micrococcineae: Microbacteriaceae) como raíz..... 64

Figura. 23. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Dietzia* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Mycobacterium conspicuum* (Corynebacterineae: Mycobacteriaceae) como raíz..... 65

Figura 24. Modelo conceptual del cambio de la comunidad microbiana durante el proceso de parasitoidismo desde el estómago de eufáusidos sanos hasta la formación de filamentos de ciliados-bacterias. A) carga bacteriana estimada mediante UFC (dependiente de cultivo) y el total de la densidad relativa en píxeles de las bandas de DGGE (independiente de cultivo). B y C) estimadores de la comunidad, D y E) componentes de la comunidad bacteriana UOTU= OTU no identificado. S= Sano, IT= infección temprana IA= infección avanzada CL= ciliados de vida libre F= filamentos mucilaginosos. 71

Figura. 25. Distribución y abundancia de eufáusidos adultos de *N. simplex* y número de eufáusidos infectados recolectados por estación de muestreo en Bahía Magdalena (2004) y el Golfo de California (2005 y 2007). Los círculos negros indican la ubicación de las estaciones oceanográficas, las isóneas en escala de grises representan gráficamente la densidad de eufáusidos sanos y los círculos de color la ubicación y número de eufáusidos infectados (Modificado de Gómez-Gutiérrez *et al.*, sin publicar). 73

Figura 26. Comparación de los componentes de las clases bacterianas representadas en la comunidad bacteriana asociada a 4 especies de eufáusidos de distribución geográfica ártica y antártica y 2 de distribución subtropical. 77

Figura 27. Grupos bacterianos que componen de la comunidad microbiana asociada a eufáusidos de distribución polar (Ártico y Antártico) y subtropical (Golfo de California). La mayoría de los grupos bacterianos que se encuentran en ambas comunidades latitudinales pero son usualmente representados por bacterias de géneros distintos..... 82

Fig.28. Ciclo de vida del ciliado *Collinia* spp., en *Nyctiphanes simplex* (Gómez-Gutiérrez *et al.*, datos sin publicar) 95

LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Eufáusidos recolectados durante el crucero oceanográfico CAPEGOLCA II (10-31 Enero, 2007). De un total de 220 organismos recolectados se utilizaron 43 para aislar bacterias del tracto digestivo y hemocele para realizar el diagnóstico dependiente de cultivo. 172 eufáusidos se destinaron para análisis independientes de cultivo de los cuales 155 se analizaron para pruebas moleculares (16S ARNr) y 24 eufáusidos para observación de morfología bacteriana y de ciliados parasitoides mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). N/D = no datos. 21
- Tabla II. Formulación de las soluciones de reserva para preparar la solución al 70%. 30% y 0% del DGGE. 32
- Tabla III. Formulación de las soluciones de 0%, 30% y 70% del DGGE a partir de las soluciones de reserva, el gradiente se obtiene utilizando las soluciones de 30% y 70%, mientras que la de 0% se utiliza para formar la zona de carga. Debido a que el oxígeno inhibe la polimerización de la poliacrilamida, cada solución se degasificó mediante una bomba de vacío a 650 mm Hg. 32
- Tabla IV. Morfología colonial, celular y afinidad al cristal violeta (tinción de Gram) de las colonias de bacterias secuenciadas, asignación de géneros y números de acceso a GenBank. La caracterización de la morfología colonial se realizó con base en los criterios de color, textura, margen y opacidad. 43
- Tabla V. Secuencias del 16S ARNr de las cepas y bandas de DGGE aisladas de estómagos y tejido infectado de eufáusidos en el Golfo de California. Se muestran los organismos más cercanos junto a su porcentaje de similitud, la cepa (o banda de DGGE), la longitud en pares de bases y la clave de acceso a Genbank. 66
- Tabla VI. Síntesis de la densidad y riqueza bacteriana encontrada en los eufáusidos a nivel mundial ordenados por orden cronológico. Las aproximaciones de densidad cultivo-dependientes son mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) mientras que las cultivo-independientes, antes de este estudio, fueron realizados mediante técnicas microscópicas a través del conteo directo de células en SEM o teñidas con naranja de acridina (AODC). * = OTUs obtenidos a partir de DGGE. 79

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de la diversidad de las comunidades microbianas, además de incrementar el conocimiento sobre los recursos genéticos de los ecosistemas, sienta las bases para el estudio de los patrones de distribución relativa de los organismos y los procesos ecológicos que los regulan (Øvreås, 2000). Las interacciones del tipo patógeno-hospedero están comúnmente asociadas a bacterias y el estudio de este tercer componente es fundamental para una mejor comprensión de estos procesos.

En cada ecosistema se encuentran dos principales categorías de bacterias: (1) bacterias autóctonas que se encuentran presentes posiblemente con reducida dependencia de las fluctuaciones de la concentración de materia orgánica y/o nutrientes y (2) bacterias alóctonas que tienen una presencia temporal, posiblemente favorecido por agentes vectores y/o dependientes de incrementos ocasionales en la concentración de nutrientes esenciales la metabolismo bacteriano y/o la presencia de sustratos inusuales pudiendo persistir en condiciones adversas en formas dormantes o en estructuras resistentes (Schlegel y Jannasch, 1981),

Savage (1977) definió a los ecosistemas microbianos gastrointestinales de metazoarios como unidades integradas abiertas e interactivas que contienen un gran número de hábitats colonizados por más de una población microbiana autóctona. Aunque en principio el concepto fue acuñado para describir comunidades del tracto gastrointestinal de mamíferos, esta definición también es adecuada para la conceptualización de comunidades de tracto digestivo de invertebrados. En hábitats como estos (con un constante flujo de materia orgánica) los organismos alóctonos normalmente sólo pasan a

través del tracto digestivo, alguno de ellos puede ocasionalmente ocupar el nicho de una bacteria autóctona, aunque esto usualmente sucede cuando el sistema es perturbado por un agente externo o la condición de salud del hospedero es modificada. En algunos casos la microbiota autóctona puede restablecerse cuando las condiciones del sistema regresa a la condición saludable. En el tracto digestivo de un crustáceo saludable los múltiples nichos se encuentran ocupados por microorganismos autóctonos. Cuando las bacterias patógenas oportunistas u obligadas se introducen al hospedero (por cualquier mecanismo de infección) son capaces de persistir en el ecosistema y su prevalencia varía de unos pocos individuos en la población a eventos epizooticos, mientras que los organismos autóctonos han estado presentes durante la evolución del hospedero, establecidos así la mayor parte o en todos los miembros de la población del anfitrión (Dubos *et al.*, 1965)

Las poblaciones bacterianas consisten en un grupo de clones (conjunto de células genéticamente similares derivadas de un ancestro común) que evolucionan independientemente de otros grupos genéticamente cercanos y que no presentan recombinación de tipo cromosómica (Vandamme *et al.*, 1996). La diversidad microbiana puede definirse utilizando una gran cantidad de criterios, como la morfología, fisiología, metabolismo, ecología, genómica y filogenia, entre otros (Keller y Zengler, 2004). La fracción de las comunidades de bacterias de vida libre en agua marina que han sido exitosamente aisladas y completamente caracterizadas (0.001-0.1%) (Amann *et al.*, 1995) es varios ordenes de magnitud menor a la riqueza estimada en comunidades gastrointestinales (10% al 50%) (Zoetendal *et al.*, 2004). Esto sugiere que las bacterias de vida libre tienen requerimientos fisiológicos aun poco comprendidos para poder

reproducirlos experimentalmente. La aproximación de la caracterización de bacterias por criterios fisiológicos (metabólicos) ha sido ampliamente utilizada para describir la comunidad de una forma funcional a partir mediante aislamiento de cepas de su ambiente natural (Amann *et al.*, 1995). Sin embargo, estas características no necesariamente reflejan la relación simbiótica y evolutiva de los microorganismos. Por esta razón, se ha sido necesario desarrollar nuevos métodos alternativos que no requieran el cultivo y aislamiento de los microorganismos, caracterizando la comunidad bacteriana total en cada una de las pruebas metabólicas estandarizadas (biolog, API etc.) ya sea en enriquecimientos microbianos o *in situ* (Øvreås, 2000).

Actualmente existe una amplia variedad de métodos para estimar la biodiversidad de comunidades microbianas del ambiente a partir de la separación de sus diferentes filotipos del gen que codifica para el 16S ARNr (o un fragmento de este): Polimorfismo de la conformación de la hebra sencilla de ADN (*Single strain conformation polymorphism*, SSCP) (Mohr y Tebbe, 2006), geles de electroforesis de gradiente desnaturizante (*Denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993; 1998), geles de electroforesis con temperatura en gradiente (*Temperature gradient gel electrophoresis*, TGGE) (Muyzer y Smalla 1998) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción terminales (*Terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP) (Wen-Tso *et al.*, 1997) entre otros. Aunque estos métodos ayudan a estimar la riqueza y abundancia relativa de las bacterias que conforman la comunidad bacteriana del ecosistema, estas no proveen información acerca de la función ecológica (relaciones interespecíficas, aporte bioenergético, entre otros) de los microorganismos en el ecosistema

(Keller y Zengler, 2004). Sin embargo, estos métodos pueden proveer una aproximación parcial si se utilizan para separar e identificar genes funcionales de los miembros que componen la comunidad bacteriana. El DGGE ha sido frecuentemente utilizado para estimar la diversidad bacteriana de ambientes relativamente simples caracterizados por una baja riqueza bacteriana (Øvreås, 2000). Las comparaciones entre las secuencias del 16S ARNr y el 23S ARNr proveen un marco filogenético para la clasificación bacteriana, indispensable para el establecimiento de la taxonomía polifásica (Colwell, 1970). El 16S rDNA bacteriano contiene en promedio 1500 nucleótidos, lo cual ha sido considerado de una longitud suficiente para un análisis filogenético confiable (Amann *et al.*, 1995).

Algunas estimaciones de la diversidad *sensu stricto* dependen de ciertos índices basados en la riqueza específica en microorganismos. Por esta razón se debe tener precaución con el manejo de estas variables particularmente debido a la actual controversia del concepto microbiano de especie como unidad ecológica. (Cohan, 2001; 2002; Stackebrandt *et al.*, 2002; Gevers *et al.*, 2005; Rosselló-Mora y Amann, 2001; Koeppel *et al.*, 2008). En respuesta a esto, la ecología microbiana ha utilizado técnicas de taxonomía numérica para categorizar a los microorganismos en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, en inglés) definidas a través de un patrón electroforético o mediante la secuencia del gen que codifica para moléculas altamente conservadas (Schloss y Handelsman, 2005).

Las primeras descripciones del sistema parasitoide-hospedero conformado por los ciliados del género *Collinia* (Orden Apostomatida) y los eufáusidos en el Pacífico Norte (Capriullo y Small, 1986; Capriullo *et al.*, 1991; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2006) no percibieron la presencia de bacterias por lo que no incluyeron análisis de las comunidades

bacterianas asociadas a este proceso endoparasitoide. En la actualidad existen descritas formalmente siete especies del género *Collinia*, de las cuales sólo dos de ellas se conocen que infectan eufáusidos: *C. beringensis* que infecta el eufáusido *Thysanoessa inermis* en el Mar de Bering (Capriullo y Small, 1986) y *C. oregonensis* que infecta los eufáusidos *Euphausia pacifica*, *Thysanoessa spinifera* y *Thysanoessa gregaria* en la costa de Washington, Oregon y California (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006). En estudios colaterales para la estimación de la producción secundaria del eufáusido *Nyctiphanes simplex* realizados en Bahía Magdalena se descubrió una interacción *Collinia*-krill similar a la registrada en el Mar de Bering y la costa este de Estados Unidos, representada por una especie de ciliado aun sin descripción formal. Observaciones de microscopía electrónica de barrido de especímenes en estadio de infección avanzada mostraron la presencia de numerosas bacterias en la superficie del ciliado parasitoide y en hemocele del eufáusido (Gómez-Gutiérrez com. pers.) lo cual motivó la presente investigación que analiza la diversidad de la comunidad bacteriana asociada al sistema parasitoide-hospedero del ciliado apostomatido del género *Collinia* que infectan a los eufáusidos (krill) *Nyctiphanes simplex* en el noroeste de México, con particular énfasis en los eufáusidos del Golfo de California. Asimismo como un marco de referencia comparativo (control) de la comunidad bacteriana asociada al parasitoidismo también se estudió la comunidad bacteriana presente en el tracto digestivo de eufáusidos saludables de las tres especies más abundantes de eufáusidos en el Golfo de California: *N. simplex*, *Nematoscelis difficilis* y *Euphausia eximia*. Desde una perspectiva microbiológica, el hospedero es considerado como un micro-ecosistema habitado por un número variable de OTUs bacterianas adaptadas a ese

ambiente (Amann *et al.*, 1995). En el presente estudio se utilizaron las secuencias parciales del 16S ARNr de bacterias (consideradas como OTUs distintas) obtenidas de los eufáusidos. Debido a las condiciones propias del sistema circulatorio abierto de los crustáceos, desde una perspectiva teórica, es de esperar que la biodiversidad bacteriana dentro de un hospedero sea relativamente menos diversa que en el ambiente acuático (bacterias de vida libre distribuidas en la columna de agua), por lo que los microecosistemas de tipo patógeno-hospederos ó parasito-hospedero son propicios para utilizar aproximaciones basadas en el 16S ARNr para caracterizar su biodiversidad relativa.

Morado y Small (1995) sugirieron que dentro de las enfermedades causadas por ciliados en crustáceos, las infecciones provocadas por el scuticociliado *Mesanophrys pugettensis* y otras especies del Orden apostomatida, particularmente del género *Collinia* spp., son consideradas las infecciones mas influyentes en la dinámica poblacional de los hospederos por su carácter parasitoide que de acuerdo con Lafferty y Kuris (2002) el parasitoidismo se define como el parásito obligado que requiere matar al hospedero para completar su ciclo de vida. Por lo cual algunas especies de ciliados son capaces de producir mortalidades significativas en poblaciones nativas de decápodos, anfípodos, copépodos y eufáusidos (Bradbury y Goyal, 1976; Morado y Small, 1995; Bradbury 1994; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006; Ohtsuka *et al.*, 2004).

En el Golfo de California se han registrado 11 especies de eufáusidos, de las cuales *Nyctiphanes simplex* es la especie más abundante encontrándose presente en todas las temporadas del año, siendo particularmente más numerosa en la parte norte del Golfo de California (Brinton, 1962; Brinton y Townsend, 1980). *N. simplex* es considerada una

especie de afinidad nerítica subtropical con migraciones verticales relativamente cortas (<200 m) (Brinton, 1967; Lavaniegos, 1996; Tremblay 2008). *Nematoscelis difficilis* es usualmente la segunda especie de eufáusido mas abundante del Golfo de California, principalmente durante la temporada fría (Diciembre-Mayo) distribuyéndose verticalmente a relativamente mayores profundidades que *N. simplex* (~300 m), mientras que *Euphausia eximia* de afinidad tropical endémica de los márgenes fríos del Pacífico Oriental Tropical. Esta especie es frecuentemente la tercer especie más abundante en el Golfo de California la cual también realiza un amplio intervalo de migración vertical diaria (>300 m) (Brinton y Townsend, 1980; Brinton, 1967; Lavaniegos, 1996; Tremblay, 2008). Esta es la primer investigación enfocada a describir la biota bacteriana de eufausidos subtropicales y tropicales a nivel mundial así como en la asociación parasitoide *Collinia*-krill teniendo implicaciones conceptuales de comparación con asociaciones bacterianas en eufáusidos de afinidad zoogeográfica templadas y polares de la estructuración de comunidades bacterianas en asociación simbiótica con eufáusidos sin precedentes.

1.1 Antecedentes

Los protozoarios más abundantes y frecuentes encontrados asociados a crustáceos como epibiontes usualmente son miembros del Filum Ciliophora de varias subclases: Hypostomata, Suctoria, Hymenostomata, Peritricha, y Spirotricha (Carman y Dobbs, 1997). En términos de frecuencia de infestación, las especies de ciliados apostomatidos en eufáusidos son principalmente exuviotrofos (que se alimentan de fluido exuvial) con escaso o nulo daño al hospedero (Lindley 1978, Landers *et al.*, 2006, 2007). Sin embargo,

otras especies tienen un efecto parasítico perforando la quitina del crustáceo causando lesiones en el exoesqueleto en forma de necropsias (Bradbury y Goyal, 1976; Bradbury 1994). En algunas especies de crustáceos holoplanctónicos los ciliados han evolucionado en parasitoidismo produciendo infecciones letales (Grimes y Bradbury 1992; Ohtsuka et al., 2004). En la actualidad se han descubierto básicamente tres mecanismos por la cual los ciliados pueden infectar al crustáceo hospedero: (1) considerando que los ciliados más ancestrales son de vida libre, se asume que el mecanismo de parasitismo ancestral es mediante ingestión del protozooario llegándose a adaptarse en el tracto alimentario de invertebrados (Baker, 1994), (2) rompiendo el exoesqueleto del crustáceo mediante enzimas quitinolíticas, (3) se abren paso a través de las heridas causadas durante los frecuentes eventos de muda o depredación por otros metazoarios (Grimes y Bradbury, 1992; Ohtsuka *et al.*, 2004). El primer mecanismo considera que los ciliados comúnmente no son parásitos sino comensales del hospedero llegando a convertirse en una asociación parasítica oportunista si las condiciones así lo favorecen. En el segundo mecanismo el ciliado altamente virulento posee estructuras o secreciones que permiten el paso a través de la cutícula quitinosa (exoesqueleto), mientras que en el tercer mecanismo el ciliado parásito facultativo requiere que el hospedero tenga una herida en el exoesqueleto causado por un depredador o algún otro medio para entrar al cuerpo del crustáceo hospedero (Morado y Small, 1995).

Los ciliados del género *Collinia* se encuentran en la cavidad del hemocele y sistema circulatorio del eufáusido hasta que lo aniquilan (< 3 días) (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006). Los eufáusidos saludables presentan una apariencia semi-transparente mientras que

los eufáusidos infectados por ciliados *Collinia* tienen el cefalotórax hinchado y su coloración varía entre beige y naranja brillante (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Debido a que los ciliados *Collinia* son apostomátidos (sin apostome o estructura oral) se ha inferido que en el estadio trofante se alimentan por osmotrofia. El estadio tomonte se reproduce por división binaria en palintomía dentro del hospedero aparentemente con una reducción del tamaño celular para formar estadios de transmisión tomitos. Cuando los ciliados están predominantemente en esta etapa dentro del eufáusido los ciliados lo aniquilan saliendo mediante la ruptura del exoesqueleto usualmente en la línea ecdisal (localizada entre el caparazón y el primer segmento abdominal) u otras partes del cuerpo. Los ciliados adoptan una breve etapa de vida libre en la fase tomito las cuales se enquistan (fase foronte). La mayor parte de los estadios forontes se enquistan como epibiontes de crustáceos (Bradbury 1994, Ohtsuka *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso de los ciliados *Collinia* se encistan presumiblemente en asociación con bacterias formando filamentos mucosos (3-12 h después de la muerte del animal) (Gómez-Gutiérrez, observ. pers.). La formación de estos filamentos ya habían sido observados en eufáusidos del Cañon de Astoria (Oregon) (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2006). No obstante, hasta la fecha el mecanismo de infección, el mecanismo de formación de estos filamentos y la composición de la comunidad bacteriana de este sistema parasitoide-hospedero han sido aspectos aún desconocidos en el ciclo de vida de estos ciliados.

1.1.1 *Microbiota intestinal de krill.*

Aunque existen algunos estudios que informan la presencia de ciliados en el tracto intestinal de eufáusidos, principalmente ciliados Eugreganididos (Kawaguchi y Toda, 1997; Takahashi *et al.*, 2003; 2004), son relativamente pocos los estudios sobre la comunidad bacteriana presente en el tracto digestivo de los eufáusidos. Todos los estudios previoamente realizados para estimar la diversidad bacteriana se han basado en aproximaciones dependientes del cultivo (Kelly *et al.*, 1978; Fevolden y Edisa, 1981; Turkiewicz *et al.*, 1982; Dabrowski *et al.*, 1983; Rakusa-Suszczewski y Zdanowski, 1989; Donachie *et al.*, 1995; Donachie, 1995; Donachie y Zdanowski, 1998). Estos estudios se han enfocado en la microbiota del tracto intestinal de especies de eufáusidos polares como *Euphausia superba*, *Euphausia crystallorophias*, *Thysanoessa macrura* (Antártico) y *Meganyctiphanes norvegica* (Ártico), por lo tanto la microbiota bacteriana en eufáusidos de ecosistemas subtropicales y tropicales aun no han sido explorada. Los eufáusidos subtropicales y tropicales tienen distintos requerimientos fisiológicos, térmicos, ciclos de vida más cortos y aunque probablemente se alimentan de los mismos grupos funcionales (microzooplancton, fitoplancton, mesozoplancton y nieve marina) estos deben tener notables diferencias en las especies que de las que se alimentan los eufáusidos polares. Por lo tanto, es de esperar que la composición específica de la comunidad bacteriana sea distinta en los eufausidos que habitan en ecosistemas de distintas latitudes.

1.1.2 Densidad bacteriana en krill

Kelly *et al.* (1978) encontraron una densidad inusualmente baja de bacterias de *Euphausia superba* fluctuando entre 650 a 1,100 bacterias g⁻¹. Posteriormente, Fevolden y Edisa (1981) encontraron aún una menor densidad ($5-6 \times 10^2$ bacterias g⁻¹) en un macerado del eufáusido antártico nerítico *Euphausia crystallorophias* a 3° C. Estudios mas recientes han informado que la densidad de la microbiota en el tracto digestivo de krill Antártico *E. superba* ha sido estimada en 1.41×10^7 bacterias por cada 2.47 mg (± 0.78 mg) (Rakusa-Suszczewski y Zdanowski, 1989). De acuerdo con ellos, esta concentración representa una densidad aproximadamente 260 veces mayor a la densidad de las bacterias de vida libre que en el medio marino. Turkiewicz *et al.* (1982) reportaron densidades de 4.9×10^2 a 1.4×10^7 UFC en el contenido estomacal de *E. superba*. Donachie (1995) y Donachie *et al.* (1995) informaron mayores densidades bacterianas en *E. superba* mediante la observación directa teñidas con naranja de acridina (AODC) con densidades de 3.28×10^9 bacterias g⁻¹, mientras que las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentaron densidades de 1.93×10^8 UFC g⁻¹. Donachie *et al.* (1995) informaron que el krill ártico *Meganycitiphanes norvergica* contenía cerca de 1.6×10^9 UFC g⁻¹ de estómago (peso seco) y 6.2×10^7 UFC g⁻¹ de hepatopáncreas (peso seco): de estas bacterias provenientes del estómago y hepatopáncreas aproximadamente 1×10^4 a 1×10^5 UFC g⁻¹ presentaron actividad quitinolítica. Ellos estimaron que 1.3×10^6 UFC g⁻¹ del peso seco del tejido estomacal así como 1.7×10^5 UFC g⁻¹ de hepatopáncreas (peso seco) contenían bacterias saprófitas (bacterias que obtiene todos los nutrimentos que requiere de materiales orgánicos en descomposición) (Donachie *et al.*, 1995). En la región antártica *Thysanoessa macrura* tiene

densidades bacterianas de $0.22 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ (Donachie, 1995). Debido a la limitación de los métodos dependientes de cultivo para la estimación de la densidad y composición específica de la comunidad microbiana, estos estudios potencialmente han subestimado la diversidad bacteriana asociada a las especies del krill en latitudes polares.

1.1.3 Riqueza específica o microbiota en tracto digestivo de los eupáusidos

Los estudios bacteriológicos previos revelan que el 40% de las bacterias asociadas a *E. superba* son de tipo Coriniformes, co-dominando en densidades poblacionales similares por *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y bacterias tipo *Moraxella*, mientras que los géneros de bacterias *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Vibrio* y *Bacillus* se encontraron en menor abundancia relativa (Kelly *et al.*, 1978). Turkiewicz *et al.* (1982) reportaron para el contenido estomacal de *E. superba* la presencia de *Corynebacterium* sp. y *Arthrobacter* sp.. Dabrowski *et al.* (1983) mencionaron que en el tracto digestivo de esta especie se encuentran al menos cuatro especies de bacterias mesofílicas anaeróbicas *Clostridium* (*C.*), *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. subterminale* y *Clostridium* spp.. Donachie y Zdanowski (1998) y Rakusa-Suszczewski y Zdanowski (1989) encontraron que la mayor parte de la biota bacteriana en el tracto alimenticio de *E. superba* se componía de cocos. Fevolden y Edisa (1981) informaron que el contenido estomacal de *Euphausia crystallorophias*, una especie antártica de afinidad nerítica, estuvo dominado principalmente por bacterias de los géneros *Moraxella*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium cytophaga*, y en menor densidad se detectaron a *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Planococcus*,

Brochotrix thermosphacta y bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae. Los reportes más recientes acerca de la microbiota asociada al estómago de krill muestran la presencia de *Psychrobacter proteolyticus* (Denner *et al.*, 2001) y de dos cepas de *Pseudoalteromonas* (Cieslinski *et al.*, 2005; 2007) en el estómago de *E. superba*.

1.1.4 Ciliados parasitoides de krill

Se han descrito ciliados epibiontes del Orden Apostomatida en su estadio forontes adheridos a los apéndices torácicos y abdominales de varias especies de eufáusidos en el Atlántico Norte (Lindley, 1978) y Pacífico Nororiental (Landers *et al.*, 2006; 2007), aunque algunos otros ciliados han sido identificados como endoparásitos de eufáusidos infectando el tracto intestinal (Kawaguchi y Toda, 1997; Takahashi *et al.*, 2003; 2004). Kawaguchi y Toda (1997) concluyeron que debido a que todos los individuos de *Euphausia superba* muestreados contenían ciliados motiles en el tracto digestivo y que ninguno de estos mostraban señales de enfermedad, considerando esta asociación posiblemente mutualista. En otro estudio se encontró dentro del tracto digestivo de *E. superba*, una densidad promedio de 493 ciliados eugregarinos por eufáusido en el 98% de las muestras analizadas (Takahashi *et al.*, 2003, 2004). Capriulo y Small (1986) descubrieron que ciliados endoparásitos del género *Collinia*, infectando el hemocele del eufáusido *Thysanoessa inermis* en el Mar de Bering. Los ciliados del género *Collinia* eran previamente conocidos infectando únicamente crustáceos decápodos, anfipodos y anélidos. La proporción de infección poblacional puede llegar a ser de hasta el 98% en localidades específicas (Capriulo *et al.*, 1991).

En el año 2000 se descubrieron ciliados Apostomátidos del género *Collinia* que infectan y matan (parasitoidismo) al menos tres especies de eufáusidos (*Euphausia pacifica*, *Thysanoessa spinifera* y *T. gregaria*) en la costa oeste de Estados Unidos (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006). Ellos descubrieron que este parasitoidismo es un vector significativo en la mortalidad en los eufáusidos de las costas de Washington, Oregon y California causando en ocasiones eventos epizooticos (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006). La frecuencia de infección es relativamente alta registrándose en aproximadamente 7% de las estaciones muestreadas durante siete cruceros oceanográficos.

En marzo 2004 fue descubierta una especie de ciliado parasitoide presuntamente del mismo género (*Collinia*), aún sin descripción formal infectando el eufáusido *Nyctiphanes simplex* en Bahía Magdalena (posteriormente estudiada en julio y diciembre 2004 en la misma bahía y en noviembre 2005, enero y julio 2007 en el Golfo de California. *Nyctiphanes simplex* es la especie nerítica numéricamente más abundante en el noroeste de México (Brinton, 1962; Brinton y Townsend, 1980) siendo la principal presa de ballenas azules, mantas y tiburones ballena (Gendron, 1992). Los ciliados se encuentran en el hemocele y sistema circulatorio del crustáceo donde se alimentan, crecen y se reproducen rápidamente hasta que aniquilan al eufáusido. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de ciliados infectando *N. simplex* en estadio avanzado de infección mostraron en ocasiones elevadas concentraciones de bacterias sobre las membranas celulares de los ciliados parasitoides (Fig. 1) aunque su procedencia e interacción bacteria-ciliado-hospedero era aún desconocida.

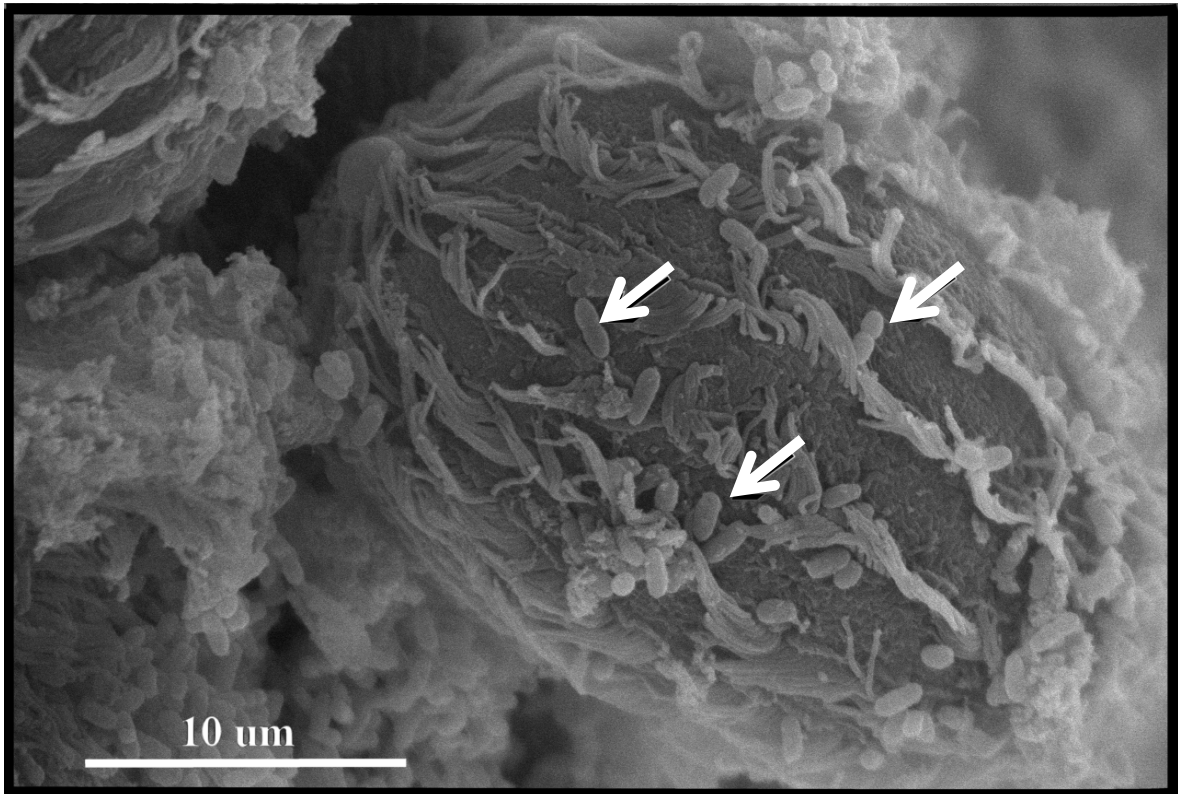


Figura. 1. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las bacterias (bacilos) y los ciliados del género *Collinia* spp., detectados dentro del hemocele del eufáusido *Nyctiphanes simplex*. Las flechas indican los bacilos sobre la membrana del ciliado. Micrografía tomada por Jaime Gómez-Gutiérrez y Ariel Cruz Villacorta.

Morado y Small (1995) consideraron a las especies del género *Collinia* como uno de los ciliados apostomátidos más virulentos, infectando generalmente decápodos, anfípodos y eufáusidos. Estos ciliados, al igual que muchos ciliados de vida libre (Baker, 1994), por no poseer apostome son considerados osmótrofos (se alimentan por osmosis) y se multiplican rápidamente dentro del hospedero produciendo así una infecciones letales. El parasitoidismo puede influenciar la dinámica poblacional modificando la abundancia de los eufáusidos, por lo que pueden representar una competencia con depredadores

convencionalmente conocidos de estos crustáceos como la ballena azul, mantas y juveniles de calamar.

1.2 Hipótesis general

Las micrografías de SEM realizadas en el hemocele de *N. simplex* infectados en estadio avanzado por el ciliado parasitoide *Collinia* spp. mostraron la presencia de bacterias (sin asignación taxonómica) asociadas al sistema parasitoide-hospedero (Fig. 1). Donachie (1995) propuso que algunas bacterias típicas del tracto digestivo invaden el tejido después de la muerte del eufáusido por lo que suponemos que aquellas bacterias presentes en el tejido infectado con histofagia avanzada por parte del ciliado son similares a las encontradas en el estómago del crustáceo. Esto puede proveer evidencia indirecta de que los ciliados parasitoides que infectan a los eufáusidos son ingeridos en fase de enquistamiento (foronte) y cuando éstos penetran en tracto digestivo para introducirse al hemocele del eufáusido, las bacterias encuentran en el hemocele del eufáusido un ambiente favorable para su proliferación. De ser correcta esta hipótesis se predice que las bacterias estarían presentes en cualquier estadio de infección, excepto en el hemocele de eufáusidos saludables. Debido a que el hemocele representa un ambiente considerablemente distinto al encontrado en el tracto intestinal, se propone la hipótesis que la diversidad bacteriana asociada al parasitoidismo en el hemocele será menor y comparativamente más especializada que la presente en el tracto digestivo de eufáusidos saludables.

1.3 Objetivo general

Comparar la riqueza, diversidad y abundancia bacteriana del tracto digestivo de eufáusidos saludables (*Nyctiphanes simplex*, *Nematoscelis difficilis* y *Euphausia eximia*) y en el hemocele de eufáusidos *N. simplex* parasitados por ciliados del género *Collinia* durante cada estadio de infección a partir de eufáusidos recolectados en el Golfo de California durante enero y julio del 2007 mediante análisis morfométricos, técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares.

1.4 Objetivos particulares

- Determinar la densidad bacteriana y caracterizar la microbiota del tracto digestivo de eufáusidos sanos de cada especie recolectada en el Golfo de California.
- Determinar la densidad bacteriana y caracterizar la microbiota asociada al tejido infectado de eufáusidos por ciliados endoparasitoides del género *Collinia* en cada estadio de infección de su ciclo de vida.
- Caracterizar la microbiota asociada a la fase de vida libre (transmisión estadio tomito) de los ciliados del género *Collinia* durante su proceso de transmisión de vida libre (estadio tomito), enquistamiento (estadio foronte) durante la formación de filamentos mucilaginosos.
- Realizar un modelo conceptual del flujo y cambio de la comunidad bacteriana asociada al proceso de infección.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 *Recolección de eufáusidos*

Mediante un sondeo hidroacústico con una ecosonda científica y una cámara submarina se localizaron y recolectaron eufáusidos con distintas redes de plancton a bordo del Buque Oceanográfico “El Puma” de la Universidad Nacional Autónoma de México en el Golfo de California durante el periodo del 10 al 31 de Enero de 2007 (Fig. 2). Para detectar las agregaciones de zooplancton se utilizó un ecosonda científica Simrad EY-500 120 kHz de frecuencia con haz dividido cuyos transductores se encuentran fijos en el pozo de instrumentos del buque ubicado a 4 m de profundidad. Con el fin de identificar el tipo de organismos responsables de la capa de dispersión del sonido se detuvo el buque en los sitios donde se detectaban intensas señales de plancton y necton para sumergir una videocámara de alta resolución Multi SeaCam 1060 (Deep Sea Power and Light, cámara con baja intensidad de luz en blanco y negro, un foco de 2.5 mm lentes y profundidad en campo de 10 cm a infinito conectada a un grabador de DVD (Gómez-Gutiérrez y Robinson, 2006). En estos sitios de video grabación se realizaron arrastres de plancton oblicuos con (1) red Bongo de 500 μm de luz de malla y diámetro de boca de 0.6 m equipadas con flujómetros digitales, (2) cuatro redes con mecanismo de apertura y cierre disparados por mensajeros para realizar muestreos estratificados con luz de malla de 300 μm y 0.6 m de diámetro de la boca. Los muestreos estratificados se realizaron típicamente a 25, 50, 75, 100, o 200 m de profundidad, (3) arrastres horizontales con una red superficial de 300 y 500 μm de luz de malla y 0.6 m de boca de diámetro y (4) arrastres de media agua con una red de micronecton tipo red Isaac Kidd de 1 pulgada en la primera malla y 500 μm en la

segunda malla. Muestreos adicionales se realizaron con una red “viva” (1 metro de abertura y 500 micras de luz de malla, con un copo recolector rígido de 0.71 m de largo por 0.25 m de diámetro) enviada típicamente en los primeros 100 metros de profundidad durante 10 minutos arrastrada a la deriva durante la noche. A esta red se le colocaba una lámpara submarina de 50 w para atraer a los eufáusidos que usualmente presentan un comportamiento positivamente fototrópico. Dependiendo de la abundancia de las colectas con cada red se obtuvieron eufáusidos vivos para los análisis de este estudio, pero en su gran mayoría los eufáusidos provinieron en orden de frecuencia, de la red viva, red estratificada, red Isaacs Kidd, red Bongo y finalmente de la red horizontal.

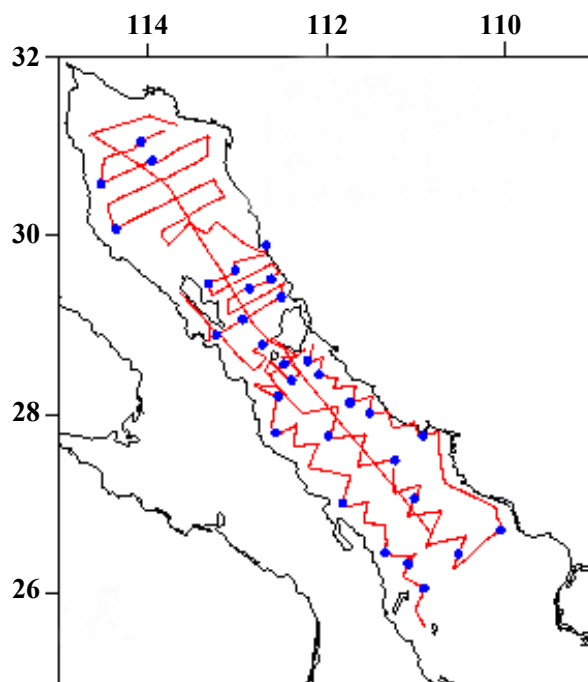


Figura. 2. Derrotero del crucero oceanográfico CAPEGOLCA II realizado a bordo del B/O “El Puma” del 10 al 31 de enero, 2007. Los puntos azules representan las estaciones oceanográficas donde se realizaron los muestreos de zooplancton con registro de variables ambientales por medio de CTD y la línea roja muestra ruta del derrotero del crucero oceanográfico iniciando por la parte central del Golfo de California.

El zooplancton de cada arrastre se vació en un recipiente de polietileno, se seleccionaron y separaron los eufáusidos mediante cucharas de plástico y se colocaron en un nuevo recipiente con agua de mar filtrada para su posterior análisis. Usando la coloración externa del eufáusido como criterio, se identificaron a los eufáusidos saludables (transparentes) de los infectados con ciliados del género *Collinia* en por lo menos dos fases de infección: temprana, aquellos que presentaban una coloración externa beige y tardía si la coloración se presentaba en un tono anaranjado y con cefalotórax visiblemente hinchado (Gomez-Gutierrez *et al.*, 2003; 2006). Cada eufáusido separado fue observado a bordo del buque con un estereomicroscopio Carl Zeiss SV11 equipado con un micrometro que permitió medir la longitud total de los eufáusidos con aumento de 0.6X desde la parte posterior del ojo a la punta del telson identificando su sexo y condición de salud. Los organismos saludables e infectados se destinaron a tres diferentes tipos de análisis para determinar de manera polifásica la composición de la comunidad bacteriana: cultivo-dependientes, molecular y de microscopia electrónica de barrido (SEM). En la Tabla I se muestra el número de organismos recolectados y el tipo de aproximación al que fueron destinados.

Tabla I. Eufáusidos recolectados durante el crucero oceanográfico CAPEGOLCA II (10-31 Enero, 2007). De un total de 220 organismos recolectados se utilizaron 43 para aislar bacterias del tracto digestivo y hemocele para realizar el diagnóstico dependiente de cultivo. 172 eufáusidos se destinaron para análisis independientes de cultivo de los cuales 155 se analizaron para pruebas moleculares (16S ARNr) y 24 eufáusidos para observación de morfología bacteriana y de ciliados parasitoides mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). N/D = no datos.

Especie de eufáusido	Condición del eufáusido	Tipo de análisis	Número de organismos	Tejido analizado
<i>Euphausia eximia</i>	Sano	Cultivo	2	Estómago
<i>Euphausia tenera</i>	Sano	ADN	3	Estómago
<i>Nematoscelis difficilis</i>	Sano	ADN	59	Estómago
<i>Nematoscelis difficilis</i>	Sano	Cultivo	11	Estómago
<i>Nematoscelis difficilis</i>	Sano	SEM	3	Estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Sano	ADN	84	Estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Sano	Cultivo	27	Estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Sano	SEM	20	Estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	N/D	SEM	1	Estómago y tejido
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Infección temprana	ADN	4	Hemocele y estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Infección temprana	Cultivo/ADN	1	Hemocele y estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Infección avanzada	ADN	3	Hemocele y estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Infección avanzada	Cultivo	1	Hemocele y estómago
<i>Nyctiphanes simplex</i>	Infección avanzada	Cultivo/ADN	1	Hemocele

2.2 Disección.

2.2.1 Disección del estómago.

Todas las disecciones realizadas en animales saludables e infectados se realizaron con animales vivos recién recolectados (usualmente < 15 minutos después de seleccionar al animal de la red). Cada organismo saludable fue lavado con agua destilada estéril y se transfirió a una caja de petri estéril utilizando pinzas de disección previamente flameadas. Utilizando el estereomicroscopio se midieron los organismos y se colocaron en posición

lateral, rodeando el exoesqueleto con las pinzas y colocando una aguja de disección flameada en etanol comercial detrás de los ojos. La disección se realizó inicialmente siguiendo el procedimiento descrito por Donachie *et al.*, (1995) en el cual se dio un rápido tirón poniendo la aguja detrás del ojo para arrancar la cabeza y dejar descubierto el estómago del organismo. Se separó todo el tejido que lo circundaba y se colocó en un tubo eppendorf con 1 mL de AMA ½ X (MacLeod, 1968) estéril donde se maceró mediante un homogenizador de tejidos en el caso de cultivo y con etanol grado molecular al 99% en el caso de las muestras para biología molecular. Sin embargo, en algunos casos esta técnica rompía también el estómago teniendo resultados no deseados. Algunas de las mejores preparaciones consistieron en levantar con la aguja de disección el cefalotórax y retirar con la ayuda de dos agujas de disección todos los órganos sin tocar el estómago, esta técnica dio buenos resultados en la mayor parte de las veces con aislamiento del estómago intacto (sin alterar su estructura y contenido).

2.2.2 Disección del tejido endoparasitado.

Los organismos infectados se lavaron con agua destilada estéril, se transfirieron a una caja de petri estéril utilizando pinzas de disección flameadas y se les perforó el cefalotórax mediante una aguja de disección estéril, se les levantó el caparazón con pinzas de disección estériles o se succionó parte del tejido desintegrado mediante una micropipeta eppendorf estéril para obtener una muestra de aproximadamente 0.5 mL la cual se colocó en un tubo eppendorf con 1 mL de AMA ½ X estéril donde se maceró con un homogenizador de tejidos en el caso de las muestras de cultivo y con 1 mL de etanol grado

molecular en el caso de las muestras para biología molecular. La mayoría de los organismos infectados presentaron un alto nivel de desintegración tisular (histofagia causada por los ciliados *Collinia*) a tal grado que imposibilitó la identificación de cualquier órgano interno, a excepción de dos individuos que presentaban aún integridad tisular en al menos el estómago, por lo que sólo en estos casos fue posible obtener una muestra discreta del tejido desintegrado y del estómago por separado, a las cuales se les lavó con AMA ½ X y se manipularon de igual forma que con el estómago de un organismo sano.

2.2.3 Obtención de filamentos conformados por ciliados *Collinia* y bacterias

Se lograron obtener filamentos mucilaginosos similares a los reportados en *Collinia oregonensis* (Gomez-Gutierrez *et al.*, 2006), incubando una porción de tejido infectado de un organismo con coloración anaranjada en tubos de microcentrifuga con AMA ½ X estéril a temperatura ambiente, los filamentos se observaron después de aproximadamente 10 horas de la incubación. Estos fueron preservados en etanol al 96% grado molecular.

2.3 Análisis dependiente del cultivo de la comunidad bacteriana.

2.3.1 Primo-aislamiento y condiciones de incubación.

De los macerados obtenidos a partir de tejido infectado y estómagos provenientes de organismos sanos e infectados se diluyeron serialmente en AMA ½ X hasta una dilución de 10^{-4} (en el orden de \times^{-1} , \times^{-2} , \times^{-3} y \times^{-4}); se tomó 0.1 mL de cada dilución, la cual se extendió por duplicado en la superficie del agar marino 2216 (ZoBell, 1941) contenido en cajas petri. Estas se cultivaron a $20.1^{\circ} \text{C} \pm 2.6^{\circ} \text{C}$ en una incubadora propiedad del B/O El Puma.

Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada caja y se extendieron por estría cruzada aquellas colonias aisladas en nuevas cajas de petri como primo-aislamiento. Estas colonias se cultivaron en las mismas condiciones y se preservaron a corto plazo en cajas de petri con agar marino 2216 para su consecuente aislamiento en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR. Algunas colonias fueron seleccionadas aleatoriamente, mientras que otras se seleccionaron debido a que presentaron diferentes morfologías coloniales distintivas.

2.3.2 Determinación de las unidades formadoras de colonias

Como primer aproximación de la densidad bacteriana en el tracto digestivo y en el tejido endoparasitado del krill se utilizó el método de Conteo Total Viable (CTV) para determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por diluciones seriadas de 1×10^0 a 1×10^{-5} , contando el número de colonias que crecieron en agar marino 2216 proveniente de cada dilución (a excepción de aquellos cultivos donde la densidad bacteriana era excesiva). Cada caja fue inoculada con 100 μ L de muestra por lo que se extrapoló el valor a UFC mL⁻¹. Para determinar si la distribución de los datos se ajusta a la distribución normal se utilizaron las pruebas de χ^2 y Shapiro-Wilks. Se compararon las medianas de las densidades bacterianas (UFC) entre *N. difficilis* sanos, *N. simplex* sanos, e infección temprana y avanzada mediante una análisis de rangos de Kruskal-Wallis. Asimismo se compararon las densidades bacterianas por sexos de cada especie mediante una análisis de comparación de medianas de Mann-Whitney, entre estaciones mediante una análisis de rangos de Kluskal-Wallis. Para probar si la densidad bacteriana se asocia con la longitud

toal de los eufáusidos se realizó una correlación lineal simple de la densidad bacteriana en función de la longitud. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del programa Statgraphics plot Ver. 2.0 p

2.3.3 Aislamiento y caracterización morfológica de cepas.

Se tomó una asada de aquellas colonias bacterianas discretas y consecutivamente se sembraron en agar marino 2216 (ZoBell 1941) a 30° C por el método de estría cruzada. Las colonias bacterianas aisladas se caracterizaron utilizando los siguientes criterios: tamaño, forma, color, textura, superficie, elevación y margen (Smith, 1977). Se tomó una asada de cada cepa, se colocó sobre un portaobjetos y se tiñó para Gram observandolas en un microscopio de luz e iluminación en campo claro a 100 X (Nikon Labophot UFX). Se fotografió el campo que mostró la mayoría de las particularidades de las células cultivadas y se caracterizaron respecto a su forma, largo, ancho y tipo de agrupación celular.

2.3.4 Mantenimiento y criopreservación de las cepas aisladas.

Se tomó una asada abundante de cada cepa identificada y se cultivaron en matraces con 50 mL de medio marino 2216, se incubaron a 30° C con agitación constante (120 rpm) durante 24-48 h. Se tomaron por duplicado 20 mL de cada cepa, se centrifugaron a 100 g durante 20 min a 20° C eliminando el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio marino 2216 y 50 µL (5% V/V) de dimetilsulfoxido (DMSO) dentro de un criovial de 2 mL. Esta muestra tratada fue preservada en un contenedor de nitrógeno líquido a -195 °C en el germoplasma del laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del

CIBNOR (La Paz, BCS) siguiendo el protocolo propuesto por Rippka *et al.* (1981). Se utilizó otra asada de las cepas para mantener las células viables en agar marino 2216 inclinado en tubos de petri a temperatura ambiente en un periodo no mayor a 3 meses.

2.4 Microscopia Electronica de Barrido (SEM).

2.4.1 Fijación y deshidratación.

Cada organismo se sumergió en 10 mL de glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos (cacodiliato de sodio 0.1 M, pH 7.4) dentro de un vial estéril, pasadas 2 h se preservaron en buffer de cacodilatos. Estos organismos preservados en buffer de cacodilatos se deshidrataron en una serie de inmersiones en etanol de dos horas en cada concentración (40%, 60%, 80% y 100%) y se completó el proceso en un secador de punto crítico marca Samdri PVT 3B durante 2 horas.

2.4.2 Montaje y visualización de las muestras.

Las muestras se disectaron para dejar descubierto el estómago, estos se colocaron en soportes de aluminio (stubs) pegados con cinta adherente conductiva de doble cara. Las muestras montadas se recubrieron con iones de paladio en un rociador de metales al vacío Denton Vacuum Desk II. Las muestras se colocaron en un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi S-3000N y se adquirieron las imágenes mediante el programa Quartz PCI (V 5.5). Las imágenes fueron almacenadas digitalmente en formato tiff.

2.4.3 Morfometría bacteriana a partir de imágenes de SEM.

Imágenes de tejido infectado de eufáusidos colectados en Bahía Magdalena fueron en su mayoría proporcionadas por el Dr. Jaime Gómez-Gutiérrez. Con el fin de identificar las morfologías bacterianas típicas del proceso de infección se utilizó el programa SigmaScan Pro 5.0 para contar, medir la longitud y el diámetro de todas las formas bacterianas de las imágenes obtenidas a través del microscopio electrónico de barrido. De la relación longitud/diámetro se realizó un análisis de agrupamiento con distancia euclidiana por estadio de infección, por especie de eufáusidos y por estación oceanográfica.

2.5 Análisis molecular de comunidades bacterianas.

2.5.1 Extracción de ácidos nucleicos.

De las muestras de campo, preservadas en etanol al 96% grado molecular, se disectó parte del tejido infectado y del estómago por el método descrito anteriormente y se extrajeron los ácidos nucleicos mediante el paquete de extracción DNeasy de Qiagen combinando los protocolos para muestras fijadas en etanol y utilizando lisozima para romper la pared celular de las bacterias Gram positivas. De las cepas aisladas se extrajeron los ácidos nucleicos mediante el paquete de extracción DNeasy de Qiagen combinando los protocolos para muestras fijadas en etanol y para bacterias Gram positivas o Gram negativas según el caso (Anexos 7.5 y 7.6).

Se visualizará el ADN obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, en buffer TBE 1X (el buffer TBE 10X esta compuesto por 108 g de Tris-Base, 55 g

de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5 M por cada litro de agua, pH= 8.0) con bromuro de etidio $0.033 \mu\text{L mL}^{-1}$, sumergidos en el mismo buffer, a 120 V durante menos de 35 minutos utilizando como marcador de peso molecular exACTGene 24kb Max DNA Ladder (Fisher Scientific International Inc.). Los geles se fotodocumentaron utilizando un transiluminador BioDoc-ittm-20 System (UVP).

Para homogenizar la concentración del ADN a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ se cuantificó la concentración de ADN de los extractos en un biofotómetro (BioPhotometer eppendorf 6131) colocando diluciones de $2 \mu\text{L}$ de muestra y $58 \mu\text{L}$ de agua desionizada estéril en celdas espectrofotométricas.

2.5.2 Amplificación del Fragmento 341-907 del 16S ADNr bacteriano para DGGE.

Se utilizaron los iniciadores universales para bacteria: 341F+GC: 5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG3' (Muyzer *et al.*, 1998) y DS907R/907R: 5'CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT3' (Teske *et al.*, 1996; Muyzer *et al.*, 1998) para amplificar un segmento de aproximadamente 566 pares de bases (de la base 341 a la 907, en referencia a *Escherichia coli*) del gen que codifica para el 16S ARNr de las bacterias presentes en la muestra y poder separarlas posteriormente mediante un gel de electroforesis de gradiente desnaturizante (DGGE). Se le añadió al segmento una secuencia terminal de guanina-citocina mediante el iniciador 341F+GC para aumentar la resolución al separar los fragmentos a través de esta aproximación, modificando el comportamiento de la fusión del

fragmento de ADN para detectar la mayor cantidad de variaciones en este (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989).

La amplificación enzimática de este segmento se realizó en un termociclador. Cada 25 μL de mezcla de reacción contiene: 14.46 μL de agua estéril libre de nucleasas, 5 μL de buffer de reacción 5X (Promega), 1.5 μL de solución de MgCl_2 a 25mM, 1.32 μL de una mezcla isonucleotídica de dinucleótidos trifosfatados (DNTP's) a 2.5 mM, 0.26 μL de cada primer ($250 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL de GoTaq® Flexi ADN Polimerasa y 1 μL de ADN purificado ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 94°C para desnaturalizar el ADN, posteriormente se realizaron 35 ciclos de 94°C (1 min.), 56°C (1 min.) y 72°C (1 min.), finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos. (Modificado de Muzer *et al.*, 1993). Las primeras amplificaciones fueron acompañadas de un control positivo, representado por una bacteria gram positiva: *Exiguobacterium mexicanum* cepa 8N (DSM 6208^T) (López-Cortés *et al.*, 2006). Posteriormente se empleó una de las cepas bacterianas obtenidas en este estudio, *Kytococcus* sp. cepa 9X⁻². El control negativo correspondió a ADN de un organismo eucariota representado por músculo de abulón o de camarón y una reacción “blanco” sin ADN

Una mezcla de productos de PCR derivados de 4 cepas de bacterias fue aplicada como estandar o marcador (M) del tope al fondo en el gel:

Con el fin de normalizar la migración de las bandas a lo largo del DGGE se le añadió a cada gel 3 carriles construidos a partir de una mezcla de productos de PCR derivados de cuatro secuencias de cepas aisladas en este estudio. En el DGGE las secuencias estándar se distribuyen, de menor a mayor concentración de desnaturalizante, en

el siguiente orden: *Pseudoalteromonas* 10Xb1, *Kytococcus* 9X⁻², *Shewanella* 54Xa1 y *Alteromonas* 42Xb4 (Figura 7 y 8, carriles M). Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, utilizando como marcador de peso molecular exACTGene 50bp Mini DNA Ladder (Fisher Scientific International Inc.). Los geles se fotodocumentaron. Se cuantificó la concentración de ADN en los productos de PCR en un biofotometro.

2.5.3 Amplificación del fragmento 8-1952 del 16S ADN_r bacteriano.

Se utilizaron los iniciadores universales Primer A: 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' y Primer B: 5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3' (Giovannoni, 1991) para amplificar un segmento de mayor longitud (1534 bases, de la posición 8 a la 1542 en referencia a *E. coli*) del gen que codifica para el 16S ARN_r de las cepas aisladas y posteriormente secuenciarlo. La amplificación se llevó a cabo usando los mismos reactivos y concentraciones que en la mezcla de reacción previamente descrita a excepción de los primers (Primer A y Primer B, a la misma concentración). Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 94° C para desnaturalizar el ADN, posteriormente se realizaron 30 ciclos de 94° C (1 min.), 60° C (1 min.) y 72° C (2 min.) y un ciclo final de extensión a 72° C (7 min) (Polz y Cavanaugh, 1997). Cada reacción fue acompañada de un control positivo, uno negativo y un blanco.

Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa, utilizando como marcador de peso molecular exACTGene 50bp Mini DNA Ladder (Fisher

Scientific International Inc.). Los geles se fotodocumentaron y se cuantificó la concentración de ADN de los productos de PCR en un biofotometro. Se enviaron por separado dos tubos de 30 μL (a mas de 197 $\text{ng}/\mu\text{L}$) con los productos de PCR de cada muestra a la compañía Macrogen en Corea para su secuenciación en ambos sentidos.

2.6 Geles de electroforesis con gradiente desnaturalizante (DGGE).

2.6.1 Estructura de DGGE.

Para identificar los cambios en las bases (mutaciones) de una secuencia de ADN (Fischer y Lerman, 1983) se desarrollaron la electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE), lo cual posteriormente aplicó para el análisis de comunidades microbianas siguiendo los criterios de Muyzer *et al.*, (1993). Los ribotipos (Fragmentos de ADN bicatenario del gen que codifica para el 16S ARNr de la misma longitud en bases pero diferente secuencia) amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante, formados en un sistema de detección de mutaciones universales (Bio-Rad) que cuenta con 16 pocillos para cargar hasta 50 μL de muestra. Para garantizar que la migración del ADN fuera homogénea a lo ancho del DGGE se utilizaron como control 3 carriles de cada gel (los 2 carriles de la orilla y el de en medio) a los cuales se les cargó con 5 μL ($458.47 \pm 41.57 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) de productos de PCR de cada una de las 4 cepas (25 μL en total por carril), a los carriles problema se les cargó con 30 μL ($495.74 \pm 47.56 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) de productos de PCR de cada muestra ambiental.

2.6.2 Condiciones de DGGE.

La electroforesis se realizó en geles de 1 mm de grosor compuestos de buffer Tris ácido acético EDTA (TAE 1X compuesto de Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.3) y poliacrilamida al 6% a partir de una mezcla de Acrilamida/bisacrilamida al 40%, con un gradiente desnaturante de 30% a 70% (por consenso se considera que 40% de formamida y 7 M de urea corresponde al 100% de agente desnaturante). A cada gel se le formó una zona de empaquetamiento sin agente desnaturante en la parte superior (Los Primeros 32 mm.). La electroforesis se realizó a temperatura constante (60° C) con 100 V y 50 mA durante 16 h. El gradiente de agentes desnaturantes permite la fusión parcial del ADN de forma diferencial y dependiente de su secuencia por lo que permite separar a los ribotipos presentes en la comunidad.

Tabla II. Formulación de las soluciones de reserva para preparar la solución al 70%. 30% y 0% del DGGE.

Reactivo	Solución al 70 %	Solución al 0 %
Urea	29.4 g	0 g
Formamida desionizada	28 mL	0 mL
Acrilamida/bis 40 %	15 mL	15 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL
Aforar con agua destilada:	100 mL	100 mL

Tabla III. Formulación de las soluciones de 0%, 30% y 70% del DGGE a partir de las soluciones de reserva, el gradiente se obtiene utilizando las soluciones de 30% y 70%, mientras que la de 0% se utiliza para formar la zona de carga. Debido a que el oxígeno inhibe la polimerización de la poliacrilamida, cada solución se degasificó mediante una bomba de vacío a 650 mm Hg.

Reactivo	Solución 30 %	Solución 70 %	Solución 0 %
Sol Desnat. 70 %	4.9 mL	11.1 mL	0 mL
Sol. Desnat. 0 %	6.2 mL	0 mL	8.0 mL
TEMED	6.5 µL	6.5 µL	7.5 µL
APS 10 %	42.5 µL	42.5 µL	55 µL
Tiempo en vacío	1 min	2 min	> 5 min

2.6.3 Tinción del DGGE.

La detección de las bandas de ADN se llevó a cabo mediante el método de tinción en plata descrito por (Bassam *et al.*, 1991) el cual consiste en 3 procesos: (1) fijación, (2) tinción y (3) revelado.

La fijación se realizó colocando el gel dentro de una charola con 500 mL de solución de fijación (50 mL de ácido acético Glacial y 450 mL de agua desionizada) durante 30 minutos en agitación lenta. Posteriormente se realizaron 3 enjuagados del gel en agua mili Q en agitación lenta durante 5 minutos en cada enjuagado. Cada gel fue teñido en una charola metálica con 560 mL de la solución de tinción (560 mL de agua desionizada, 0.5g de AgNO_3 y 750 μL de formaldehído al 37%) durante 30 minutos con agitación lenta y se removió el exceso de solución repitiendo el proceso de lavado. Finalmente se revelaron los geles en 600 mL de solución de revelado (600 mL de agua desionizada, 13.99 g de Na_2CO_3 , 1.2 mL de formaldehído al 37% y 0.6 mL de tiosulfato de sodio al 0.2%) con agitación manual hasta la visualización de las bandas, deteniendo la reacción con la mínima solución de fijación utilizada anteriormente y eliminando el exceso de reactivo con un último enjuague con agua desionizada en agitación lenta.

Los geles se foto-documentaron en un scanner densitométrico UMAX Powerlook 2100 XL. Las imágenes se guardaron en escala de grises a 400 dpi de resolución vertical y horizontal con 8 bits de profundidad para su posterior análisis y a color a 600 dpi de resolución vertical y horizontal con 24 bits de profundidad.

2.6.4 Análisis de comunidades bacterianas a partir del DGGE

Las imágenes en escala de grises obtenidas se procesaron y analizaron con ayuda del programa Gelcompar II V 4.602 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). De los geles normalizados se obtuvieron los patrones de migración de las bandas, correspondientes a cada comunidad, así como la intensidad de la banda en píxeles a través de la integración del área bajo una curva normal ajustada a la curva densitométrica de cada banda.

Se generó una matriz de datos correspondientes a las similitudes entre cada comunidad (banda) utilizando el coeficiente de similitud Dice, a partir de esta matriz se realizó el análisis de agrupamiento mediante el método de agrupamiento pareado sin peso mediante la media aritmética (UPGMA).

Considerando que la reacción en cadena de la polimerasa es un método que conlleva dos potenciales tipos de “artefactos”: (1) artefactos de secuencia o (errores del PCR) que pueden surgir de la formación de secuencias quiméricas, moléculas heteroduplex y/o errores propios de la polimerasa y (2) aquellos que sesgan la distribución de los productos de PCR debido a una amplificación desigual (inclinación debida al PCR), la cual puede ser debido a las diferencias intrínsecas en la eficiencia de amplificación de los templates, o a la inhibición de la amplificación por la auto-alineación de los templates más abundantes en los últimos ciclos del PCR (Suzuki y Giovanonni, 1996; Acinas *et al.*, 2005). El DGGE se restringe la separación de fragmentos de aproximadamente 500 bp., lo que limita la información para inferencias filogenéticas de las bandas reamplificadas. No siempre es posible separar fragmentos con cierta cantidad de variación y se ha reportado la co-migración de fragmentos de diferente secuencia pero con dominios de fusión similares

lo que podría resultar en una sub-estimación de la riqueza bacteriana. Este método está limitado al estudio de comunidades con reducida riqueza (poco complejas). (Muyzer y Samalla, 1998)

En el presente estudio se asume que:

- 1.- Debido a la complejidad que hace virtualmente impráctico utilizar el concepto especie bacteriano, la asignación taxonómica de los individuos es operacional y con base en su secuencia en la región parcial del gen que codifica para el 16S ARNr. De esta forma se definió a cada grupo (banda) como una unidad taxonómica operacional (OTU) distinta.
- 2.- Debido a que el DGGE permite separar los fragmentos de ADN de la misma longitud pero con base en su secuencia particular, se considera que cada banda corresponde a una población OTU.
- 3.- La intensidad de cada banda corresponde a la densidad del OTU que es considerada como su abundancia relativa dentro de la comunidad.

Tomando en cuenta los datos de identificación y estimación de abundancia relativa se estimó el índice de diversidad de Shanon y Weaver (1963):

$$(1) \quad H' = -\sum_{i=1}^d a_i \ln a_i$$

Donde a_i son las abundancias relativas en i clases, determinadas como la densidad de píxeles en i bandas en un carril del DGGE. Desde $i=1$ hasta “ d ” donde “ d ” indica la riqueza bacteriana en cada muestra.

Se estimaron también los índices de diversidad máxima ($H_{\max} = \ln d$), equitatividad ($Eq = H'/H_{\max}$) y dominancia ($Dm = 1 - Eq$) de cada comunidad detectada (carril del DGGE).

Se compararon estos cuatro índices entre las comunidades bacterianas encontradas en cada una de las etapas del parasitoidismo para contrastar la hipótesis de esta investigación de que la comunidad bacteriana de animales saludables e infectados es esencialmente semejante aunque relativamente más simple en los organismos endoparasitados.

Con el fin de identificar OTUs compartidos entre las fases de infección se buscaron valores compartidos entre el rango de migración normalizada de cada banda y de los estandar, suponiendo que las bandas con valores de migración similares corresponden a la misma secuencia.

2.6.5 Recuperación de bandas y reamplificación

Para aumentar el contraste, se colocó el gel en un transiluminador con luz blanca. Utilizando un escalpelo desinfectado con etanol se cortaron aquellas bandas que pudieron identificarse a simple vista y que se encontraban completamente separadas para evitar la contaminación con ADN de las bandas aledañas. Se colocaron las bandas en 50 μ L de buffer Crush and Soak a 36° C en agitación durante 24 h (Sambrook y Russell, 2001). El ADN se precipitó con 100 μ L de etanol para biología molecular y se resuspendió en 15 μ L de buffer TE (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen).

La reamplificación se realizó con los primers 341F y 907R utilizando las mismas concentraciones de la mezcla de reacción y parámetros de PCR que los utilizados para la amplificación con los primers 341F+GC y 907R. Se enviaron los productos de PCR a la compañía Macrogen en Corea para su secuenciación en ambos sentidos.

Se utilizó la designación de otus no identificados (UOTUs) para aquellas bandas cuya reamplificación y/o secuenciación no fue exitosa.

2.7 Análisis filogenéticos

2.7.1 Calificación y edición de las secuencias.

Los electroferogramas fueron calificados y editados mediante el programa Chromas Lite Ver 2.01, se realizaron alineamientos con las secuencias y con sus reversos complementarios para unirlos mediante el programa Blast 2 Sequences (Tatusova y Madden, 1999) disponible gratuitamente en línea en la página del Centro Nacional Estadounidense para la Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Aquellas secuencias con una calidad aceptable se les realizó una búsqueda de secuencias quiméricas utilizando el programa mglobalCHI (Komatsoulis y Waterman, 1997) para descartarlas de análisis posteriores. Se compararon las secuencias no quiméricas aquellas depositadas en Genbank (Benson *et al.*, 2005) a través del programa de alineamiento básico local y herramienta de búsqueda (BLAST) para la designación de género.

2.7.2 Construcción de árboles filogenéticos.

Con el fin de identificar la posición taxonómica de las secuencias de cada OTU, se obtuvieron de la base de datos de Genbank las secuencias de las cepas tipo más cercanas (similares) expresadas en porcentaje de similitud.

El alineamiento de las secuencias de las bacterias aisladas se realizó utilizando el modelo de Alineamiento mas cercano por terminación de espacio (NAST) (DeSantis *et al.*, 2006) disponible gratuitamente en internet en la página de GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov>). Se utilizó el modelo Weighbor (Bruno *et al.*, 2000) para construir el árbol filogenético de estas secuencias utilizando el programa Tree Builder

versión en línea disponible en la página Ribosomal Database Project (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Maidak *et al.* 1999; Maidak *et al.*, 2001).

Todas las secuencias analizadas fueron depositadas en la base de datos de Genbank (Benson *et al.* 2005) y sus números de acceso son listados en la Tabla V.

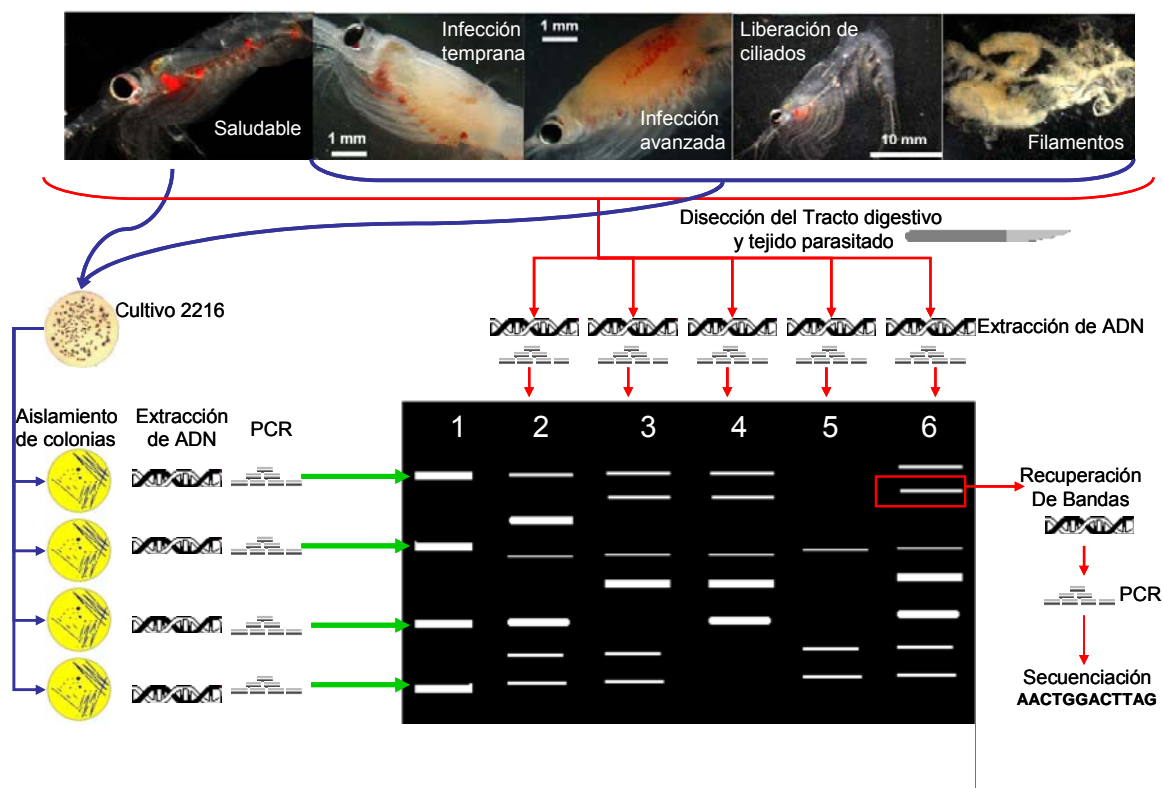


Figura. 3. Diagrama de flujo del análisis de bacterias cultivadas y de OTUs directamente obtenidos de los eufáusidos mediante DGGE. Las líneas rojas muestran los productos de PCR de las muestras de campo (comunidad *in situ*) y las verdes los productos de PCR de las cepas aisladas que sirven como marcador en el DGGE (carril 1) (Fotografías de eufáusidos tomadas por Jaime Gómez Gutiérrez).

3. RESULTADOS

3.1 Distribución de los organismos parasitados en el Golfo de California.

Durante el crucero realizado en enero del 2008 se lograron identificar 4 sitios con la presencia de eufáusidos *N. simplex* infectados, los organismos de esta especie fueron colectados en zonas costeras, mientras que *N. difficilis* fue colectado tanto de zonas costeras como de zonas oceánicas. Debido a que los organismos infectados fueron colectados con las redes viva, superficial y Isaac-kid, no fue posible estimar su abundancia por lo que los datos de distribución presentados en la figura 4 son cualitativos. En cada sitio donde se recolectaron organismos infectados se recolectaron también *N. simplex* sanos.

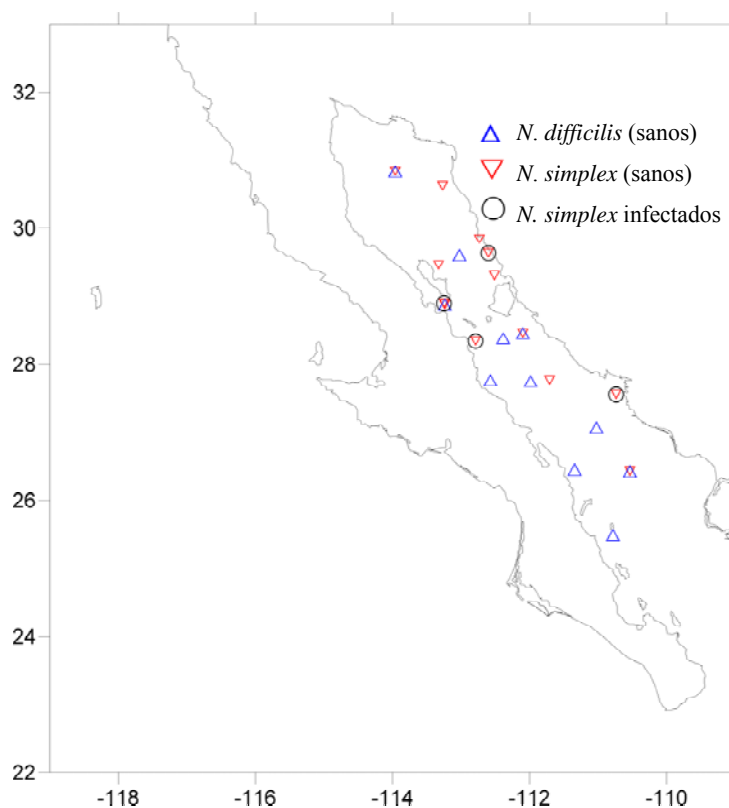


Figura 4. Distribución de los eufáusidos muestreados durante el crucero Capegolca-II. Los organismos infectados se encontraron en áreas cercanas a la costa.

3.2 Carga bacteriana de eufáusidos sanos e infectados.

Los organismos sanos presentaron una densidad bacteriana del orden de 10×10^5 UFC mL^{-1} (*N. simplex*= 8.73×10^5 UFC mL^{-1} n= 27, error estandar= 4×10^5 UFC mL^{-1} ; *N. difficilis*= $8.1 \pm 7 \times 10^5$ UFC mL^{-1} n= 11, error estandar= 2.1×10^5 UFC mL^{-1} UFC mL^{-1}) aunque no existe una diferencia significativa entre la carga bacteriana del estomago de *N. simplex* sano, de *N. difficilis* sano, el hemocele y estomago de *N. simplex* en infección temprana y *N. simplex* en infección avanzada ($p=0.0846$) se observa una tendencia a la disminución de la densidad bacteriana en la primer etapa de la infección ($1.85 \pm 0.53 \times 10^5$ UFC mL^{-1}) y fue en la parte final del proceso endoparasitoide cuando se denota un aumento de UFC a $1.89 \pm 0.94 \times 10^6$ UFC mL^{-1} (Fig. 5).

Se seleccionaron 201 colonias bacterianas cultivadas a bordo del buque oceanográfico, de las cuales 134 corresponden a estómagos de organismos sanos y 67 a tejido de organismos parasitados. Se agruparon estos primo-aislamientos en 31 grupos con base en las características coloniales similares entre ellos (anexo 7.1).

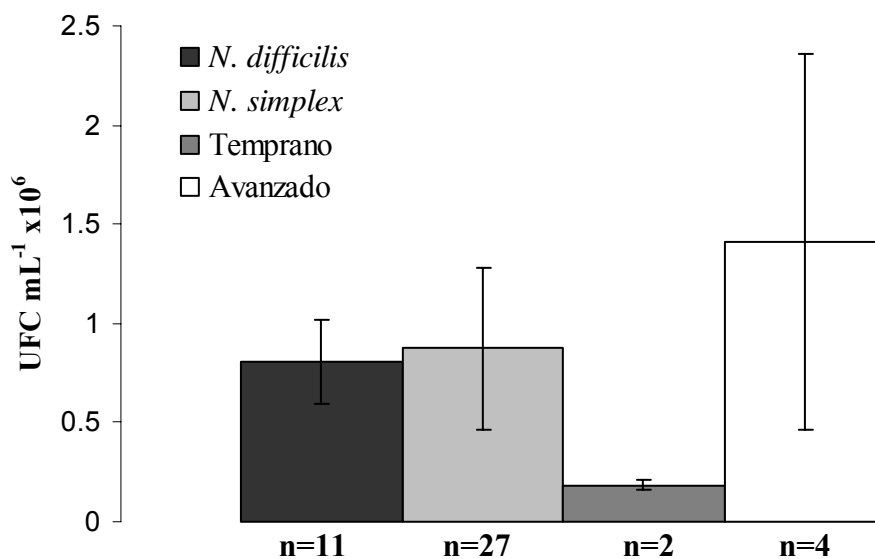


Figura. 5. Densidad bacteriana en el estómago de euphausiidos saludables de *Nyctiphanes simplex* y *Nematoscelsis difficilis* y en el tejido infectado de *N. simplex* en etapa temprana y avanzada del proceso. Las barras representan el error estandar de los datos.

3.3 Formación de filamentos.

Se observó que cuando los euphausiidos infectados mueren, los ciliados activos se liberan del interior del cadaver, usualmente cerca de la línea ecdisal. Al incubar los ciliados liberados a temperatura constante (16°C) en AMA ½× se observó la formación de filamentos transparentes de un material mucilaginoso en <12 h (Fig. 6). Se confirmó la presencia de bacterias asociadas a los filamentos tanto por cultivo como por la separación y secuenciación del 16S ARNr bacteriano a partir de ADN extraído de los filamentos. Sin embargo, en ninguna micrografía de microscopía electrónica de barrido de animales recolectados en enero 2007 se observó la presencia de formas bacterianas sobre los ciliados como había sido previamente observados en muestras recolectadas de Bahía Magdalena en 2004 y en el Golfo de California (Noviembre 2005) (Fig. 1).

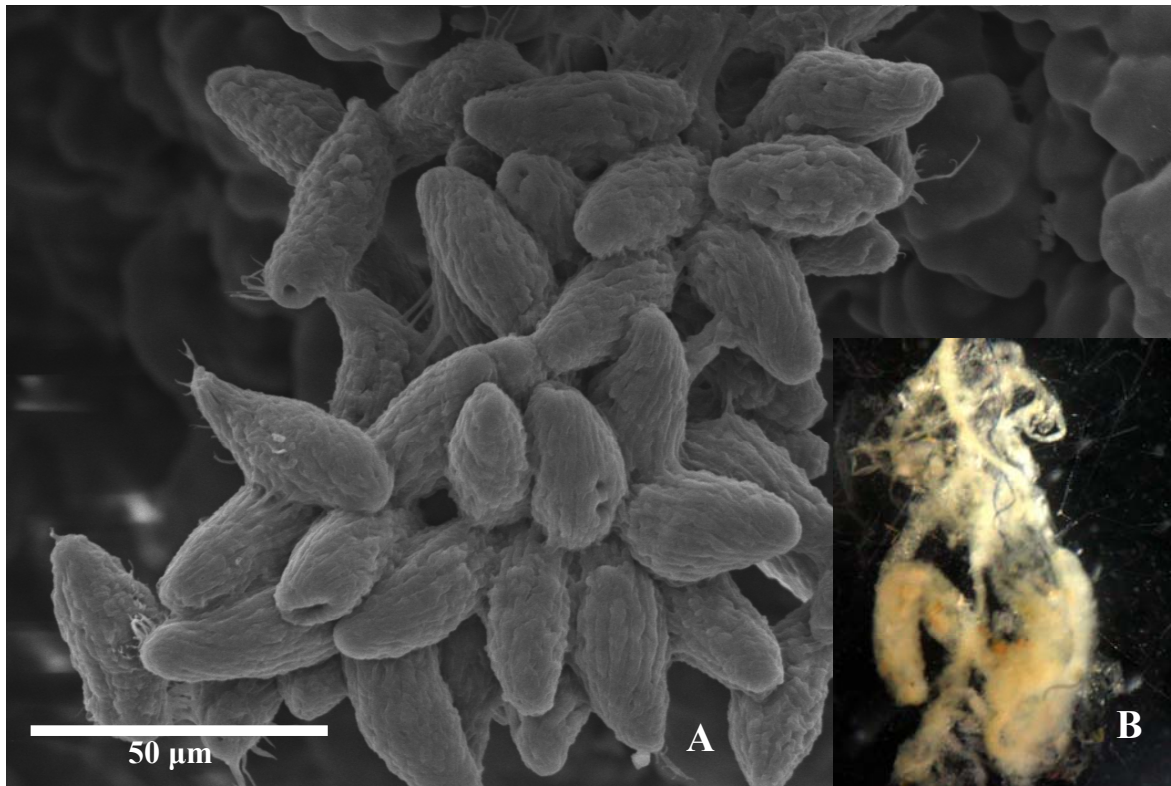


Figura. 6. Micrografía de SEM de los ciliados del género *Collinia* spp. (A), durante la fase de vida libre obtenidos pocos minutos después de la muerte de un eufáusido *Nyctiphanes simplex* en infección avanzada. La agregación en “racimo” de los protozoarios indica el comienzo del proceso de formación de filamentos (B).

3.4 Aislamiento e identificación de la microbiota cultivable.

Se obtuvieron 34 cepas axénicas de las cuales sólo 9 provienen de estómagos de organismos sanos. La mayor parte de las bacterias presentes en el tejido infectado pertenecen al grupo de γ -Proteobacteria (89%), mientras que en eufáusidos sanos se encontró una mayor riqueza de clases de bacterias cultivables. La mayoría de las cepas (62.5%) caracterizadas fueron bacilos que no presentaron afinidad al cristal violeta en su pared celular (Gram negativas).

Tabla IV. Morfología colonial, celular y afinidad al cristal violeta (tinción de Gram) de las colonias de bacterias secuenciadas, asignación de géneros y números de acceso a GenBank. La caracterización de la morfología colonial se realizó con base en los criterios de color, textura, margen y opacidad.

Cepa	Gram	Morfología Celular		Morfología colonial			Género mas similar al 16S ARNr	Calve de GenBank
		Color		Textura	Margen	Opacidad		
42Xb4	Negativo	Bacilos largos	Blanca	Grumosa-Viscosa	Continuo	Opaca	<i>Alteromonas</i>	EU090132
45Xa1-J	Negativo	Bacilos	Beige	Dura	Continuo	Muy Opaca	<i>Alteromonas</i>	EU440049
46Xb1	Negativo	Bacilos delgados	Beige	Dura	Continuo	Opaca	<i>Alteromonas</i>	EU440052
158Xa1	Positivo	Bacilos	Mamey	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>Dietzia</i>	EU090135
9X-22	Positivo	Diplococos	Amarilla	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>Kytococcus</i>	EU090136
131X-1a2	Negativo	Bacilos delgados	Blanca	Creмоса	Continuo	Transparente	<i>Marinobacter</i>	EU440063
45X-1b1-K	Negativo	Bacilos delgados	Beige	Dura	Continuo	Opaca	<i>Marinobacter</i>	EU440053
134Xa3	Negativo	Bacilos delgados	Blanca	Creмоса	Continuo	Semiopaca	<i>Marinobacter</i>	EU440042
68XB2	Positivo	Cocos	Amarilla	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>Microbacterium</i>	EU090133
42X-1a4	Negativo	Cocobacilos	Blanca-marrón	Creмоса	Continuo	translucida	<i>Photobacterium</i>	EU440051
42X-1b4	Negativo	Bacilos cortos y gruesos	Blanca	Grumosa	Continuo	translucida	<i>Photobacterium</i>	EU440047
42Xa2	Negativo	Cocobacilos	Blanca	Grumosa	Continuo	translucida	<i>Photobacterium</i>	EU440062
63X-1a3	Negativo	Bacilos cortos	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>Photobacterium</i>	EU440045
18Xa2Gr	Negativo	Bacilos a cocobacilos	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>Photobacterium</i>	EU090138
131X-1a3	Negativo	Cocobacilos	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU440056
63X-1b1	Negativo	Bacilos	Beige	Creмоса	Continuo	Muy Opaca	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU440054
10Xb1	Negativo	Bacilos	Marrón	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU090137
159Xa2	Negativo	Bacilos	Beige	Creмоса	Solido	Opaca	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU440060
46Xa2	Negativo	Bacilos cortos	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU440044
135Xa1	Negativo	Bacilos delgados	Blanca	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>Pseudoalteromonas</i>	EU440050
46Xb5	Negativo	Cocobacilos en filamentos	Marron	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>Ralstonia</i>	EU440055
45Xa2J	Negativo	Bacilos en filamento	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>Ralstonia</i>	EU440043
49Xb1	Variable	Coco a cocobacilos	Marron	Creмоса	Continuo	Semiopaca	<i>Roseobacter</i>	EU090129
54Xa1	Negativo	Bacilos delgados	Naranja	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>Shewanella</i>	EU090134
131Xb2	Positivo	Cocos	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>Staphylococcus</i>	EU090130
131Xb1	Negativo	Bacilos delgados	Blanca	Grumosa	Solido	Semiopaca	<i>Vibrio</i>	EU440057
42X-1b3	Negativo	Bacilos	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>Vibrio</i>	EU440058
42Xb2	Negativo	Cocobacilos	Beige	Viscosa	Continuo	translucida	<i>Vibrio</i>	EU440061
131Xa2	Negativo	Bacilos coriniformes	Beige	Creмоса-Grumosa	Solido	Opaca	<i>Vibrio</i>	EU440046
135Xb1	Negativo	Bacilos delgados	Blanca	Grumosa	Continuo	Semi-opaca	<i>Vibrio</i>	EU440048
135Xb2	Negativo	Bacilos	Blanca	Grumosa	Continuo	Semi-opaca	<i>Vibrio</i>	EU440059
69Xa1-Y1	Negativo	Bacilos delgados	Amarilla	Butirosa	Continuo	Semi-opaca	<i>Winogradskyella</i>	EU090131

3.5 Análisis de las comunidades bacterianas asociadas al proceso de parasitoidismo.

Se lograron analizar 8 comunidades bacterianas, por duplicado, a partir de las extracciones de ADN de eufáusidos preservados en etanol mediante la aproximación molecular (DGGE). De éstas tres se encuentran asociadas al tejido infectado en etapa temprana (ciliados en fase trofante) (T-43-2, T-138 y T-136), cuatro en etapa avanzada (ciliados en fase tomonte) (A-85, A-133, A-43 y A-130), una asociada a ciliados recién liberados (ciliados en fase tomito) (C-61) y una más asociada a los filamentos formados (ciliados en fase de tomito en proceso de enquistamiento y/o forontes) durante la incubación a bordo del B/O “El Puma” (Fig 7, 8 y 9).

A partir del análisis de la migración de bandas del DGGE se identificó un total de 46 OTUs de los cuales sólo 11 lograron identificarse, diez de ellos mediante la reamplificación y secuenciación de las bandas (Tabla 5) y uno de ellos por el porcentaje relativo de migración, similar a la cepa de *Pseudoalteromonas* 10Xb1. No se logró la reamplificación de los OTUs restantes por lo que fue imposible su secuenciación e identificación.

El índice de Shannon-Weiner calculado a partir del análisis de los OTUs separados mediante el DGGE muestra una mayor diversidad bacteriana asociada a la fase exoparasitoide (1.73 ± 0.46 bits/indi en ciliados tomitos de vida libre y 2.25 ± 0.01 bits/ind en forontes formando filamentos mucilaginosos) respecto a las fases endoparasitoide de infección por el ciliado (1.22 ± 0.47 bits/indis en la fase temprana y 0.55 ± 0.85 bits/ind, en la

fase avanzada, la riqueza no cultivable mostró un comportamiento muy similar a este índice de diversidad (Fig. 24).

La dominancia de OTUs no cultivados fue mayor en las fases de vida libre (ciliados liberados y filamentos de bacterias-ciliados), principalmente representada por OTUs no identificados. Sin embargo en ambas fases se logró identificar la presencia de OTUs similares a *Pseudoalteromonas* con abundancia (relativa) de 0.14 y 0.12 respectivamente (Fig. 24).



Figura. 7. Imágenes de los geles de electroforesis de gradiente desnaturalizante (DGGE). El gradiente de desnaturalización fue de 30% a 70% (últimos 157 mm). La electroforesis se realizó a 60° C, 100 V durante 16 h. Los carriles indican la fase de infección parasitoide (T= infección temprana, A= Infección Avanzada, C= ciliados de vida libre (transmisión) y F= filamentos de bacterias-ciliados) y número serial que identifica a la muestra. Se añadieron tres carriles estándar (M) en cada gel.

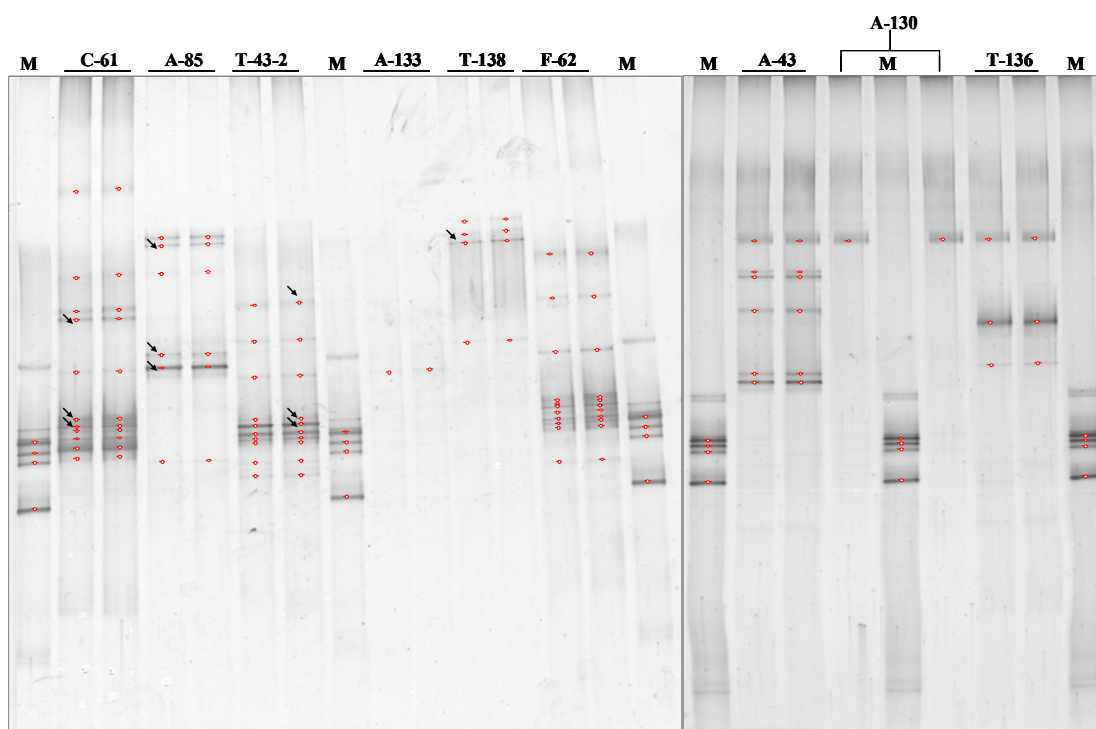


Figura 8. Localización de bandas (OTUs) analizadas a partir de la técnica DGGE utilizando el programa GelCompar II V 4.602. Los puntos rojos indican la posición de las bandas identificadas, las flechas señalan aquellas bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas.

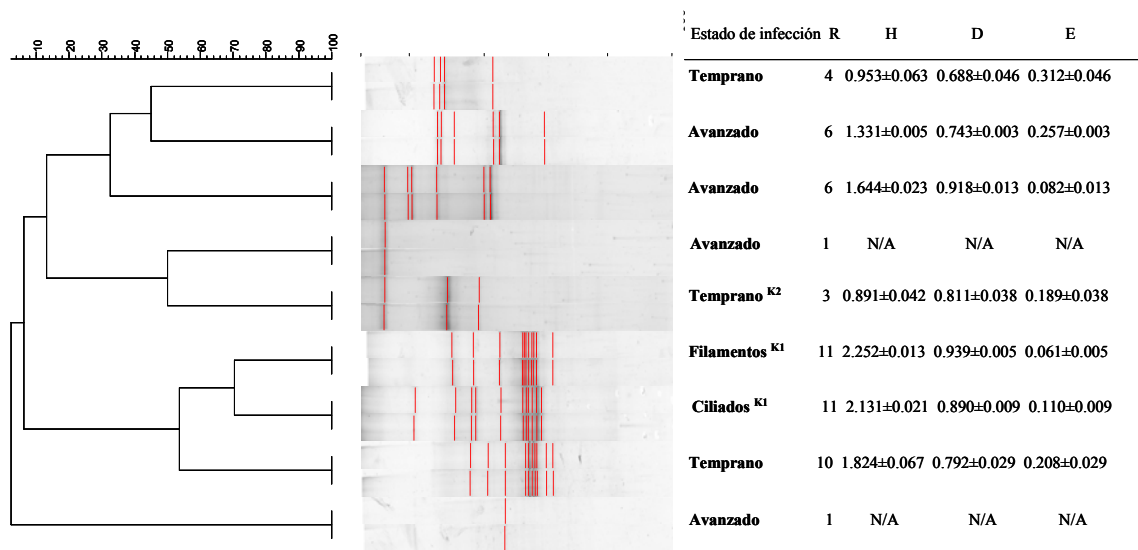


Figura. 9. Análisis de agrupamientos (clusters en inglés) a partir de los patrones de bandas detectados en el análisis de DGGE, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es un indicador de la abundancia relativa con los cuales se calcularon los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H), riqueza específica (R), dominancia (D) y equidad (E) para cada una de las comunidades bacterianas (bandas). Los superíndices K1 y K2 indican que el tejido analizado corresponde a un mismo individuo de eufáusido.

3.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias del 16S ARNr bacteriano.

Debido a que los eufáusidos analizados fueron en su mayoría organismos infectados en comparación con animales saludables (sesgo de muestreo), se observó una mayor riqueza cultivable (en taxa superiores) en el estómago de eufáusidos saludables que en tejido de eufáusidos infectados. En eufáusidos no infectados se detectaron bacterias de los grupos Bacteroidetes/Chlorobi, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria y Actinobacteria, mientras que los organismos infectados presentaron un alto número de géneros de γ -Proteobacteria y comparativamente menos representantes de los grupos Firmicutes, Bacteroidetes/Chlorobi, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria y ε -Proteobacteria (Tabla V).

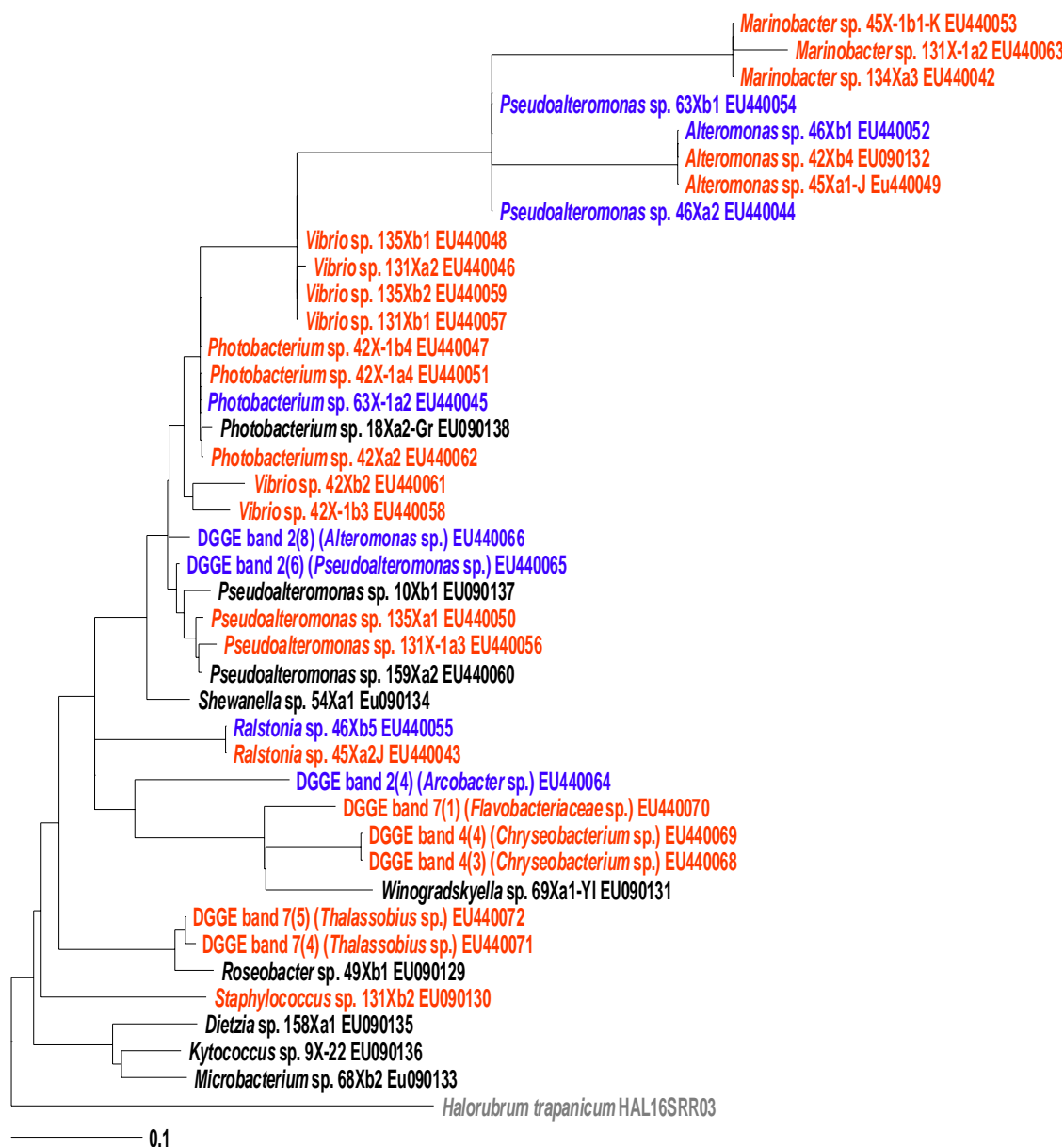


Figura. 10. Relación filogenética de bacterias y OTUs inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr obtenidas de cada condición del proceso de parasitoidismo, sanos (negro), fase endoparasítica (infección temprana y tardía, en rojo) y fase de vida libre (ciliados libres y filamentos, en azul) utilizando el modelo de cálculo de distancias Weighbour. Se utilizó el archeon *Halorubrum trapanicum* (en gris) como raíz del filograma. Cada ramificación muestra el género más parecido para cada secuencia, la cepa o número de banda del DGGE y la clave de acceso de Genbank. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

El único representante del grupo Firmicutes es la cepa 131Xb2 la cual esta emparentada en un 100% con la cepa tipo de *Staphylococcus aureus* (Fig. 11). Todas las secuencias representantes del grupo Bacteroidetes/Chlorobi pertenecen a la familia Flavobacteriaceae, dentro de estas la cepa 69Xa1-Y1 es idéntica (100% similitud) a la cepa tipo de *Winogradskyella poriferorum*. La primera banda de DGGE del carril 7 (T-43-2) estuvo menos emparentada (92%) con la bacteria *Lutibacter litoralis* y las bandas 3 y 4 del cuarto carril (A-85) agrupadas dentro junto con los géneros *Empedobacter*, *Sejongia* y *Chryseobacterium* (Fig. 12).

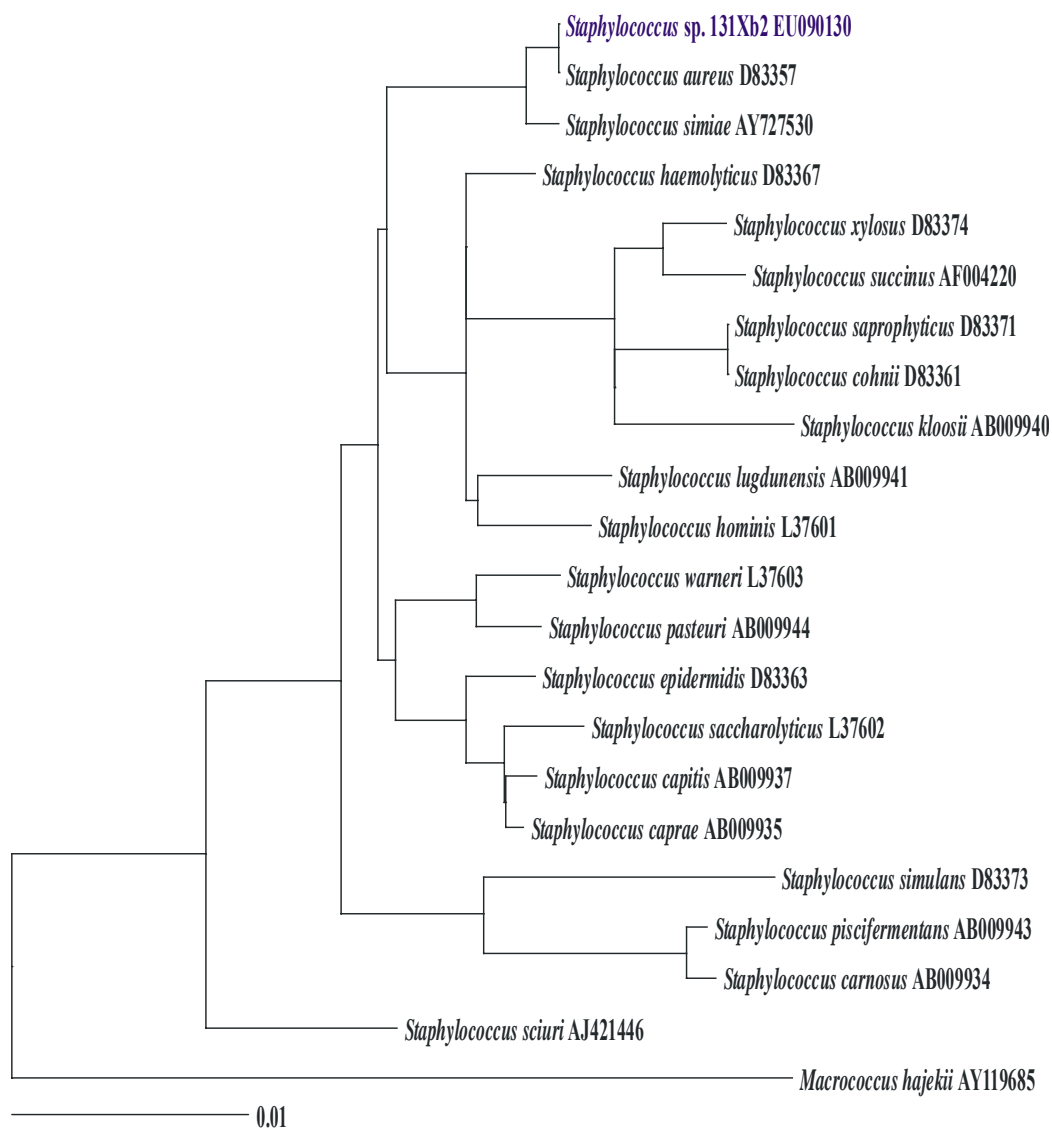


Figura. 11. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más similares a la cepa (en azul) clasificada como *Staphylococcus* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Macrocooccus hajekii* (Bacillales: Staphylococcaceae) como raíz del filograma. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

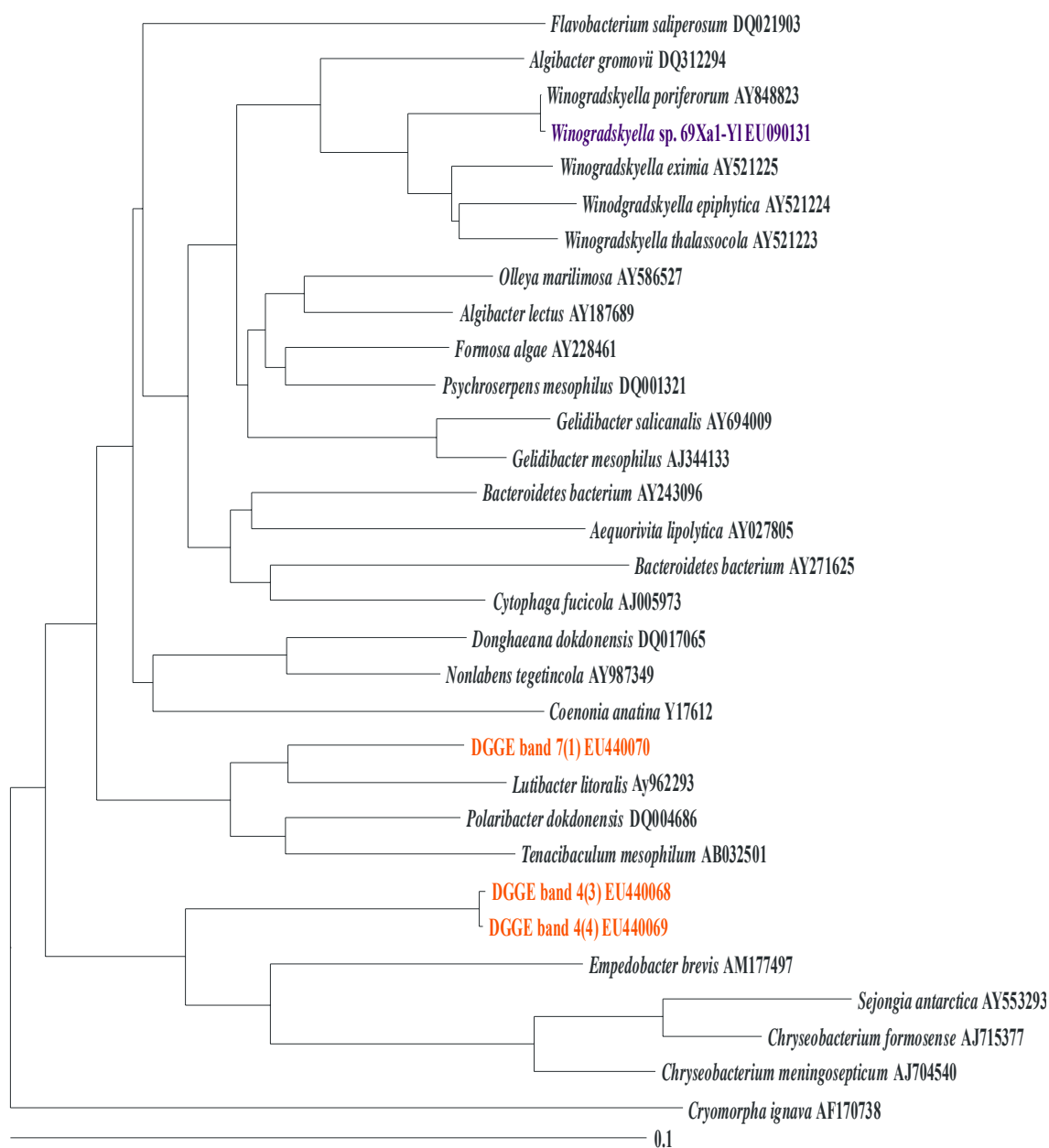


Figura. 12. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) y bandas de DGGE (en rojo) clasificadas dentro de la familia Flavobacteriaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Cryomorpha ignava* (Flavobacteriales: Cryomorphaceae) como referencia de la raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

La mayoría de las secuencias identificadas tanto de organismos sanos como infectados pertenecen al grupo de las Proteobacterias. Todas las representantes de la sub-división α -Proteobacteria pertenecen a la familia Rhodobacteriaceae (Fig. 13). La cepa 49Xb1 se encontró lejanamente emparentada (95%) con la bacteria *Roseovarius nubinhibens* mientras que las bandas de DGGE 3 y 4 del cuarto carril se encontraron lejanamente relacionadas con la bacteria *Empedobacter brevis* (88% y 87% de similitud, respectivamente). Las únicas cepas representantes de la sub-división β -proteobacteria fueron las cepas 45Xa2-J y 46Xb5 relacionadas con la bacteria *Ralstonia metallidurans* dentro de la familia Burkolderiaceae (Fig. 14).

Como representante de la sub-división ϵ -proteobacteria sólo se encontró una secuencia obtenida de la banda 4 del segundo carril de DGGE, agrupada dentro del cluster del género *Arcobacter* perteneciente a la familia Campylobacteriaceae (Fig. 15).

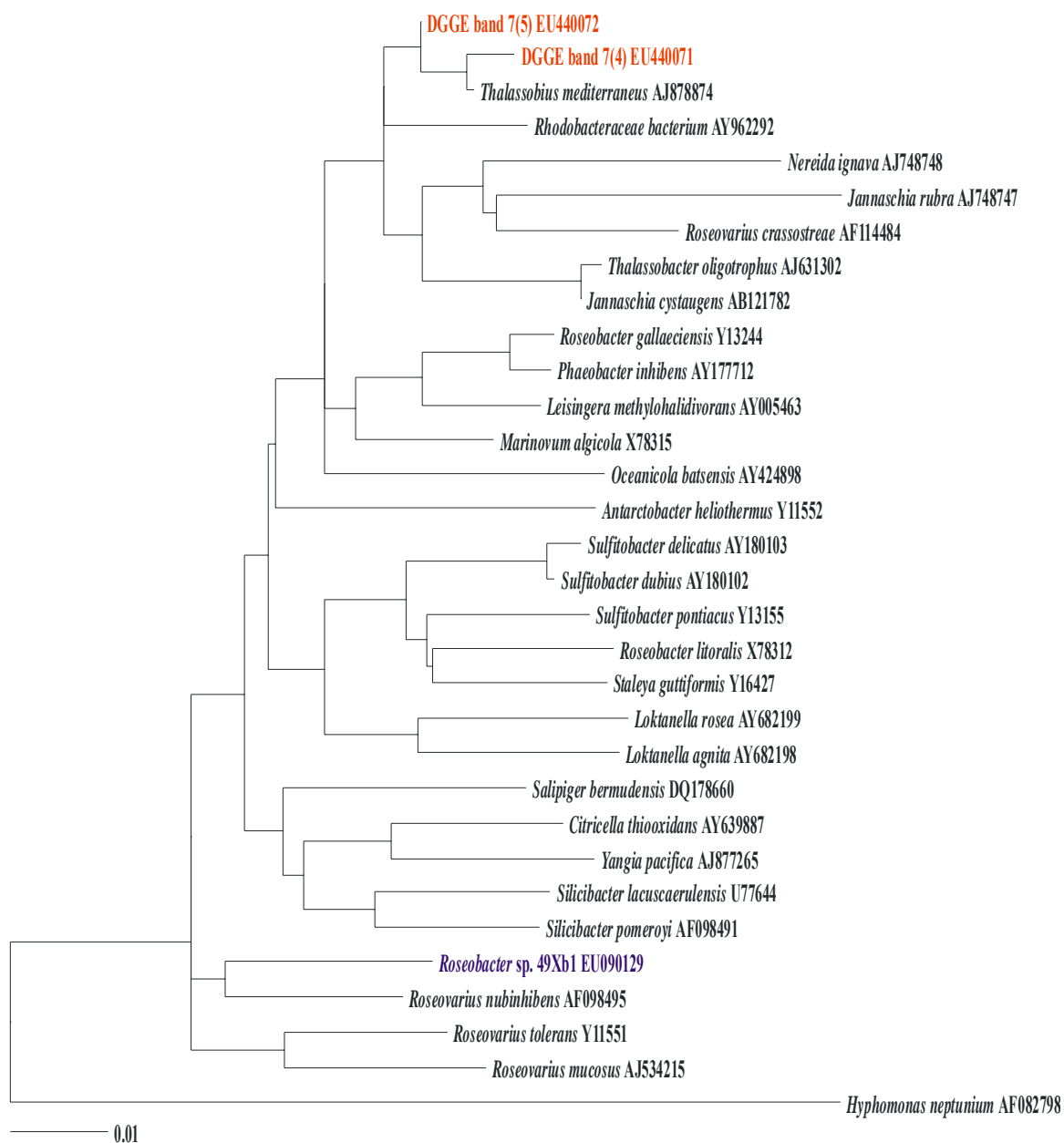


Figura. 13. Relación filogenética de bacterias inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) y bandas de DGGE (en rojo) clasificadas dentro de la familia Rhodobacteriaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Hyphomonas neptunium* (Rhodobacterales: Hyphomonadaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

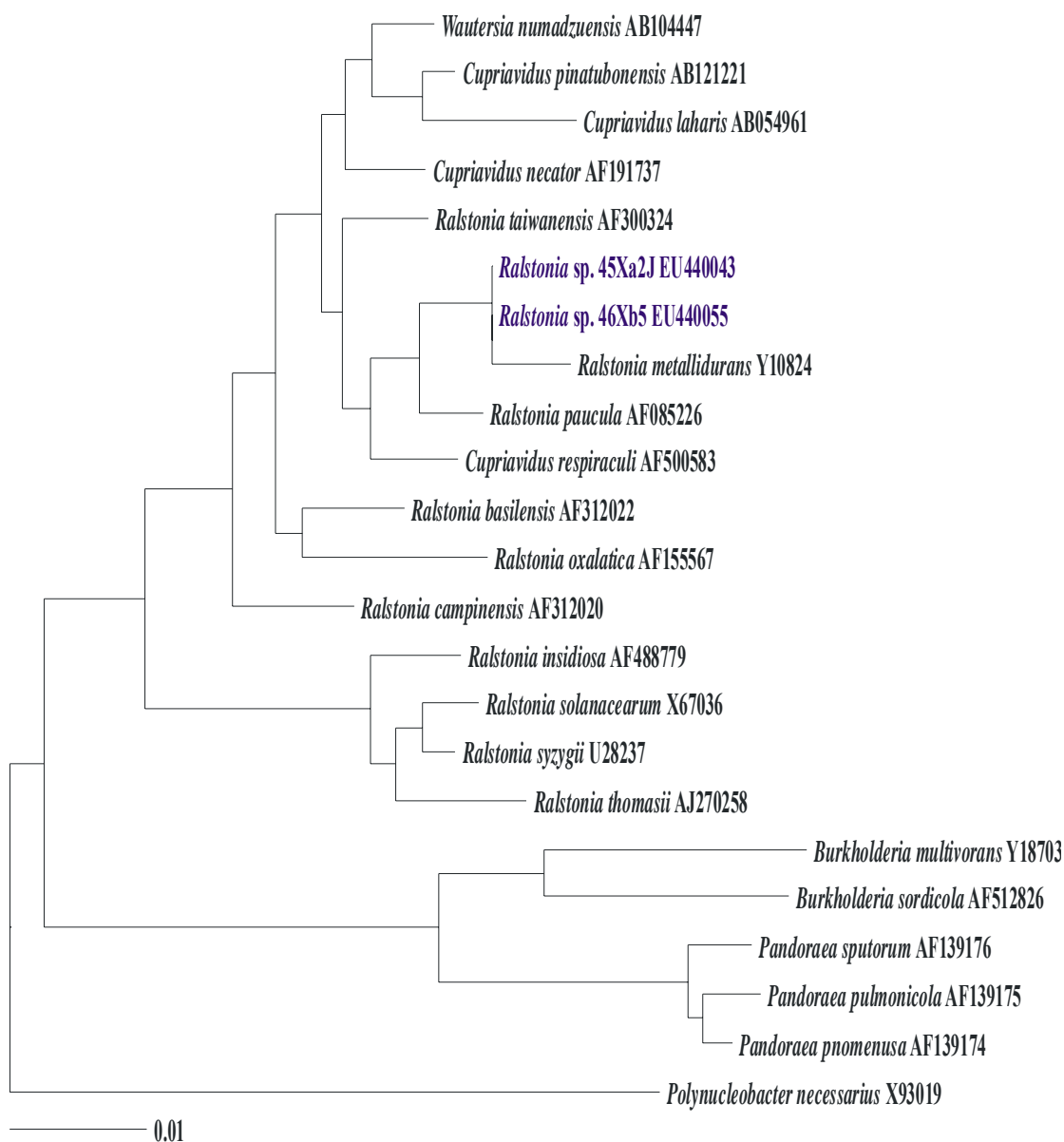


Figura. 14. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Ralstonia* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Polynucleobacter necessarius* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

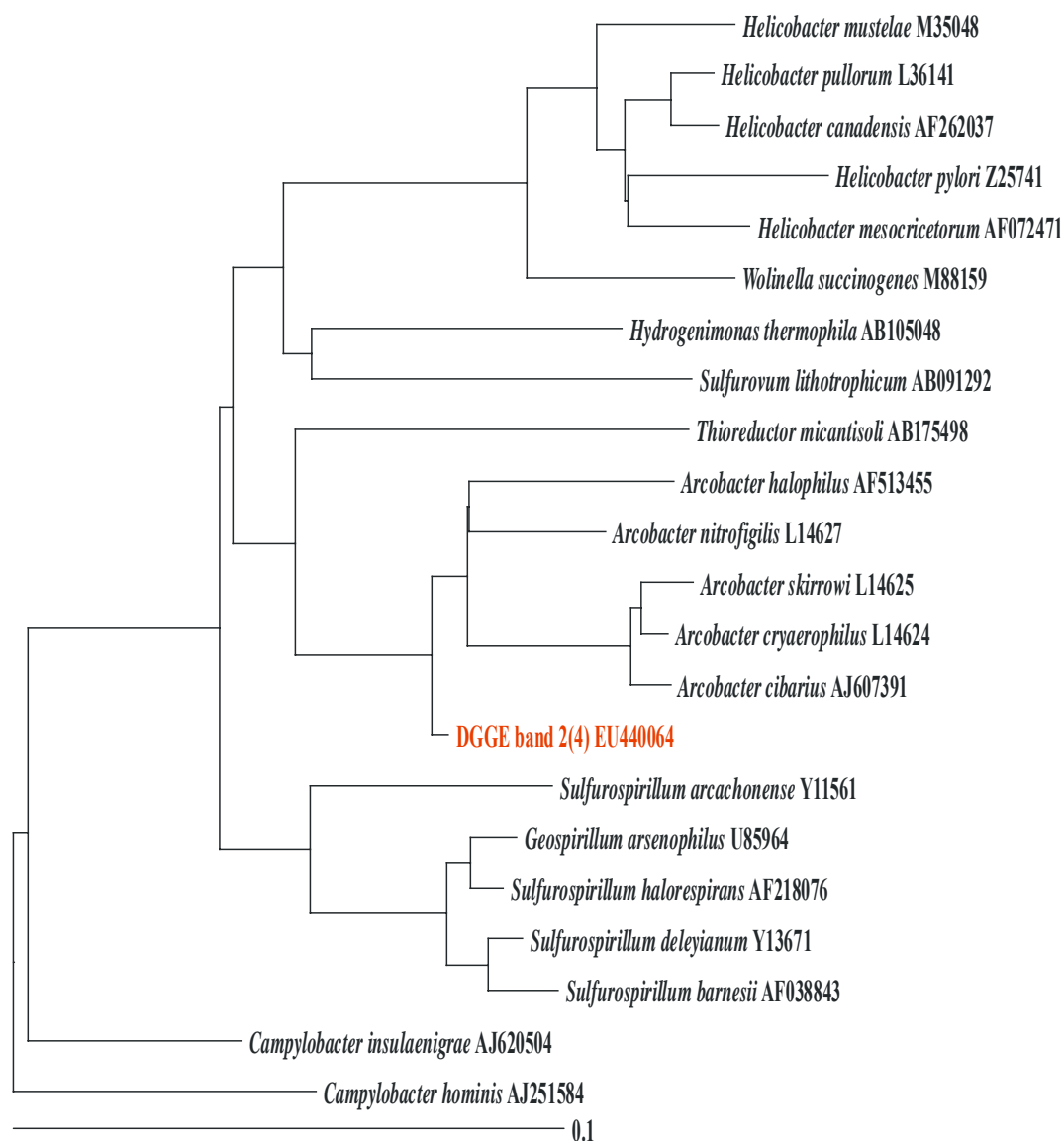


Figura. 15. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la banda de DGGE (en rojo) clasificada como *Arcobacter* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Campylobacter hominis* (Campylobacterales: Campylobacteraceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

La elevada presencia de proteobacterias es principalmente causada por la alta riqueza encontrada dentro de la sub-división γ -Proteobacteria. Del orden Alteromonadales se encontró una cepa representante de la familia Shewanellaceae (54Xa1) posiblemente

relacionada con la especie *Shewanella fidelia* (98% de similitud) (Fig. 16), 6 cepas de la familia Alteromonadaceae, de las cuales 3 de ellas pertenecen al género *Marinobacter* (Fig. 17; 134Xa3 y 45X-1b1-K relacionadas con *Marinobacter flavimaris*; 131X-1a2 relacionada a *M. aquaeolei* y *M. hydrocarbonoclasticus*). Las 3 cepas restantes pertenecen al género *Alteromonas*, 42Xb4, 45Xa1-J y 46Xb1 cercanas a *A. mcleodii* (99% de similitud) y la banda de DGGE 2(8) perteneciente al género *Alteromonas* pero lejana a cualquier cepa tipo previamente descrita y depositada en RDP II, siendo posiblemente una nueva especie (95% de similitud máxima en la base de datos de NCBI) (Fig. 18). Pseudoalteromonadaceae fue la tercera familia encontrada dentro de este orden Alteromonadales. Todas las secuencias de esta familia corresponden al género *Pseudoalteromonas*; las cepas con alta similitud (>99%) fueron 159Xa2 (*P. atlantica* y *P. espejiana*), 135Xa1 (*P. tetraodonis*) y 10Xb1 (*P. spongiae*) mientras que 131X-1a3 esta lejanamente relacionada a *P. carrageenovora* (98% similitud), las cepas 46Xa2 y 63x-1a3 forman un agrupamiento lejanamente relacionado a *P. mariniglutinosa*. La banda de DGGE 2(6) aunque pertenece al género *Pseudoalteromonas* no se encuentra relacionada con ninguna secuencia de las cepas tipo representantes hasta ahora registrada representando también una posible nueva especie (Fig. 19).

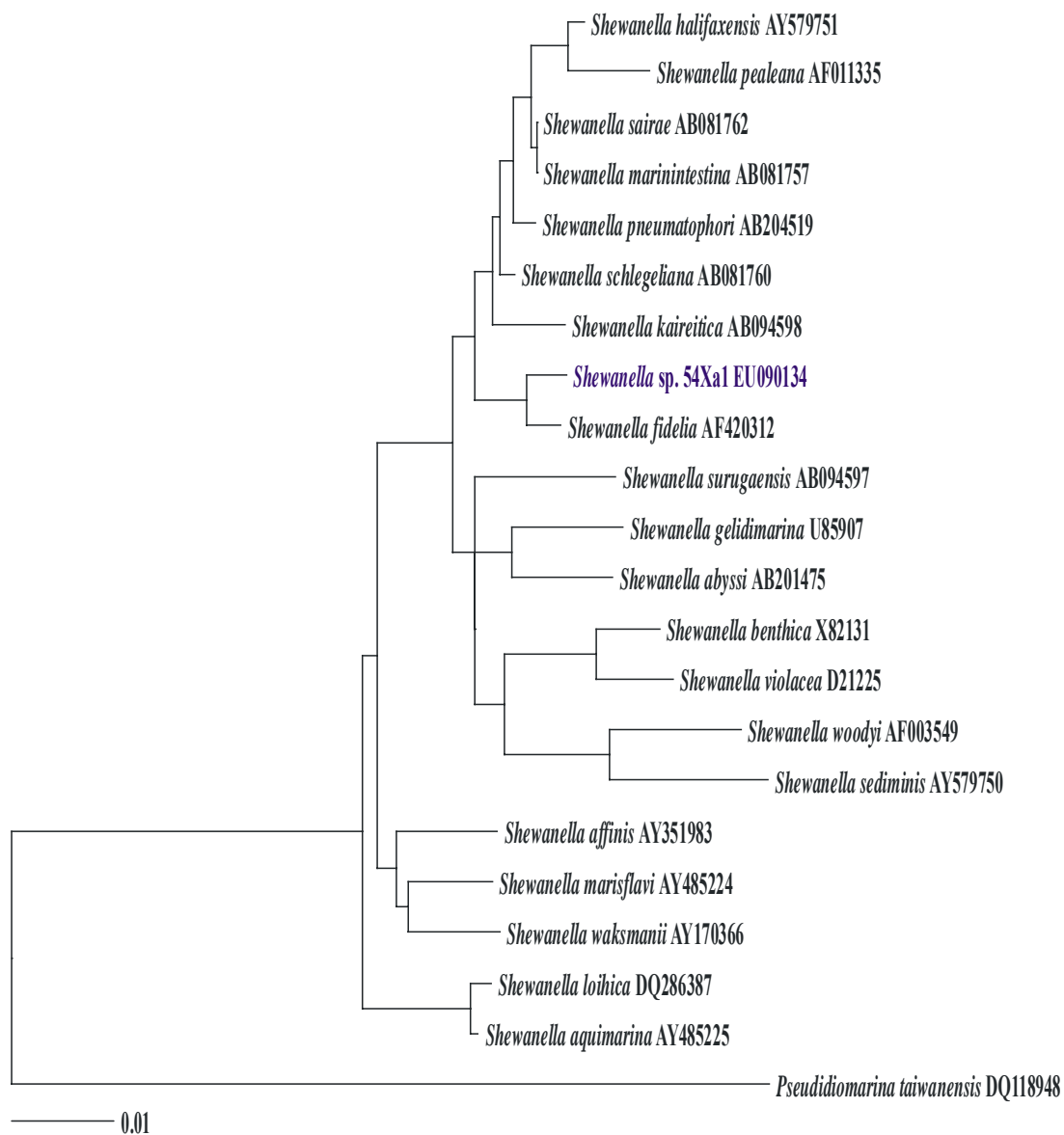


Figura. 16. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Shewanella* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Pseudidiomarina taiwanensis* (Alteromonadales: Idiomarinaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

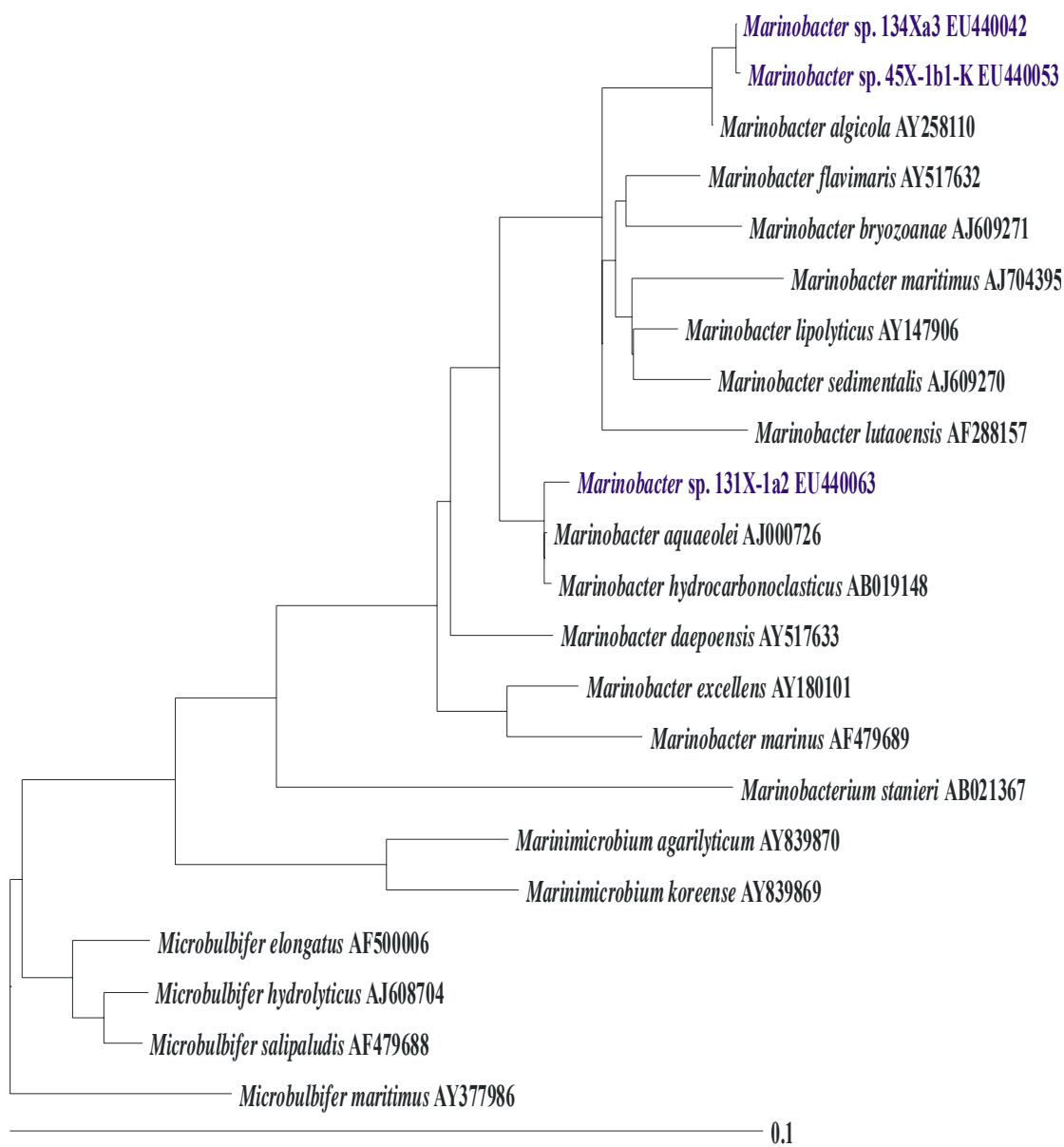


Figura. 17. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Marinobacter* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Microbulbifer maritimus* (Alteromonadales: Alteromonadaceae) como referencia de raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

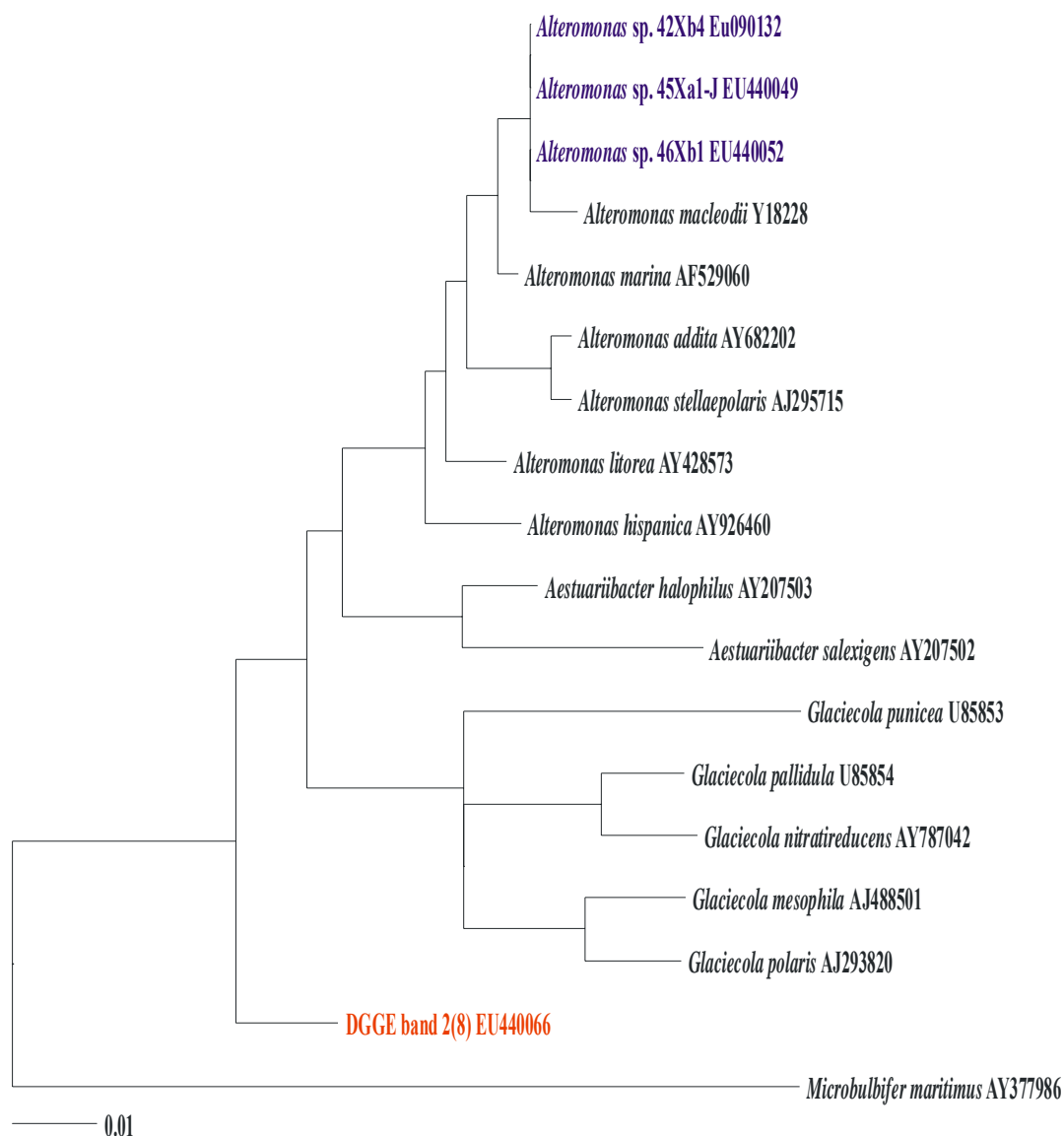


Figura. 18. Relación filogenética inferida a partir de las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) o bandas de DGGE (en rojo) clasificadas como *Alteromonas* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Microbulbifer maritimus* (γ -Proteobacteria: Alteromonadaeae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

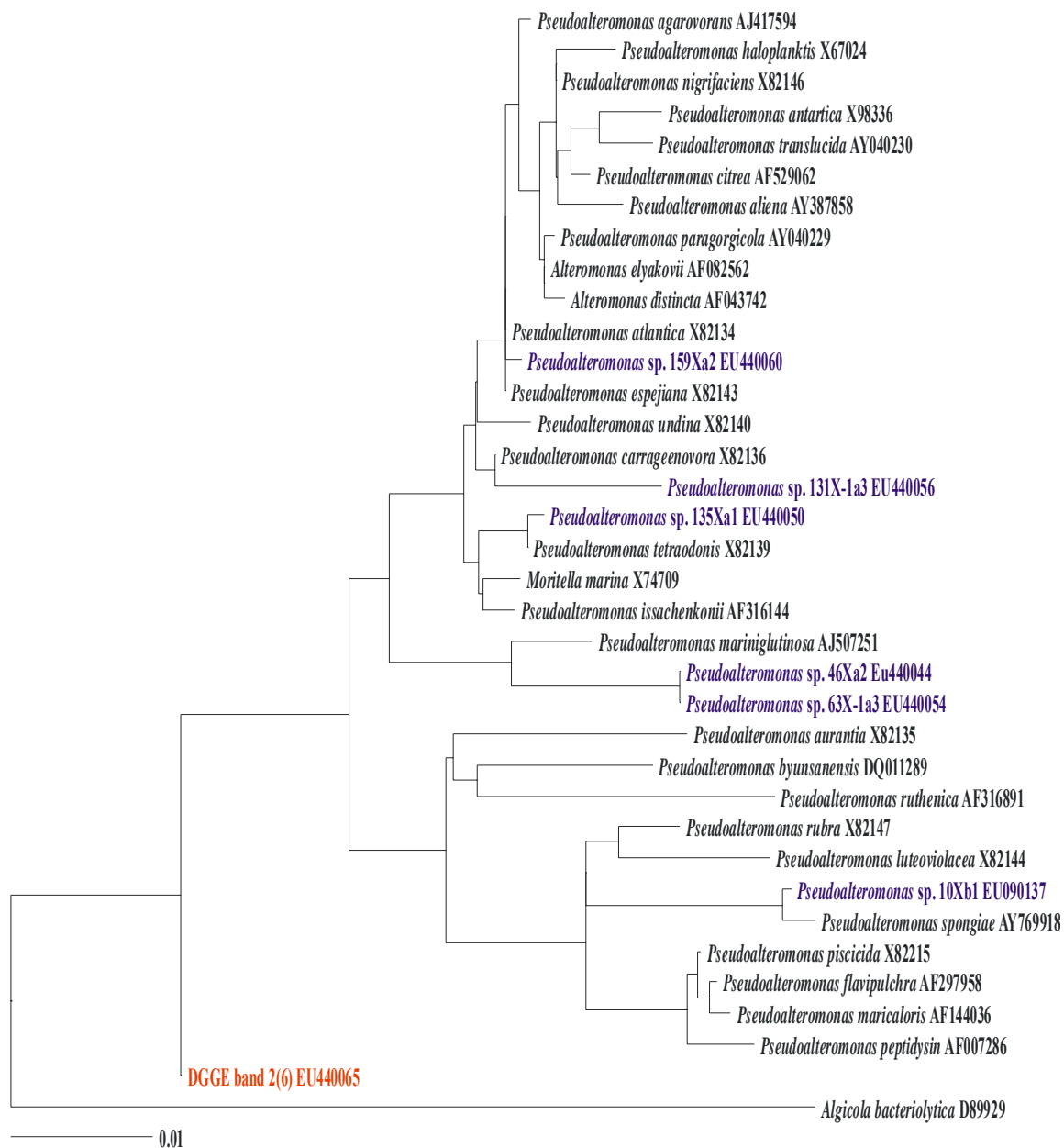


Figura 19. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas como *Pseudoalteromonas* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Algalia bacteriolytica* (Alteromonadales: Pseudoalteromonadaceae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

La familia Vibrionaceae fue el último grupo de γ -Proteobacterias identificadas, todas las cepas pertenecientes al género *Photobacterium* (18Xa2-Gr, 42X-1b4, 42X-1a4, 63X-1a2 y 42Xa2) en una agrupación al 98% con la formada por *P. phosphoreum* y *P. eurossenbergii*. La cepa 131Xa2 se encontró cercanamente relacionada a *Vibrio kanaloe* (99% similitud). La cepa 42X-1b3 estuvo lejanamente relacionada a *V. salmonicida*, las cepas 135Xb1, 135Xb2 y 131Xb1 a *V. cyclitrophicus*. La cepa 42Xb2 aunque pertenece a la familia Vibrionaceae, se encuentra fuera de cualquiera de los grupos formados por los géneros *Vibrio*, *Eneterovibrio* y *Photobacterium* por lo que posiblemente se trate de un nuevo género (Fig. 20).

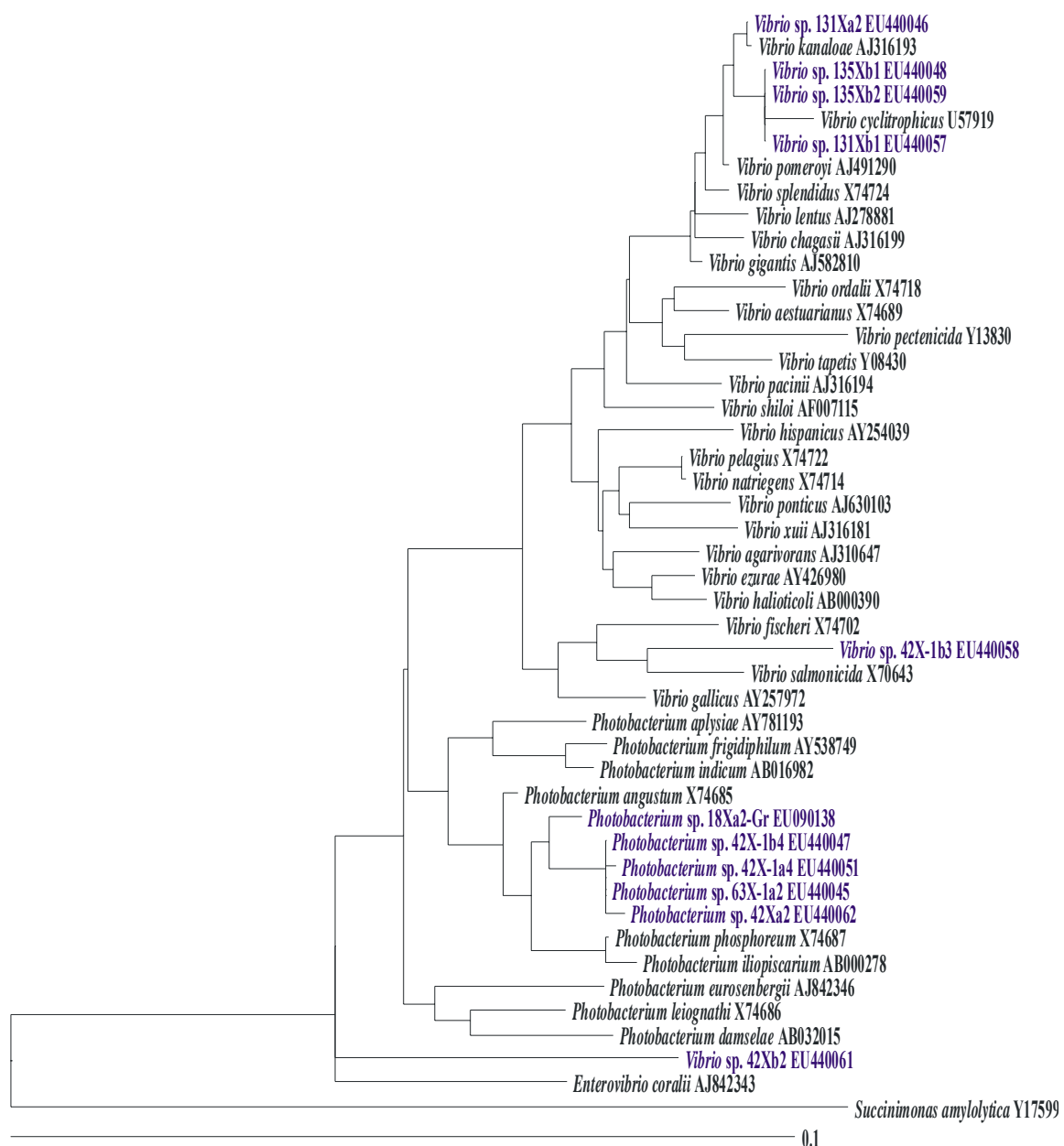


Figura 20. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a las cepas (en azul) clasificadas dentro de la familia Vibrionaceae en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Succinimonas amylolytica* (Alteromonadales: Succinivibrionaceae) como raíz. La barra de escala representa el promedio de sustituciones por sitio.

Todas las cepas aisladas pertenecientes al grupo de Actinobacteria pertenecieron a la clase de Actinomycetales. La cepa 68Xb2 estuvo agrupado por las bacterias *Microbacterium flavescens*, *M. hominis* y *M. trichotecenolyticum* (Fig. 21). La cepa 9X-22 es cercana a la bacteria *Kytococcus sedentarius* (99% de similitud) (Fig. 22) y la cepa 158Xa1 a la bacteria *Dietzia cinnamea* (99% de similitud) (Fig. 23)

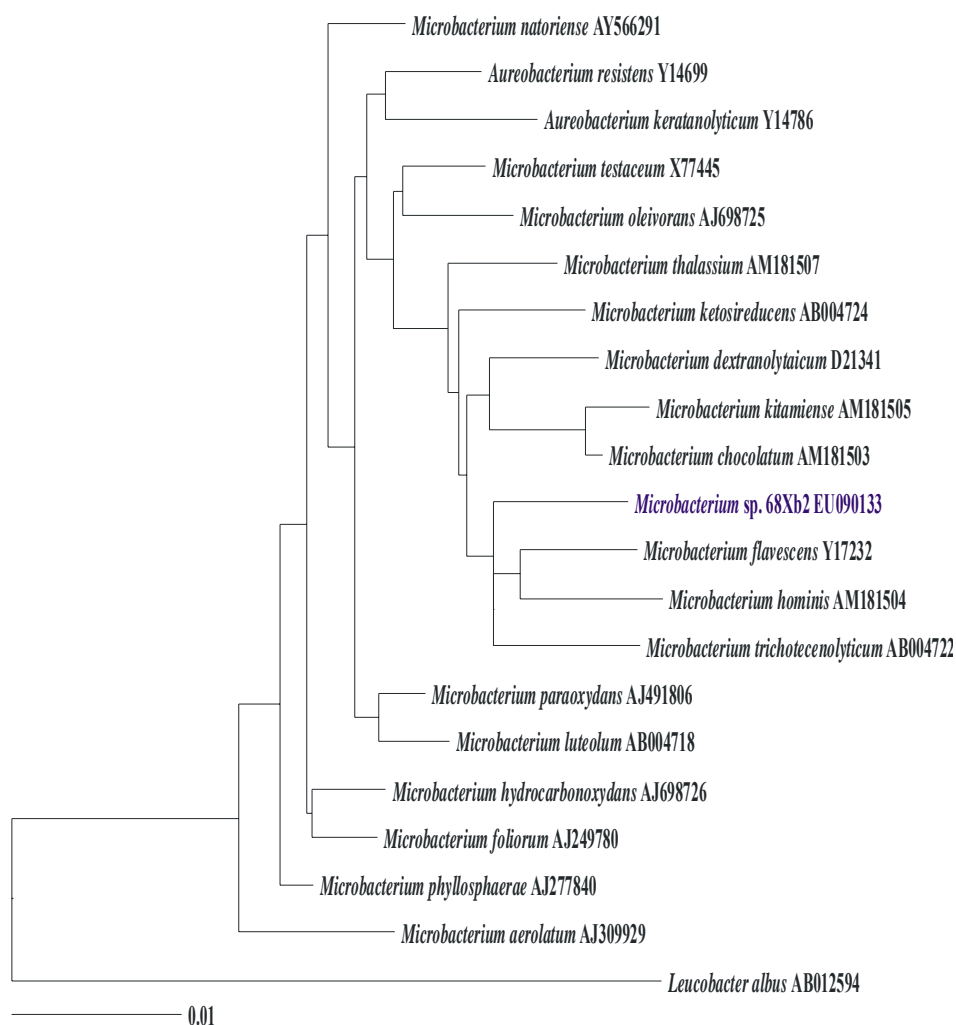


Figura. 21. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Microbacterium* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Leucobacter albus* (Micrococccineae: Microbacteriaceae) como raíz.

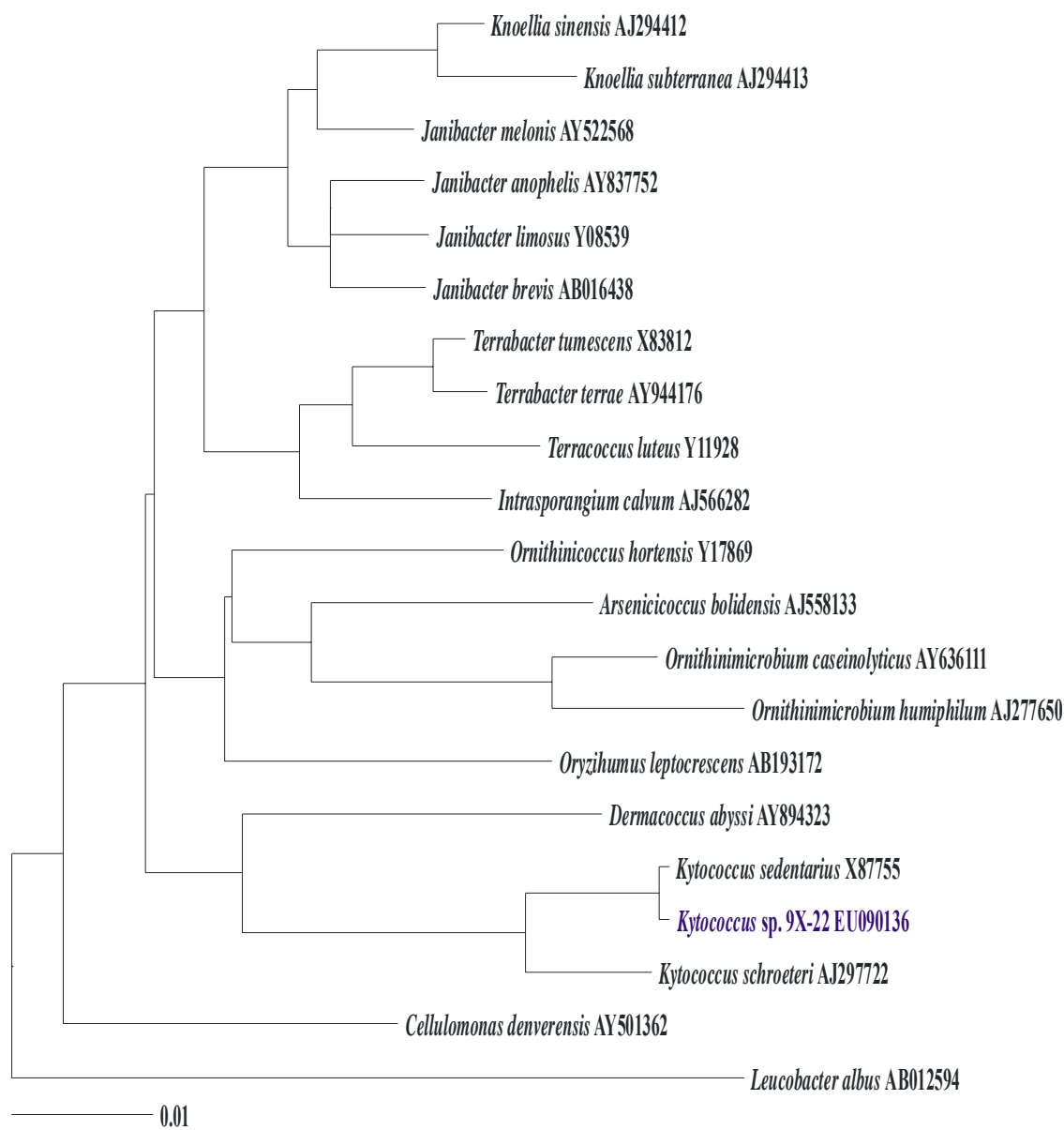


Figura 22. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Kytococcus* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Leucobacter albus* (Micrococcineae: Microbacteriaceae) como raíz.

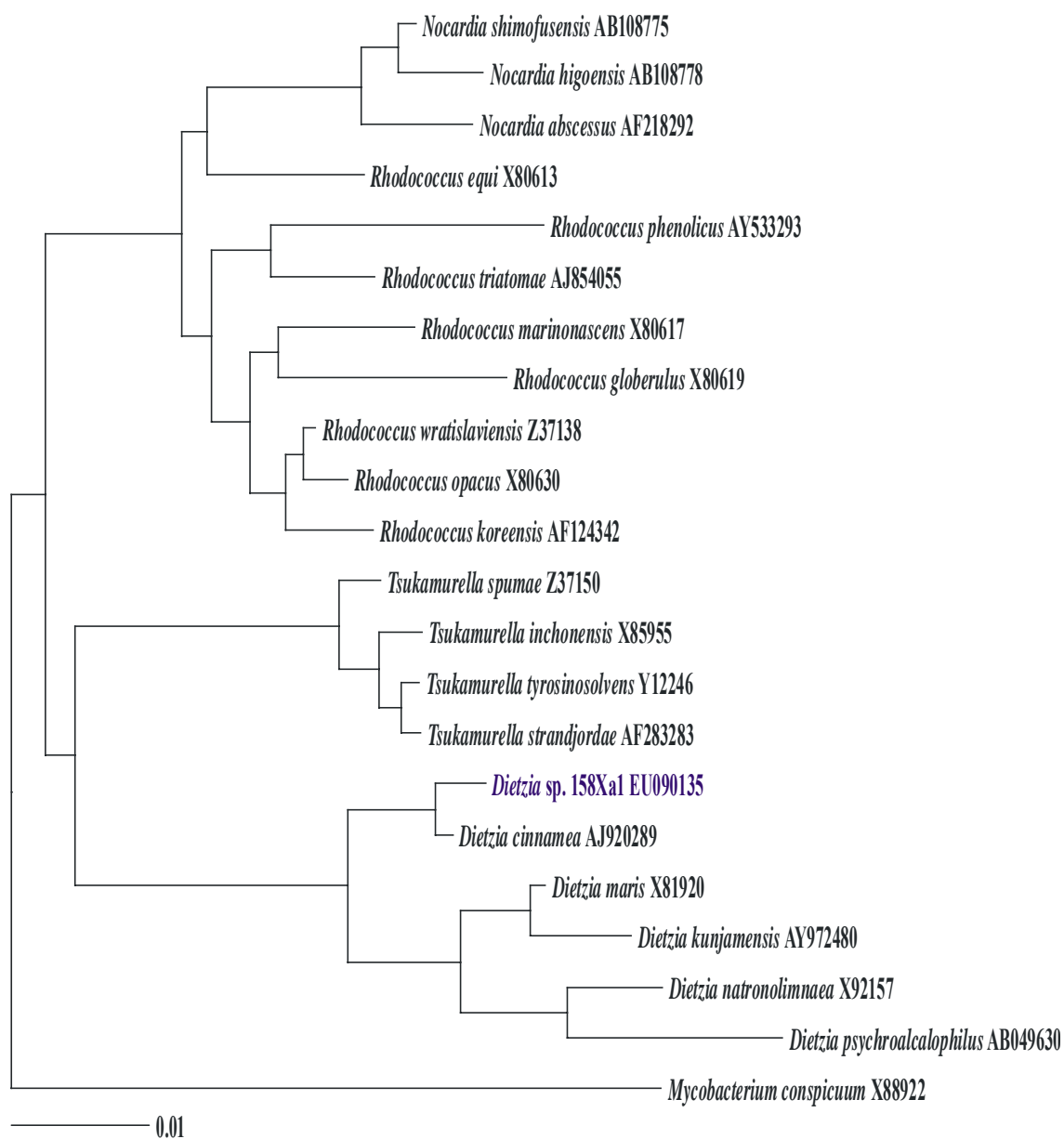


Figura. 23. Relación filogenética entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas tipo más cercanas a la cepa (en azul) clasificada como *Dietzia* en este estudio. Se utilizó la secuencia de *Mycobacterium conspicuum* (Corynebacterineae: Mycobacteriaceae) como raíz.

Tabla V. Secuencias del 16S ARNr de las cepas y bandas de DGGE aisladas de estómagos y tejido infectado de eufáusidos en el Golfo de California. Se muestran los organismos más cercanos junto a su porcentaje de similitud, la cepa (o banda de DGGE), la longitud en pares de bases y la clave de acceso a Genbank.

Cepa/banda DGGE	Clave de Acceso GenBank	Longitud (pb)	Secuencia mas parecida	Identidad %
Estómago sano				
158Xa1	EU090135	1421	<i>Dietzia</i> sp. E1	99%
9X-22	EU090136	1423	<i>Kytococcus sedentarius</i>	99%
68Xb2	EU090133 Nd	1424	<i>Microbacterium</i> sp. ASD	99%
18Xa2-Gr	EU090138	1457	<i>Photobacterium leiognathi</i> LN101	99%
10Xb1	EU090137	1446	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. JL1003	99%
159Xa2	EU440060 ^M	846	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20189	99%
49Xb1	EU090129 ^M	1371	<i>Roseobacter</i> sp. 812	99%
54Xa1	EU090134	1457	<i>Shewanella fidelia</i> KMM3589	99%
69Xa1-Y1	EU090131 Nd	1415	<i>Winogradskyella poriferorum</i> UST030701-295	100%
Infección temprana (hemocele)				
DGGE banda 11(3)	EU440073	540	<i>Coscinodiscus radiatus</i> p148 (chloroplast)	99%
DGGE banda 7(1)	EU440070	557	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. TAA-10-10	95%
134Xa3	EU440042 ^{K1}	838	<i>Marinobacter</i> sp. MN-7	100%
DGGE banda 7(4)	EU440071	540	Uncultured <i>a-proteobacterium</i> PENS_39	99%
DGGE banda 7(6)	EU440072	551	Uncultured bacterium BB3S16S-12	99%
Infección temprana (estómago)				
135Xa1	EU440050 ^{K1}	845	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20106	99%
135Xb1	EU440048 ^{K1}	847	<i>Vibrio</i> sp.A4 isolate-3	100%
135Xb2	EU440059 ^{K1}	838	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG21359	100%
Infección avanzada (hemocele)				
45Xa1-J	EU440049 ^{K2}	1441	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6	99%
DGGE banda 4(3)	EU440068	560	Uncultured bacterium RL185_aaj70e04	90%
DGGE banda 4(4)	EU440069	571	Uncultured bacterium RL185_aaj70e04	90%
45X-1b1-K	EU440053 ^{K2}	843	<i>Marinobacter</i> sp.MN-7	99%
131X-1a2	EU440063	845	<i>Marinobacter aquaeolei</i> OC-8	100%
131X-1a3	EU440056	841	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 23	100%
45Xa2J	EU440043 ^{K2}	1434	<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	100%
131Xb2	EU090130	1455	<i>Staphylococcus aureus</i> Mu3 <i>Thalassionema nitzschioides</i> p111	100%
DGGE banda 4(2)	EU440067	541	(chloroplast)	94%
131Xa2	EU440046	845	<i>Vibrio lentus</i> Sat201	99%
131Xb1	EU440057	846	<i>Vibrio</i> sp.A4 isolate-3	100%
Infección avanzada (estómago)				
42Xb4	EU090132 ^{K2}	1441	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6	99%
42X-1b4	EU440047 ^{K2}	847	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B	99%
42X-1a4	EU440051 ^{K2}	837	<i>Photobacterium</i> sp. OSar2	99%
42Xa2	EU440062 ^{K2}	847	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B	99%
42X-1b3	EU440058 ^{K2}	839	<i>Vibrio fischeri</i> PP3	99%
42Xb2	EU440061 ^{K2}	845	<i>Vibrio</i> sp. FALF182	96%

Ciliados de vida libre				
DGGE banda 2(8)	EU440066 ^{K2}	466	<i>Alteromonas</i> sp. NJSX33	95%
46Xb1	EU440052 ^{K2}	1448	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6	99%
DGGE banda 2(4)	EU440064 ^{K2}	541	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp. 15	99%
DGGE banda 2(6)	EU440065 ^{K2}	439	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20062	96%
46Xa2	EU440044 ^{K2}	837	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. RW19	100%
46Xb5	EU440055 ^{K2}	1434	<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	99%
Filamentos				
63X-1a2	EU440045 ^{K2}	845	<i>Photobacterium leiognathi</i> SN2B	99%
63Xb1	EU440054 ^{K2}	840	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. RW19	100%

3.7 Modelo conceptual de la sucesión bacteriana a través del proceso de infección.

Considerando la frecuencia relativa de las cepas bacterianas aisladas de estómago de eufáusidos saludables como la microbiota “típica” y asumiendo que la bacterias presentes en el tejido infectado con histofagia avanzada por parte del ciliado son similares a las encontradas en el estómago del crustáceo, se observan una serie de cambios temporales en la comunidad bacteriana (eventos de sucesión) entre la microbiota “común” de eufáusidos saludables y cada una de las fases del proceso de infección parasitoide.

Los siete géneros que se lograron identificar a partir de aislamientos bacterianos del estómago de *N. simplex* saludable muestran una amplia diversidad filogenética representando a Bacteroidetes/Chlorobi, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria y Actinobacteria. Comparativamente es esta comunidad la que muestra la mayor riqueza cultivable (figura 24).

Al comenzar el proceso de parasitoidismo la riqueza bacteriana cultivable (tanto del estómago como del haemocele infectado) disminuyó considerablemente y sólo se pudieron recuperar cepas de γ -Proteobacterias. En la etapa temprana, se reconocen más OTUs no cultivados que en la etapa de infección avanzada, logrando identificar al menos EU440068,

EU440066, EU440072, EU440073 y EU440071. El análisis de la comunidad no cultivada mostró que ningún OTU dominaba al inicio de la infección (figura 24).

La comunidad bacteriana cultivable aumentó en riqueza al avanzar el proceso de endoparasitoidismo en comparación con la infección temprana. Además de γ -Proteobacterias se detectó la presencia de *Staphylococcus* sp. (Firmicutes) y *Ralstonia* spp (β -Proteobacteria). Sin embargo, fue en la fase avanzada donde se encontró la menor riqueza de la fracción bacteriana no cultivada cuando se registró el mayor índice de dominancia. La mayoría de los OTUs en la infección avanzada presentaron bajas densidades, siendo EU440069 y dos OTU aún no identificados (UOTU 1 y UOTU 21) los componentes bacterianos más abundantes (figura 24).

Al consumir completamente el tejido del eufáusido los ciliados salen del exoesqueleto hacia el medio marino. En esta etapa es cuando la riqueza de géneros cultivados vuelve a decrecer encontrándose sólo *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* (γ -Proteobacterias) y *Ralstonia*. Inversamente la riqueza de OTUs no cultivables aumenta y el índice de dominancia se reduce. Los pronunciados cambios en reducción de diversidad y abundancia de bacterias de estómago a hemocele y de hemocele a el medio marino posiblemente indiquen procesos de selección periódica en la cual las condiciones cambiantes favorecen solamente algunos ecotipos bacterianos, y aparentemente reduciendo a densidades indetectables el resto de los ecotipos.

La última etapa identificada durante el ciclo de vida de los ciliados *Collinia*, la formación de filamentos mucilaginosos de bacterias-ciliados se caracterizó por poseer la menor riqueza de géneros cultivables (sólo *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium*). Sin

embargo, en esta etapa se detectó el mayor número de OTUs no cultibables dentro de los cuales se logró identificar una banda con igual patrón de migración que *Pseudoalteromonas* 10Xb1 (EU090137) utilizada como marcador en todos los análisis por DGGEs.

En todas las comunidades bacterianas se observó la presencia de *Pseudoalteromonas* y presumiblemente a *Photobacterium* debido a que fueron aisladas cepas de *Photobacterium* del estómago de individuos sanos, en el hemocele de individuos con infección avanzada y en los filamentos mucilaginosos. En la sucesión de la etapa de endoparasitoidismo (de infección temprana e infección avanzada) se observó la presencia de *Marinobacter*, *Vibrio* y EU440065 (probable *Pseudoalteromonas*) además de 2 OTUs no identificados (UOTU 25 y UOTU 1). Tanto en la comunidad bacteriana detectada durante la infección avanzada como en aquella asociada a los ciliados libres se logró aislar a bacterias de los géneros *Ralstonia* y *Alteromonas*.

El último evento de sucesión que se detectó fue el cambio de la comunidad bacteriana de ciliados libres a filamentos, estas comunidades compartieron dos OTUs no identificados (UOTU 34 y UOTU 38).

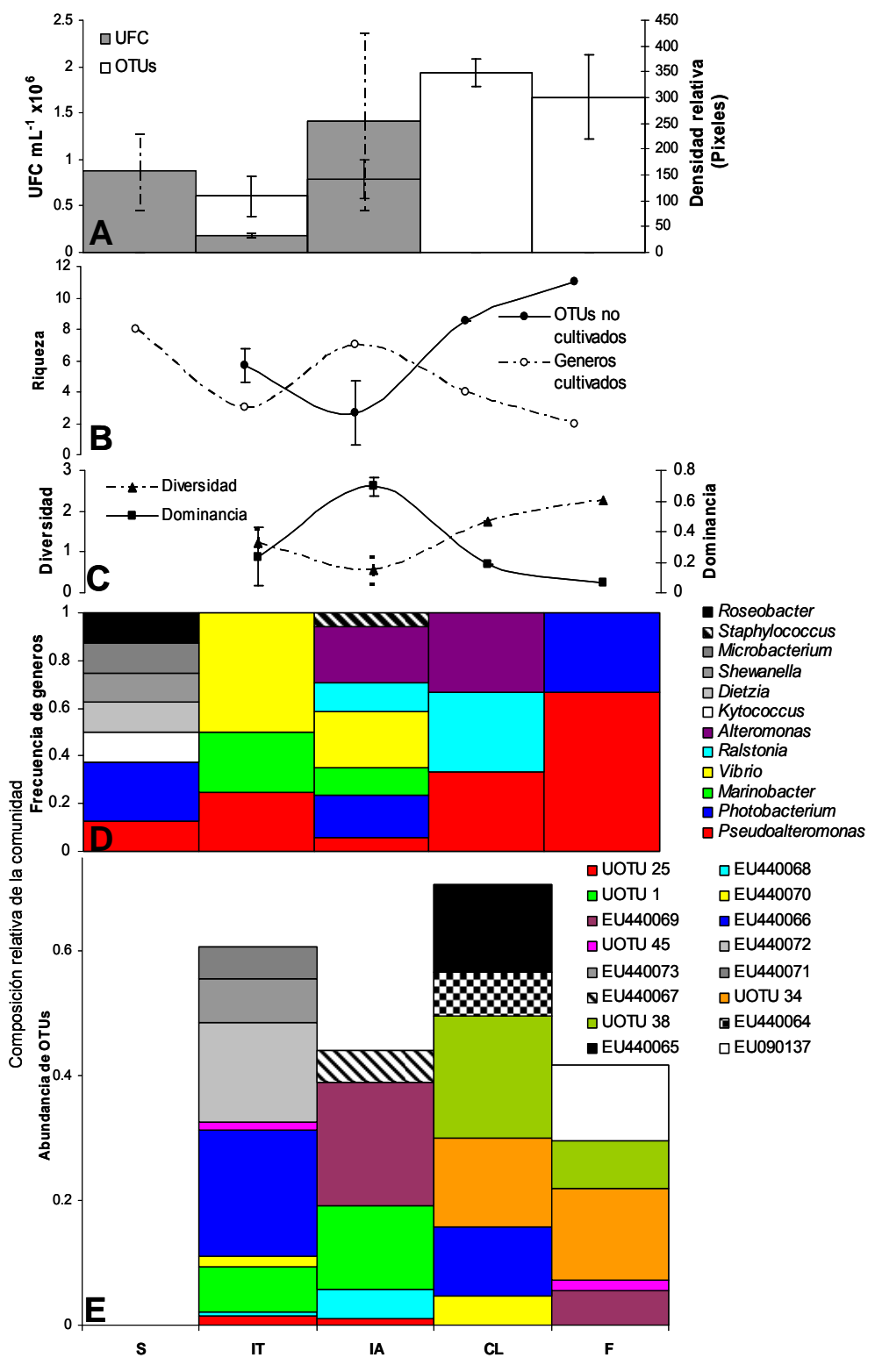


Figura 24. Modelo conceptual del cambio de la comunidad microbiana durante el proceso de parasitoidismo desde el estómago de eufáusidos sanos hasta la formación de filamentos de ciliados-bacterias. A) carga bacteriana estimada mediante UFC (dependiente de cultivo) y el total de la densidad relativa en píxeles de las bandas de DGGE (independiente de cultivo). B y C) estimadores de la comunidad, D y E) componentes de la comunidad bacteriana UOTU= OTU no identificado. S= Sano, IT= infección temprana IA= infección avanzada CL= ciliados de vida libre F= filamentos mucilaginosos.

4. DISCUSIÓN.

Desde hace tres décadas ha sido estudiada la comunidad bacteriana del sistema digestivo de especies polares y templadas de krill (y asociada al individuos completos) con el objeto de identificar los componentes bacterianos que mayoritariamente participan en el proceso de descomposición de los cadáveres. Recientemente se descubrió que el parasitoidismo por ciliados apostomatidos del género *Collinia* spp. es una de las múltiples fuentes de mortalidad natural del krill en el Pacífico Nororiental (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003; 2006). El presente estudio describe, por primera vez y con ayuda de herramientas de la biología molecular, la estructura de la comunidad bacteriana en eufáusidos de afinidad subtropical y tropical, registrando, hasta el momento la mayor riqueza bacteriana asociada a krill saludable e infectado en el mundo. Se discutirá la conexión existente entre la microbiota asociada dos especies de krill saludable del Golfo de California y de otros ecosistemas templados y polares del mundo así como la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los ciliados parasitoides. Es decir, las comparaciones de las características microbiológicas entre eufáusidos sanos de distribución polar, templada y subtropical, seguido de una evaluación de la comunidad bacteriana en cada fase del proceso

parasitoide. Al final de la discusión se argumentará la posición filogenética de las bacterias identificadas en este estudio.

4.1 Distribución de los organismos parasitados

A partir de seis cruceros oceanográficos realizados en Bahía Magdalena (Marzo, Julio y Diciembre 2004) y en el Golfo de California (Noviembre 2005, Enero y Julio 2007) se obtuvieron 167 estaciones oceanográficas en las cuales se recolectaron muestras de zooplancton en busca de eufáusidos infectados inmediatamente después de ser obtenidas (plancton aún vivo). Existieron muchas más muestras de plancton (188) en las cuales no se inspeccionó a los eufáusidos *in vivo* no fue es posible conocer si en ellas existían eufausidos parasitados, por lo tanto estas muestras no fueron consideradas. La prevalencia de *N. simplex* infectados fue de 13.3% (n = 83) en Bahía Magdalena y 8.3% (n = 84) en el Golfo de California. La abundancia de *N. simplex* adultos en estaciones oceanográficas (red Bongo 500 μm de luz de malla) es mostrada en la Figura 25.

En Bahía Magdalena se detectaron animales infectados principalmente en la boca de la bahía, siendo en Diciembre 2004 la temporada en donde se recolectaron la mayor parte de los animales infectados (en una sola estación se recolectaron 33 *N. simplex* infectados) (Fig. 25).

Los adultos de *Nyctiphanes simplex* presentaron una distribución principalmente cerca de la costa, particularmente en la costa este en noviembre del 2005, alto Golfo en enero del 2007 y costa oeste en Julio del 2007. Los organismos infectados se encontraron también en sitios cercanos a la costa, la densidad mínima de eufáusidos sanos en esos sitios fue de aproximadamente 250 eufáusidos adultos cada 1000 m^3 , excepto en la estación

cercana a Bahía Concepción en julio 2007 donde la infección ocurrió en una zona con elevada densidad de eufáusidos y en la estación de diciembre 2004. En la mayor parte de las estaciones donde se detectaron eufáusidos infectados la densidad fue < 500 individuos 1000 m^{-3} .

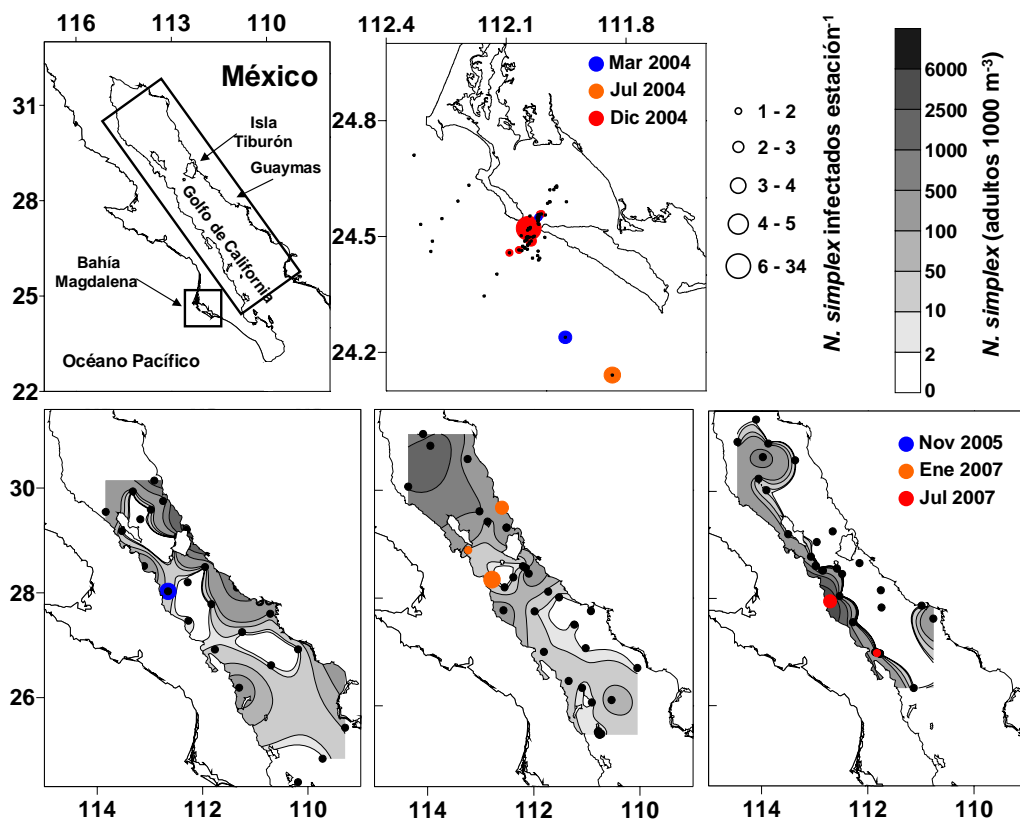


Figura. 25. Distribución y abundancia de eufáusidos adultos de *N. simplex* y número de eufáusidos infectados recolectados por estación de muestreo en Bahía Magdalena (2004) y el Golfo de California (2005 y 2007). Los círculos negros indican la ubicación de las estaciones oceanográficas, las isolíneas en escala de grises representan gráficamente la densidad de eufáusidos sanos y los círculos de color la ubicación y número de eufáusidos infectados (Modificado de Gómez-Gutiérrez *et al.*, sin publicar).

4.2 *Microbiota asociada al estómago del krill subtropical.*

Aunque los estudios sobre la comunidad bacteriana asociada a eufáusidos son escasos, estos muestran una amplia variabilidad en la densidad bacteriana cultivable (UFC), así como de células bacterianas totales (observación de células por SEM y AODC). Es notable que el género *Pseudomonas* fue ubicuo en el sistema digestivo de los eufáusidos polares (Tabla VI). Turkiewicz *et al.*, (1982) no tuvieron éxito al intentar cultivar bacterias del agua marina circundante a enjambres de krill antártico. Aunque se ha reportado que en distintos ecosistemas acuáticos oligotróficos y mesotróficos y que la abundancia de bacterias usualmente exceden en órdenes de magnitud a aquellos estimados por conteos de células viables (Amann *et al.*, 1995), los componentes dominantes de estas comunidades son, en mayoritariamente incultivables (Morris *et al.*, 2002; Giovannoni y Stingl 2005), y probablemente se encuentren en bajas densidades en el estómago del krill.

4.2.1 *Densidad bacteriana*

Los conteos de la densidad bacteriana cultivable en krill antártico difieren en 9 órdenes de magnitud (Tabla VI) esto posiblemente debido a las diferencias metodológicas de los medios de cultivo y las temperaturas de incubación (que en distintos estudios variaron de 3 a 30° C). En los estudios de zonas polares la mayoría de las bacterias recuperadas fueron, como era de esperar, psicrófilas, psicrótrofas o mesófilas con alta tolerancia a bajas temperaturas. En el presente estudio las bacterias se cultivaron a 20.1° C \pm 2.6°C (en condiciones psicrótrofas a mesófilas) en agar marino 2216 por considerarse el medio de cultivo generalmente utilizado para el aislamiento de bacterias marinas. Al igual

que Turkiewicz *et al.*, (1982) no encontramos ninguna asociación consistente entre la carga bacteriana del estómago de los eufáusidos y su sexo ($p=0.1665$) o longitud ($p=0.0763$) y aunque si existió una diferencia entre dos puntos de muestreo, las estaciones 14 y 62, ($p=0.0207$) los cuales se encuentran en $30^{\circ} 50.233$ N, $113^{\circ} 57.612^{\circ}$ W y $27^{\circ} 45.204$ N, $111^{\circ} 59.104$ W, respectivamente. Esta distinción es coherente con los datos de carga bacteriana en otros estudios (Tabla VI) y explica la similitud de UFCs entre individuos saludables de las dos especies de krill (*N. simplex* y *N. difficilis*) dominantes del Golfo de California.

4.2.2 Componentes de la comunidad.

La mayoría de las cepas identificadas tanto en especies de krill polares (árticas *Meganyctiphanes norvegica* y Antártica *E. superba* y *E. crystallorophias*) y en especies subtropicales (*N. simplex* y *N. difficilis*) pertenece al grupo γ -proteobacteria. Comparando la riqueza de bacterias cultivables y no cultivables en la columna de agua de los océanos (Munn, 2004), la mayor parte del bacterioplancton (fuente primaria de bacterias en el estómago del krill) pertenece al grupo de α -proteobacteria. Sin embargo, el grupo de bacterias cultivables dominantes de tracto digestivo de krill son γ -proteobacteria. La alta dominancia de γ -proteobacterias en el estómago del krill no es inesperada si se considera que la proporción de bacterias cultivables en el sistema digestivo de los organismos usualmente fluctúa entre 10-50%, (Zoetendal *et al.*, 2004). Este porcentaje es considerablemente superior a la proporción de bacterias de vida libre cultivables que usualmente fluctúa entre 0.001-0.1% (Amann *et al.*, 1995). Aunque la mayoría de los géneros bacterianos asociados a *E. superba* pertenecen a las γ -proteobacterias, las bacterias

tipo corniforme (Actinobacteria) representaron cerca de 40% de la abundancia (Kelly *et al.*, 1978). Turkiewicz *et al.* (1982) encontraron que la β -proteobacteria *Alcaligenes* fue el género más abundante en *E. superba*, mientras que Fevolden y Edisa (1981) reportaron que las γ -proteobacterias dominaron en abundancia y riqueza bacteriana tanto en *E. superba* como en *E. crystallorophias*, principalmente las bacterias tipo *Moraxella*.

Ordenados de mayor a menor abundancia relativa la frecuencia de aparición de bacterias aisladas de krill polar y templado a grandes grupos fueron: γ -proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Flavobacteria y β -proteobacteria; El krill subtropical tuvo una composición de grandes grupos similar ordenados de mayor a menor abundancia relativa: γ -proteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria, α -proteobacteria, Firmicutes, β -proteobacteria y ϵ -proteobacteria). *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* son los géneros que han sido reportados en las diferentes publicaciones relacionadas con krill polar y en el presente estudio en zona subtropical (Tabla VI).

Pseudomonas se ha reportado asociada a todas las especies de krill ártico y antártico probablemente constituyendo la microflora viable primaria de estas especies de eufáusidos (Donachie, 1995). La elevada frecuencia de aparición de *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* en el estómago de *N. simplex* (Fig. 24) sugiere que estas fueron bacterias residentes en el tracto digestivo de las especies de eufáusidos en el Golfo de California. Aunque en este estudio no se registraron estas bacterias en el estómago de *N. difficilis* la similitud de la morfología colonial entre las cepas de *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* previamente identificadas en *N. simplex* con cepas aun no identificadas aisladas del estómago de *N. difficilis* es probablemente un indicio de que esta última

especie también contenga *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* en su tracto digestivo (anexo 7.1). El esfuerzo de muestreo del presente estudio estuvo dirigido hacia la comunidad de bacterias de *N. simplex* debido a su dominancia en su abundancia en el Golfo de California, sin embargo se cuentan con aislamiento de bacterias y eufáusidos congelados para una identificación de bacterias *Nematoscelis difficilis* y *Euphausia eximia* en un futuro cercano.

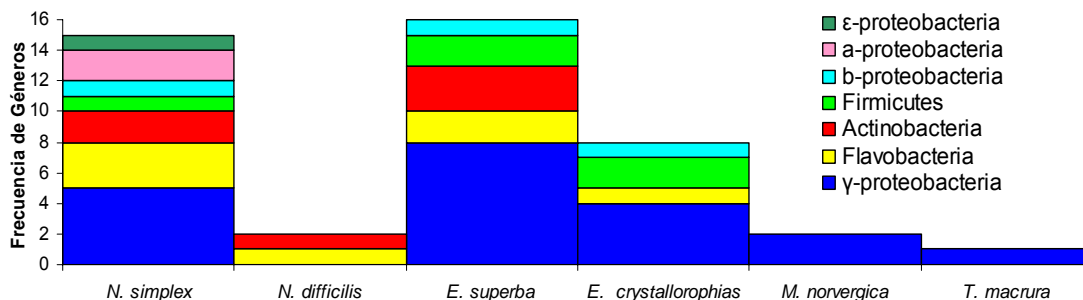


Figura 26. Comparación de los componentes de las clases bacterianas representadas en la comunidad bacteriana asociada a 4 especies de eufáusidos de distribución geográfica ártica y antártica y 2 de distribución subtropical.

Los estudios sobre las características microbiológicas del krill antártico enfatizan en el carácter proteolítico de las bacterias como uno de los principales mecanismos durante el proceso de descomposición de los cadáveres. La mayoría de los microorganismos en el estómago de *E. superba* tienen metabolismo con propiedades proteolíticas con una elevada abundancia relativa (~83% según Turkiewicz *et al.* (1982) y ~50% según Kelly *et al.* (1978). Donachie (1995) también encontró una alta expresión en enzimas proteolíticas (mediante la caracterización semi-cuantitativa en sistema API) en bacterias del estómago de *E. superba*, *M. norvegica* y *Thysanoessa macrura*. Posteriormente Donachie y

Zdanowsky (1998) propusieron que la actividad enzimática de estas bacterias podría estar acoplada a las funciones digestivas del krill. Dabrowsky *et al.* (1983) aislaron varias cepas de la bacteria anaeróbica *Clostridium* de *E. superba*, las cuales mostraron notables propiedades proteolíticas.

Tabla VI. Síntesis de la densidad y riqueza bacteriana encontrada en los eufáusidos a nivel mundial ordenados por orden cronológico. Las aproximaciones de densidad cultivo-dependientes son mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) mientras que las cultivo-independientes, antes de este estudio, fueron realizados mediante técnicas microscópicas a través del conteo directo de células en SEM o teñidas con naranja de acridina (AODC). * = OTUs obtenidos a partir de DGGE

Eufáusido	Microbiota	Densidad bacteriana	Referencia
<i>E. superba</i>	Tipo Coryniformes, <i>Pseudomonas</i> , Tipo <i>Moraxella</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Bacillus</i>	0.875 UFC mg ⁻¹	Kelly <i>et al.</i> , (1978)
<i>E. superba</i>	Tipo <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alteromonas</i>	1×10 ³ UFC mg ⁻¹	Fevolden y Edisa, (1981)
<i>E. crystallorophias</i>	Tipo <i>Moraxella</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , Vibrionaceae, <i>Planococcus</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	0.56 UFC mg ⁻¹	Fevolden y Edisa, (1981)
<i>E. superba</i>	<i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i>	3.59×10 ⁶ UFC ml ⁻¹	Turkiewicz <i>et al.</i> , (1982)
<i>E. superba</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. subterminale</i> , <i>Clostridium</i>	N/D	Dabrowski <i>et al.</i> , (1983)
<i>E. superba</i>	Cocos	5.7×10 ⁸ cel mg ⁻¹	Rakusa-Suszczewski y Zdanowski, (1989)
<i>M. norvegica</i>	<i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	1.3×10 ³ UFC mg ⁻¹ , 1.6×10 ⁶ AODC mg ⁻¹	Donachie <i>et al.</i> , (1995); Donachie (1995)
<i>E. superba</i>	<i>Flavobacterium</i> , <i>Flavobacterium breve</i> , <i>Pseudomonas vesicularis</i> , <i>Weeksella virosa</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i>	1.09×10 ⁵ UFC mg ⁻¹ , 3.28×10 ⁶ mg ⁻¹ AODC	Donachie <i>et al.</i> , (1995); Donachie (1995)
<i>T. macrura</i>	<i>Pseudomonas</i>	3.23×10 ³ UFC mg ⁻¹ , 2.22×10 ⁵ AODC mg ⁻¹	Donachie <i>et al.</i> , (1995); Donachie (1995)
<i>E. superba</i>	Cocos G- Bacilos G-	1.09×10 ⁵ UFC mg ⁻¹ , 3.28×10 ⁶ mg ⁻¹ AODC	Donachie y Zdanowsky, (1998)
<i>E. superba</i>	<i>Psychrobacter proteolyticus</i>	N/D	Denner <i>et al.</i> , (2001)
<i>T. macrura</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	N/D	Cieslinski <i>et al.</i> (2005)
<i>E. superba</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	N/D	Cieslinski <i>et al.</i> (2007)
<i>N. simplex</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Roseobacter</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Kytococcus</i>	8.73×10 ⁵ UFC ml ⁻¹	Este estudio
<i>N. difficilis</i>	<i>Microbacterium</i> , <i>Winogradskiella</i>	8.10×10 ⁵ UFC ml ⁻¹	Este estudio
<i>N. simplex</i> (infección temprana de <i>Collinia</i> sp)	<i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Marinobacter</i> , Flavobacteriaceae*, α -Proteobacterium*, γ -Proteobacterium	1.85×10 ⁵ UFC ml ⁻¹	Este estudio
<i>N. simplex</i> (infección avanzada de <i>Collinia</i> sp)	<i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Ralstonia</i> , Flavobacteriaceae*, <i>Staphylococcus</i>	1.41×10 ⁶ UFC ml ⁻¹	Este estudio

4.2.3 Gradientes latitudinales (diferencias de ecosistemas) en las comunidades bacterianas de eufáusidos.

El krill es uno de los grupos de crustáceos holoplanctónicos más abundantes de las regiones polares y de zonas de surgencias costeras dominando la producción secundaria en el océano (Brinton *et al.*, 2000). Sin embargo, los estudios del componente bacteriano asociado a estos organismos se limita a sólo tres distintos ecosistemas, (1) dos décadas de estudios antárticos (1978-1998) en especies dominantes cuya distribución se restringe a la región polar Antártica, (2) un estudio en *M. norvegica* en el Atlántico Norte (Ártico) y (3) el presente estudio realizado en el Golfo de California con especies de distribución tropical y subtropical (Tabla VI).

Comparando la microbiota del krill de latitudes polares se reportó que de los 18 géneros bacterianos identificados en asociación con la especie dominante (*E. superba*), *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* y *Bacillus* son recuperados al menos en dos diferentes estudios, pero *Pseudomonas* es la única bacteria que esta presente en todos los estudios y en todas las especies de eufáusidos analizados durante dos décadas, lo que nos hace suponer la ubicuidad de este género en las zonas de distribución del krill Antártico (Tabla VI).

En el Golfo de California *Photobacterium* fue la bacteria dominante dentro del componente cultivable del estómago de *N. simplex* (Fig. 24). Sin embargo, la presencia de *Pseudoalteromonas* en todas las fases del parasitoidismo nos hace suponer que esta bacteria es también un componente principal y habitual en el estómago del krill subtropical. Sólo se logró identificar a las bacterias *Microbacterium* y *Winogradaskiella* a partir del

estómago de *N. difficilis*, sin embargo es probable que algunas de las cepas recuperadas y aún no identificadas pertenezcan a este género. Al comparar la frecuencia de los componentes de la comunidad bacteriana del krill antártico y subtropical se observa que existe una similitud a grandes grupos aunque son géneros distintos los que los representan. Las γ -proteobacteria son el grupo dominante en sistemas polares y subtropicales siendo los representantes más frecuentes y abundantes *Pseudomonas* y *Moraxella* en el antártico mientras que *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* lo son para la zona del Golfo de California. Existen también componentes de Flavobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y β -proteobacteria en ambos ecosistemas; sin embargo los géneros representantes de estos grupos son distintos entre estas regiones (Tabla VI). Lo anterior sugiere que las comunidades bacterianas asociadas al sistema digestivo del krill antártico y el subtropical contienen nichos ecológicos similares ocupados por especies distintas. Es decir, existe una analogía entre las comunidades bacterianas de ambos ecosistemas latitudinales lo que hacen suponer que las comunidades bacterianas tienen funciones simbióticas funcionales que evolucionan bajo similares presiones de selección (i.e. selecciones periódicas) ejercidas por el micro ambiente del tracto digestivo de los eufáusidos (Cohan, 2001).

En este estudio se encontró la presencia de al menos dos géneros distintos (primera vez registrados en eufáusidos) de α -proteobacteria (*Roseobacter* y los OTUs EU440071 y EU440072, similares a *Thalassobius* sp.). Previamente se ha reportado la presencia de bacterioclorofila a en las bacterias del género *Roseobacter*, presentando alternancia de metabolismo autótrofo y heterótrofo dependiendo de las condiciones del medio (Brenner *et al.*, 2005a). *Roseobacter* ha sido previamente detectada en la superficie (epibionte) de

algas, animales, nieve marina, así como en localidades oceánicas y costeras. Adicionalmente, se ha determinado que participa de manera significativa en el proceso de descomposición de dimetil sulfoniopropionato (DMSO) en dimetil sulfuro (DMS) (Munn, 2004).

Otra nueva detección fue la presencia de una ϵ -proteobacteria (OTU EU440064, similar a *Arcobacter* sp.). Estos grupos podrían estar también representados en eufáusidos antárticos probablemente por géneros distintos a los que se reportan en este documento detectable posiblemente sólo por métodos independientes al cultivo.

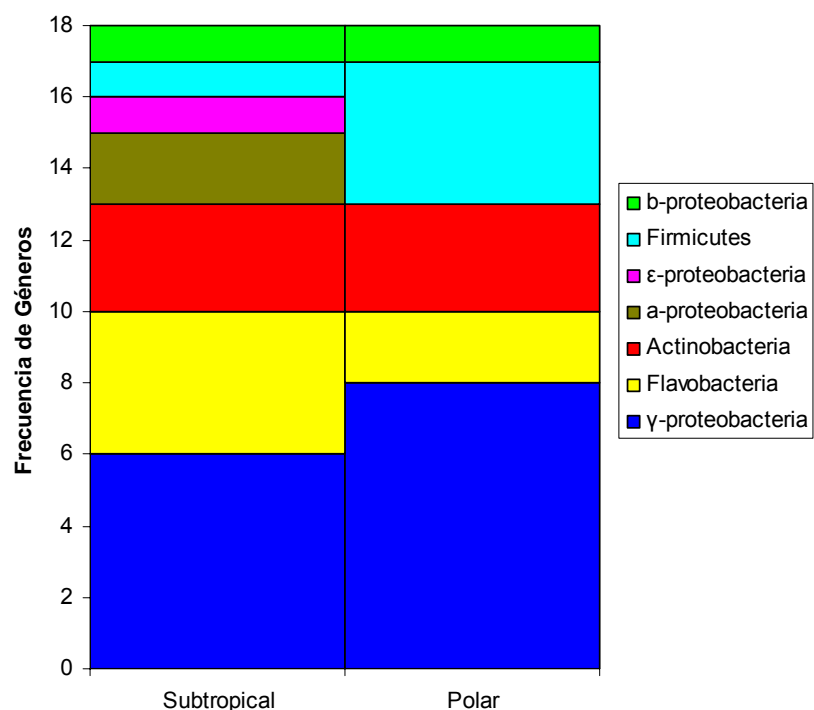


Figura 27. Grupos bacterianos que componen de la comunidad microbiana asociada a eufáusidos de distribución polar (Ártico y Antártico) y subtropical (Golfo de California). La mayoría de los grupos bacterianos que se encuentran en ambas comunidades latitudinales pero son usualmente representados por bacterias de géneros distintos.

4.3 Microbiota asociada al sistema parasitoide.

Hasta ahora, el proceso de parasitoidismo en krill por ciliados del género *Collinia* habia sido estudiado como un sistema de dos componentes (el ciliado parasitoide y el eufáusido hospedero) (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2006). No fue sino hasta el descubrimiento de bacterias en forma de bacilos en la superficie de los ciliados observados mediante microscopia electronica de barrido (SEM) que se consideró la actividad bacteriana como componente inherente de la asociación parasitoide. A la fecha no existen estudios previos sobre la composición bacteriana asociada al proceso parasitoide de ningún organismo marino ni sobre la microbiota asociada a eufáusidos subtropicales.

4.3.1 Densidad bacteriana

Debido a que las estimaciones de la carga bacteriana cultivable en el estómago sano de *N. simplex* y *N. difficilis* no fueron significativamente distintas (8.73×10^5 UFC ml⁻¹ y 8.10×10^5 UFC ml⁻¹ respectivamente) se propone que esta magnitud de concentración de bacterias es habitual en el estómago de eufáusidos saludables subtropicales. Al inicio de la infección del ciliado *Collinia* spp., cuando el eufáusido presenta una coloración beige, la carga bacteriana cultivable disminuye aproximadamente a una cuarta parte (1.85×10^5 UFC ml⁻¹) en relación a lo observado en eufáusidos saludables, y las estimaciones de la densidad bacteriana total (mediante DGGE) presentan la menor concentración observada (Fig. 24). En esta etapa de infección aún se observa integridad tisular de los órganos internos del eufáusido *N. simplex*, similar a lo observado en *E. pacifica* y *T. spinifera* (Gómez-Gutiérrez

et al., 2006, observaciones personales), por lo que suponemos en esta etapa es aún un reducido daño a nivel celular de los órganos internos del eufáusido.

Los hemocitos son esenciales en la inmunidad de crustáceos desarrollando una respuesta inmediata o retrasada a través de funciones de fagocitosis, encapsulación y lisis de células extrañas (Johansson *et al.*, 2000) que en el caso de bacterias que infectan crustáceos (camarones) dos compuestos microbianos involucran estimulación inmune de funciones celulares (lipopolisacaridos LPS y β -glucanos) (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Aunque el sistema inmune aún no ha sido estudiado en eufáusidos, suponemos que es similar con base en la similitud taxonómica de los decápodos, mysidáceos y eufáusidos, pertenecientes al superorden Peracaridae. La disminución de la carga bacteriana en la infección temprana indica que el sistema inmune del eufáusido se encuentra activo, esto es coherente con la actividad enzimática antioxidante, reconocido como un componente del sistema inmunológico de crustáceos que actúan para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por los crustáceos para detener patógenos (Belló, *et al.*, 2000; Vattanaviboon *et al.*, 2003; Mohankumar y Ramasamy 2006). En un estudio co-lateral a ésta investigación, se evaluó la producción y liberación de ROS por el krill infectado como una respuesta fisiológica inmune a los ciliados parasitoides modificando el sistema antioxidante del sistema enzimático (Gómez-Gutiérrez *et al.*, datos sin publicar) La actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) fueron consistentemente más altos en krill saludable que en krill infectado, sugiriendo intensa muerte celular del hospedero, coherente con observaciones con SEM durante fase tardía (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Las actividades de las enzimas glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa

(GPx) parece incrementar la protección antioxidante del hospedero en la etapa temprana, y la actividad de glutatión S-transferasa (GST) posteriormente durante la infección tardía. (Gómez-Gutiérrez *et al.*, datos sin publicar). De esta forma, de acuerdo estos resultados es poco probable que el sistema inmune de defensas del krill pueda sobreponerse a la infección y muerte una vez que inicia la infección de *Collinia* spp.

Cuando la infección se encuentra en etapa avanzada, eufáusidos con coloración naranja, la carga bacteriana cultivable aumenta a 0.85 ± 0.35 bit/ind interpretado como un proceso de bacteremia favorecida por el alto grado de desintegración tisular resultado principalmente del proceso de histofagia del ciliado. El daño a nivel celular es persistente en el sistema circulatorio abierto de los crustáceos pudiendo inclusive observar ciliados móviles desplazándose dentro de los apéndices de los eufáusidos, por lo que el sistema inmune se encuentra completamente comprometido (Gómez-Gutiérrez *et al.*, datos sin publicar). Las estimaciones de la carga bacteriana total también presentan un aumento en la etapa tardía respecto a la etapa de infección temprana. Comparativamente la densidad bacteriana recuperada por cultivo en esta etapa fue mayor que la estimada a partir del DGGE. Debido a que los ciliados apostomatidos son osmotrofos (Morado y Small, 1995; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006), las biomoléculas del krill deben hidrolizarse principalmente por enzimas secretadas al exterior celular. Los hidrolizados parciales restantes dentro del exoesqueleto del eufáusido presumiblemente conforman una fuente favorable de nutrientes disponible para las bacterias que lograron resistir al sistema inmune del krill y que resisten y proliferan aún en la presencia a las enzimas digestivas secretadas por el ciliado favoreciendo la bacteremia, en general, dominada por γ -proteobacterias.

En un estudio sobre la actividad bacteriana durante la descomposición de *E. superba* Zdanowski (1981) se notó una rápida disminución en la densidad bacteriana de krill muerto durante los primeros 3-5 días seguida de un aumento logarítmico, del 20% al 90% del total de la comunidad se componía de bacterias proteolíticas. Así mismo Kelly *et al.*, (1978) reportaron que las bacterias de mayor proliferación en el proceso de descomposición del krill *E. superba* son las *Pseudomonas* (γ -proteobacterias) aún en condiciones de refrigeración (<4° C). Donachie (1995) consideró que es común que estas cepas invadan el tejido sólo después de la muerte del krill y participen de forma directa en su degradación.

La fase endoparasitoide termina cuando los ciliados en estadio tomito salen del exoesqueleto del krill (usualmente por la zona de la línea ecdisal) (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2003, 2006). En esta etapa las estimaciones de carga bacteriana total tuvieron la densidad más alta, probablemente en esta etapa el sistema llega al climax de la capacidad de carga dentro del eufáusido. Finalmente, cuando los ciliados de vida libre se enquistan en filamentos mucilaginosos la densidad bacteriana total, estimada a partir del análisis del DGGE, es similar a la etapa de vida libre. En una revisión sobre la densidad bacteriana en la columna de agua y asociada a partículas de nieve marina se reporta que los niveles de microorganismos en la nieve marina varían típicamente entre 10^8 y 10^9 bacterias ml^{-1} (Munn, 2004) ó 9.4×10^7 por partícula de nieve marina o heces fecales de crustáceos (Allredge y Cohen 1987). Esto representa densidades bacterianas aproximadamente 100 a 10000 veces mayor a la densidad bacteriana del agua marina circundante. Bajo condiciones de laboratorio se observó que la mayor parte de las bacterias asociadas a los ciliados

cuando salen del exoesqueleto del krill se mantienen asociados hasta la fase de enquistamiento de *Collinia* y probablemente estén presentes también en el momento de ser ingeridas por otro eufáusido (Fig. 24). Sin embargo, en la naturaleza es evidente que la coherencia de esta asociación puede ser modificada por colonización de bacterias típicas de la nieve marina y heces fecales (Aldrege y Cohen, 1987). En otras palabras, las bacterias típicas del medio marino pueden competir con aquellas que provienen del proceso de parasitoidismo establecidas en los filamentos mucilaginosos.

4.3.2 Componentes de la comunidad bacteriana.

El estómago de organismos saludables de *N. simplex* presenta una comunidad bacteriana compuesta por al menos 7 grupos bacterianos, entre los cuales dominan las γ -proteobacterias por contener una mayor riqueza de géneros. Este grupo bacteriano presentó una coherencia notable ya que permanece y prolifera a lo largo de todas las etapas del proceso de infección endoparasitoide y externa.

Cuando los ciliados parasitoides inician su alimentación por osmotrofia (histófagos, en etapa trofonte) la estructura y composición de los tejidos y órganos del eufáusido inician rápidos cambios micro-ambientales (< 3 días) que favorecen la proliferación de bacterias previamente indetectables presuntamente por sus bajas densidades, evidenciando un proceso de sucesión en la comunidad bacteriana conforme progresa el daño tisular interno del hospedero. En el estómago de organismos con infección temprana se lograron recuperar, mediante técnicas dependientes al cultivo, únicamente cepas de los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y en el hemocele de *N. simplex* una cepa de *Marinobacter*. En

este último tejido se lograron identificar mediante métodos moleculares la presencia de EU440070 (*Flavobacteria*), EU440071 y EU440072 (ambas α -proteobacterias) y una banda de DGGE (EU440073) correspondiente al 16S ARNr del cloroplasto de una diatomea Baciliariophyta (*Coscinodiscus radiatus*). También en este tejido se lograron identificar, mediante el análisis de la migración de bandas a EU440068 (*Flavobacteria*) y EU440066 (*Alteromonas*). Parece ser que sólo algunas bacterias son capaces de mantener una densidad poblacional suficientemente alta para recuperarse exitosamente mediante el cultivo durante la etapa de infección temprana en la cual tanto el sistema inmune del krill como las enzimas digestivas del ciliado actúan directamente en el micro-ambiente bacteriano. La presencia del gen que codifica al 16S rARN no garantiza la integridad celular de los OTUs identificados pero es un indicio de un flujo de bacterias y microalgas provenientes del tracto digestivo hacia el hemocele, que suponemos, al igual que la mayoría de los metazoarios, debe ser un ambiente libre de bacterias si el organismo se encuentra en condiciones saludables.

Durante la etapa tardía del endoparasitoidismo se puede observar una mayor cantidad de géneros bacterianos cultivados en relación de la riqueza de OTUs no cultivados con riqueza relativamente más baja. Este comportamiento es interpretado como resultado de eventos de competencia bacteriana interespecífica donde sólo permanecen las especies capaces de soportar la actividad catabólica de los ciliados. Tres cepas de *Photobacterium* y dos de *Vibrio* fueron recuperadas del estómago de organismos en etapa tardía. También fueron recuperadas, simultáneamente del estómago y del hemocele del mismo individuo una cepa similar a *Alteromonas macleodii*. De acuerdo con Brenner *et al.* (2005b) esta es

una bacteria común en aguas oceánicas tropicales y subtropicales la cual produce una gran cantidad de enzimas extracelulares capaces de hidrolizar gelatina, lípidos y almidón pero no son capaces de degradar agar, quitina o celulosa. Es posible que las cepas similares a *A. macleodii* participen activamente en el proceso de histofagia de los ciliados *Collinia*. Las cepas de *Pseudoalteromonas* (género bacteriano aerobio estricto común en el medio marino), fue un componente común en toda la asociación parasitoide.

Una cepa de *Staphylococcus aureus* fue recuperada del hemocele de un organismo en etapa de infección tardía y, aunque no se recuperó ningún otro representante de Firmicutes del estómago de organismos sanos, estos se han reportado asociadas a *E. superba* y *E. crystallophias* (Kelly *et al.*, 1978; Fevolden y Edisa, 1981; Turkiewicz *et al.*, 1982; Donachie *et al.*, 1995; Donachie, 1995). También se encontró una cepa del género *Ralstonia* que se caracteriza por ser aerobio estricto del grupo de las β -proteobacterias (Brenner *et al.*, 2005a). *Vibrio*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, dos distintos OTUs del grupo α -proteobacteria casi idénticos (EU440068 y EU440069) y la presencia de un gen del 16S ARNr del cloroplasto de una Bacillariophyta (*Thalassionema nitzschioides* EU440067) fueron encontrados en el hemocele de organismos en infección avanzada confirmando de nuevo el posible flujo bacteriano proveniente del tracto digestivo al hemocele dando evidencia indirecta que apoya la hipótesis de que el mecanismo de infección de *Collinia* spp es trófico (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006; datos sin publicar).

Cuando los ciliados de vida libre salen del exoesqueleto del eufáusido (cadáver) estos también están asociados a varias bacterias cultivables y no cultivables. Mediante

cultivo se lograron recuperar las mismas cepas de *Alteromonas* y *Ralstonia* encontradas en la etapa avanzada del parasitoidismo, así como una cepa de *Pseudoalteromonas*.

Mediante el análisis de migración y secuenciación de las bandas de DGGE se logró identificar la presencia de una ϵ -proteobacteria (similar a *Arcobacter* EU440064) reportada como microaerófila (Brenner *et al.*, 2005a), dos γ -proteobacterias (una similar a *Alteromonas* EU440066 y otra a *Pseudoalteromonas* EU440065) y la presencia de EU440070 (Flavobacteria). Lo anterior confirma que las bacterias asociadas al sistema endoparasitoide del krill permanecen asociadas a los ciliados liberados bajo condiciones de laboratorio. Finalmente sólo se lograron aislar dos cepas de la etapa en la cual sucede la formación de filamentos mucilaginosos, *Photobacterium* y *Pseudoalteromonas*. Aunque no se logró aislar *Photobacterium* de la infección temprana ni de los ciliados libres suponemos que esta presente aunque posiblemente en densidades poblacionales indetectables, en todas las fases de parasitoidismo y en el estómago de organismos saludables como el caso de *Pseudoalteromonas*.

A través de todo el proceso de infección las bacterias más abundantes fueron los miembros del Orden Alteromonadales (de los cuales en este estudio se recuperaron *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* y *Shewanella*), estos son en su mayoría habitantes marinos, la mayoría de las cepas requieren iones de Na^+ para su crecimiento confirmando su carácter marino y tienen regímenes de crecimiento que van de Psicrófilos a mesófilos (Brenner *et al.*, 2005b) coherente con los intervalos estacionales de temperatura del Golfo de California durante los cruceros (Gomez-Gutierrez, datos sin publicar).

Las estimaciones de diversidad bacteriana indican un aumento desde la fase temprana de infección hasta alcanzar su máximo valor en la comunidad bacteriana asociada a ciliados enquistados (filamentos), sin embargo, es probable que la diversidad bacteriana presente en el estómago de krill sano sea aun mayor que la encontrada en los filamentos. Margalef (1974) propuso que las comunidades en ecosistemas maduros tienden a ser relativamente más diversas y que perturbaciones climáticas y ambientales pueden causar una disminución de este índice. Øvreås (2000) propone que este fenómeno sucede más rápidamente en las comunidades microbianas debido a la elevada tasa de crecimiento poblacional y a la presencia de una gran cantidad de bacterias oportunistas, por lo que es probable que la comunidad asociada a filamentos procure mantener una estructura relativamente estable hasta ser ingerida por otro eufáusido. La alta diversidad en la fase ectoparasitoide indica una mayor estabilidad en el sistema endoparasitoide (al menos en condiciones de laboratorio), la alta dominancia en la fase endoparasitoide indica que sólo pocos OTUs resisten las condiciones adversas provocadas por la alta concentración de enzimas digestivas en la etapa avanzada de la infección.

Al analizar la comunidad bacteriana a lo largo del proceso de infección se observó una serie de marcados eventos de sucesión entre cada una de las etapas del parasitoidismo (Fig 24.). La mayoría de los OTUs bacterianos de cada comunidad no prevalecen a la subsiguiente etapa de parasitoidismo, sin embargo, ciertos componentes prevalecen, ya sea a lo largo de todo el proceso infeccioso como *Pseudoalteromonas* y presumiblemente *Photobacterium* o sólo a la etapa posterior, como *Vibrio* encontrado únicamente en la fase endoparasitica pero no asociada a la fase de vida libre. Es importante señalar que *Vibrio* y

Photobacterium han sido reportados como los principales géneros mutualistas y/o patógenos responsables de la colonización inicial en superficies de organismos de origen marino (Munn, 2004). En el caso del parasitoidismo de *Collinia* en *N. simplex*, proponemos, además de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium*, al género *Pseudoalteromonas* como colonizador inicial en el tejido infectado pues fueron una de las bacterias más frecuentemente observadas en el estómago de animales saludables e infección temprana y tardía de *N. simplex* así como en ciliados de vida libre y filamentos sugiriendo también que estas bacterias son típicas de la microflora del tracto alimentario de los eufáusidos subtropicales.

4.3.3 Mecanismo de infección.

La interacción de ciliados apostomatidos del género *Collinia* con eufáusidos se describió por primera vez en el mar de Bering (Capriulo y Small 1986), pero sólo hasta que Gómez-Gutiérrez *et al.* (2003) identificaron a *C. oregonensis* como responsable de un evento de mortalidad masiva, se elucidó el carácter parasitoide de este género de ciliados en eufáusidos y se resaltó su contribución como una de las principales fuentes de mortalidad del krill. Durante los cruceros realizados en Oregon durante 2002 se intentó cultivar sin éxito a ciliados *Collinia*, por lo que el estudio de la interacción entre este ciliado y su hospedero ha sido exitosa únicamente mediante observaciones y experimentos *in situ* (Gómez-Gutiérrez, com. pers.).

Según Gómez-Gutiérrez *et al.* (2006) los crustáceos son los hospederos más comunes de los Ciliados Apostomatidos, y proponen que este grupo de invertebrados podría representar al hospedero ancestral de estos ciliados.

Los experimentos realizados a bordo de un crucero en “El Puma” y en estudios previos efectuados en Oregon (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006) excluyeron dos mecanismos de infección previamente conocidos de ciliados parásitos y crustáceos: (1) penetración del exoesqueleto mediante el uso de enzimas quitinolíticas y (2) infección a través de heridas provocadas por eventos de muda o depredadores naturales (Bradbury, 1994; Morado y Small, 1995), como en el caso del ciliado *Vampyrophrya pelagica* (Grimes y Bradbury 1992; Ohtsuka *et al.*, 2004). También se comprobó que el mecanismo de infección de *Collinia* no es como el de los ciliados exuviotróficos *Gymnodinioides pacifica* (Landers *et al.*, 2006, 2007). Al igual que Gómez-Gutiérrez *et al.* (2006; 2003) sólo se encontró la presencia de *Collinia* sp., en eufáusidos adultos, lo cual excluye también la transmisión parental como mecanismo de infección.

Gomez-Gutierrez *et al.*, (datos sin publicar) expusieron a hembras de misidaceos y decapados holoplanctónicos a diferentes concentraciones de ciliados de vida libre y en filamentos, sin encontrar ningún síntoma de infección, mientras que al realizar el mismo experimento con hembras de *N. simplex* aunque no se observaron síntomas característicos de la infección (coloración beige, cefalotórax hinchado) ni se encontró evidencia de que los ciliados entraran al hospedero, todos los eufausidos expuestos murieron. Lo anterior demuestra, además de la alta especialización del sistema parasioide-hospedero, que los

ciliados de vida libre mantienen su carácter patógeno afectando las funciones vitales del krill aún sin estar dentro del hospedero.

Los ciliados Apostomatidos presentan una etapa de alimentación llamada trofante y se dividen por palintomia en estadio tomonte (Chatton y Lwoff 1935; Johnson y Bradbury 1976; Morado y Small 1995). Gómez-Gutiérrez *et al.* (2006) encontraron una alta densidad de ciliados en estadio trofante agrupados en dos secciones del intestino de un eufáusido infectado recién muerto, sugiriendo estos sitios como el sitio de origen de la infección. La fase de enquistamiento de *Collinia* se observó sólo en los filamentos mucilaginosos, en vez de la ubicación típica los ciliados del orden Apostomatida, los cuales se enquistan en la superficie del hospedero (Chatton y Lwoff 1935; Bradbury 1994; Morado y Small 1995; Ohtsuka *et al.*, 2004). Esto nos hace suponer que la fase de transmisión está relacionada a los filamentos (Fig 24. Gómez-Gutierrez *et al.*, sin publicar).

Para contrastar la hipótesis trófica se analizó en este estudio la composición de la comunidad bacteriana en cada fase del parasitoidismo. Se lograron aislar tres cepas de *Alteromonas*, idénticas respecto a la secuencia del 16S ARNr, del estómago, hemocele y los ciliados liberados de una misma hembra en estadio de infección tardía (EU090132, EU440049 Y EU0052 respectivamente, Tabla V, Fig. 18), comprobando que al menos en este nivel de infección existe un flujo de la comunidad bacteriana del estómago y al hemocele, ambos tejidos presuntamente ocupados por los ciliados parasitoides. Aunque una posible explicación a lo anterior es que, debido al alto grado de histofagia en esta etapa, los ciliados pueden romper las paredes del tracto digestivo favoreciendo la bacteremia. Sin embargo, esta explicación no concuerda con los niveles bacterianos que aunque son bajos

indican la presencia de bacterias durante el estadio de infección temprana cuando la histofagia es incipiente. Otra evidencia fueron 3 cepas de *Vibrio* muy similares en su secuencia del 16S ARNr (EU440048, EU440059, EU440057) las cuales fueron aisladas del estómago y hemocele de varios eufáusidos infectados, tanto en la etapa temprana como en la avanzada (Tabla V, Fig. 20).

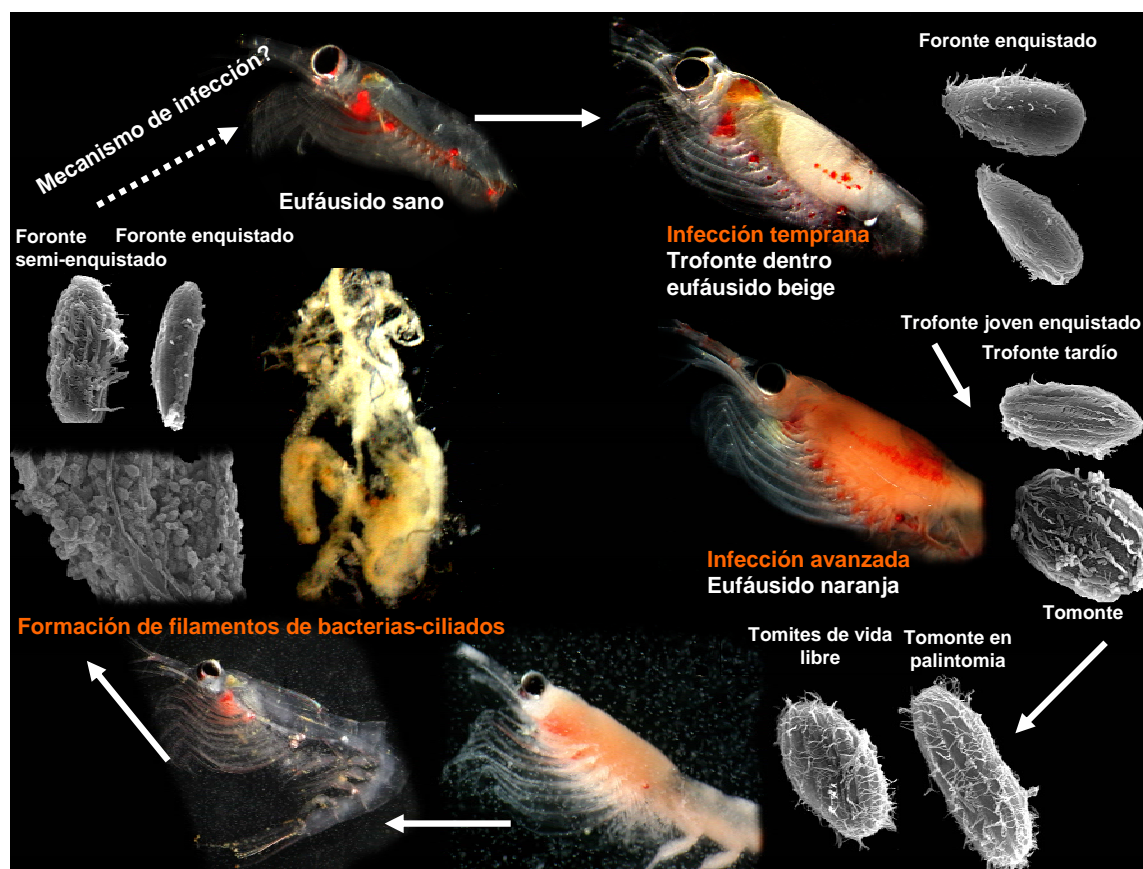


Fig.28. Ciclo de vida del ciliado *Collinia* spp., en *Nyctiphanes simplex* (Gómez-Gutiérrez *et al.*, datos sin publicar)

La presencia de genes que codifican para el 16S ARNr del cloroplasto de *Coscinodiscus radiatus* de krill de infección temprana y *Thalassionema nitzschioides* de infección avanzada en el hemocele de los organismos infectados, confirman el flujo del contenido estomacal (bacterias) al hemocele desde la primera etapa de infección. Es importante resaltar que ambas Bacillariofitas han sido reportadas en el área de muestreo siendo *Thalassionema nitzschioides* una de las diatomeas más abundantes del Golfo de California (Nienhuis, 1982) particularmente dominante durante la temporada fría (Ayala, 2004) por lo que es probable que sean parte de la dieta común de las poblaciones de *N. simplex* del Golfo de California, que al igual que otros eufáusidos se alimentan parcialmente de fitoplancton, zooplancton y nieve marina (Ritz *et al.*, 1990; Dilling y Aldrege, 1998). En dos recientes estudios sobre la composición de la dieta de *E. superba* mediante la amplificación y separación del gen que codifica para el 18S ARNr se determinó que las diatomeas participan como el componente principal en el estómago tanto de organismos juveniles como adultos (Passmore *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006).

El alto grado de agrupamiento entre las secuencias del 16S ARNr de las cepas de *Photobacterium* (Fig. 20) en el estómago de organismos sanos, infectados y filamentos, así como la similitud entre las secuencias de *Pseudoalteromonas* entre ciliados y filamentos (Fig. 19), nos hace suponer que estas bacterias, componentes típicos de la microbiota estomacal de *N. simplex*, resisten la actividad hidrolítica necesaria para la histofagia durante el proceso parasitoide y conviven con los ciliados enquistados fundando los nichos recién creados en los filamentos mucilaginosos.

Photobacterium es un género bacteriano que requiere Na^+ para crecer y produce bioluminiscencia a través de la producción de luciferasa (Brenner *et al.*, 2005b). La producción de luz es un proceso densodependiente que consume más del 20% de la energía celular. Se han propuesto dos posibles ventajas adaptativas (no excluyentes) de este proceso altamente endergónico que son posiblemente relevantes respecto a la presencia de *Photobacterium* en el sistema ciliado-eufáusidos: (1) Szpilewska *et al.* (2003) mencionan que la luciferasa participa directamente en la protección de las células hacia procesos de estrés oxidativo lo que teóricamente le permitiría a estas bacterias resistir las especies reactivas de oxígeno producidas por el crustáceo además (2) (Munn, 2004) propuso que *Photobacterium* no es un organismo verdaderamente de vida libre, si no que se agregan en partículas de la nieve marina hasta alcanzar la densidad celular mínima para producir luz detectable por organismos fototáctiles, se propone que, mediante el brillo, la partícula sea más atractiva como objeto alimentario. La ingestión de filamentos explicaría la inicial alta densidad de ciliados en estadio trofante en la etapa de infección tardía. (Dilling *et al.*, 1998; Dilling y Brzezinski 2004) reportaron que *E. pacifica* ingiere partículas de nieve marina con no más de 0.5 mm de diámetro, aun cuando se provee de otras fuentes de alimentación (fitoplancton) lo cual nos hace suponer que *N. simplex* podría alimentarse de partículas similares, la reintroducción de ciertas bacterias a la flora del tracto digestivo de los eufáusidos mediante la ingestión de filamentos mucilaginosos es una posible adaptación evolutiva de algunas bacterias a asociarse a ciliados endoparasitoides para formar nieve marina que potencialmente sea consumida por otros crustáceos metazoarios.

4.4 Identidad filogenética de los componentes de la comunidad bacteriana

Una especie bacteriana es una categoría que circunscribe (preferentemente) un grupo genómicamente coherente de cepas/aislamientos individuales que comparten en un alto grado de similitud en (muchas) características independientes, probadas comparativamente bajo condiciones altamente estandarizadas (Stackebrandt *et al.*, 2002).

La identificación bacteriana a nivel especie requiere del aislamiento de cultivos puros seguido por múltiples pruebas fisiológicas, bioquímicas y genéticas que confirmen la identidad bacteriana (Amann *et al.*, 1995). Recientemente se ha propuesto que una sola cepa no es suficiente para la designación de una nueva especie bacteriana (Christensen *et al.*, 2001).

Desde hace más de 30 años el criterio más comúnmente utilizado para la definición de especies bacterianas es la cuantificación de la similitud del genoma mediante la hibridación ADN-ADN, considerando valores mayores al 70% de similitud como criterio para agrupar especies (Wayne *et al.*, 1987). Sin embargo, el método de hibridación ADN-ADN no es aplicable para microorganismos incultivables (que representan la mayor parte de la riqueza bacteriana).

Rosselló-Mora y Amann (2001) realizaron una revisión sobre el concepto de especie bacteriana determinando que las cepas que comparten más del 70% de similitud mediante la técnica de hibridación ADN-ADN, son similares en más del 97% de la secuencia del 16S rRNA. De esta forma ellos propusieron este valor de similitud porcentual como un criterio operacional de designación específica. Sin embargo, porcentaje de similitud por hibridación ADN-ADN y por lo tanto la similitud de la secuencia del 16S

rRNA es meramente operativo y pragmático, debido a que no contiene ninguna base conceptual teórica por lo que la especie bacteriana, como actualmente se define, no puede considerarse como unidad evolutiva o ecológica. (Cohan 2001; Cohan 2002; Gevers *et al.*, 2005)

En respuesta a lo anterior Cohan y Perry (2007) proponen que las bacterias se agrupan en ecotipos, los cuales ellos definen como unidades discretas, genéticamente coherentes que comparten el mismo nicho ecológico, y que presentan linajes evolutivos separados irreversiblemente, cada uno con una tendencia evolutiva propia. El ecotipo podría fungir como unidad ecológica y evolutiva, pues responde directamente a procesos de selección natural, y presume ser una agrupación coherente dentro de una comunidad bacteriana (Ward *et al.*, 2006).

En el presente estudio, la designación de los componentes de la comunidad bacteriana asociada tanto al sistema parasitoide-eufáusido como al estomago de individuos saludables ha sido utilizada con un objetivo estrictamente operacional (OTUs) y considerada el género como el nivel mínimo de la jerarquía taxonómica que se ha designado a estos OTUs. A continuación se discutirá la probable identidad bacteriana específica de los componentes de estas comunidades que no corresponden al mínimo de identidad comparativa respecto a la secuencia del 16S ARNr, así como las implicaciones ecológicas y evolutivas asociadas al proceso de parasitoidismo como un proceso natural de selección periódica.

Los métodos discretos como máxima parsimonia (maximum parsimony) y máxima verosimilitud (Maximum likelihood, Felsenstein, 1981) se utilizan para construir

filogramas con base en las secuencias y asumen que cada posición en la secuencia evoluciona independientemente. Los plegamientos en la estructura secundaria del 16S ARNr dependen del apareamiento canónico o no (Gutell *et al.*, 1994) de las bases que los conforman por lo que para mantener la estabilidad termodinámica de estas regiones es necesario que el cambio de cada base conlleve un cambio en su contraparte apareada. (Bruno y Halpern, 1999; Konings y Gutell, 1995). Los modelos como el del vecino más cercano (neighbour Joining, Saitou y Nei, 1997) y el del vecino más cercano ponderado (Weighbour, Bruno *et al.*, 2000) utilizan modelos de sustitución a partir de las distancias calculadas entre las secuencias. Weighbour usa medias ponderadas para reducir la varianza de las estimaciones de las distancias así como un criterio de agrupamiento basado en la verosimilitud, a diferencia de neighbour joining que utiliza un criterio de evolución rápida. ((Bruno *et al.*, 2000) por lo se decidió utilizar el modelo de Weighbour para la construcción de los filogramas.

Siguiendo el criterio de identidad en la secuencia del 16S rARN para la delimitación de especies todas las cepas de *Photobacterium* aisladas del estómago de organismos saludables, tejido de organismos infectados y de la etapa de formación de filamentos pertenecen a *Photobacterium phosphoreum*, pues comparten 98% de sus secuencias con el de la cepa tipo. La coherencia en la secuencia del 16S ARNr entre estas cepas se observa en el grupo formado entre ellas mismas (Fig. 20) y es sólo este conjunto de cepas el establecido a este nicho. Es probablemente que los repetidos ciclos o perturbaciones ambientales que soportan estas bacterias el entrar y salir del microambiente del estómago o hemocele de eufáusidos durante la infección por ciliados *Collinia* funcione

como eventos de selección periódica que esté forzando un proceso de especiación en este grupo.

Las cepas identificadas como *Vibrio* no presentan una agrupación coherente entre ellas que permitan una identificación específica con sólo una cepa tipo (Fig. 20), y la mayoría de ellas presenta una identidad coherente con su especie más cercana (más del 98%) a excepción de la cepa 42X-1b3 la cual presenta un 95% de identidad con la cepa tipo (*V. salmonicida*) y de la cepa 42Xb2 la cual se encuentra completamente alejada de cualquier género de la familia Vibrionaceae y sólo se agrupa a un 50% con el género *Enterovibrio*. Para confirmar el estatus de nueva especie de la cepa 42X-1b3 se debe de obtener la secuencia completa del 16S ARNr para confirmar los bajos valores de similitud, además de realizar pruebas de hibridación ADN-ADN con al menos 3 de las cepas cuya secuencia se encuentre más cercana, la composición lipídica y de poliaminas, así como la asimilación una gran variedad de sustratos sacáridos como única fuente de carbón (Colwell 1970; Denner *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005). Estas mismas pruebas analíticas determinativas deben de realizarse también para la designación de la categoría taxonómica correspondiente a la cepa 42Xb2, que debido a la lejanía respecto a cualquier cepa tipo depositada en la base de datos de RDP es un probable candidato para la designación de un nuevo género.

Las cepas identificadas anteriormente como *Micrococcus* (género bacteriano cuya secuencia del 16S rRNA es muy similar al del género *Arthrobacter* por Stackebrandt y Woese (1979), no forman un grupo coherente, sino que se distribuyen en diferentes agrupaciones taxonómicas afines con las diferencias en la composición de la menaquinona,

ácidos grasos de la membrana y los aminoácidos presentes en su pared celular. Debido a lo anterior Stackebrandt *et al.* (1995) al redefinir géneros inconsistentes a partir del género *Micrococcus*, propusieron entre otros un nuevo género llamado *Kytococcus* bacteria gram positiva, aerobia que forma tetradas en forma cubica pero no forma esporas.

La cepa 9X-22 fue similar en un 97% con *K. sedentarius* (cepa tipo) la cual es resistente a meticilina y penicilina G (Stackebrandt *et al.*, 1995), por lo que además de realizar las pruebas diagnosticas para este género realizar pruebas de resistencia a antibióticos a la cepa 9X-22 para confirmar su estatus taxonómico.

El género *Shewanella* es un grupo que abarca a γ -proteobacterias anaerobias facultativas y están en su mayoría asociadas a hábitas acuáticos (Gauthier *et al.*, 1995; Venkateswaran *et al.*, 1999; Ivanova *et al.*, 2003). Para confirmar si la cepa 54Xa1 corresponde a *S. fidelis* se deben de realizar pruebas de hemólisis, pues esta especie es la única cepa hemolítica reportada de *Shewanella* además de las pruebas diagnósticas para el género que consisten en hibridación ADN-ADN con las cepas similares, producción de amilasa, lipasa, quitinaza y gelatinaza y utilización de diferentes compuestos sacáridos como fuente de carbón (Gauthier *et al.*, 1995; Venkateswaran *et al.*, 1999).

Este es el primer estudio de la estructura comunitaria de la biota bacteriana en el estómago eufáusidos sub-tropicales y asociada a los ciliados del género *Collinia* a lo largo de todas las etapas de infección, con base en la similitud entre ambas comunidades y en la presencia del 16S ARNr de diatomeas en el hemocele se propone que el mecanismo mediante el cual *Collinia* infecta a *N. simplex* (y probablemente a cualquier hospedero reportado) es mediante la ingestión de los filamentos mucilaginosos bacteria-ciliado. La

persistencia de *Pseudoalteromonas* (representada probablemente en varios ecotipos) y *Photobacterium* (en un sólo ecotipo) a lo largo de todo el proceso parasitoide sugiere que estas bacterias son específicas a ese nicho, probablemente cooperando con el ciliado en la desintegración tisular del eufáusido, no obstante, para comprender este complejo sistema hasta ahora desconocido son necesarios estudios adicionales de la composición bioquímica del krill y de la capacidad metabólica de los componentes implícitos en el parasitoidismo: *Collinia* spp. y las bacterias asociadas.

5. CONCLUSIONES

- La carga bacteriana cultivable de estómagos de los eufáusidos de distribución subtropical *N. simplex* y *N. difficilis* no fue significativamente diferente con una densidad bacteriana del orden de 10×10^5 UFC mL⁻¹. Se propone que estas densidades son típicas de eufáusidos de distribución zoogeográfica templada y subtropical.
- Los componentes de la comunidad bacteriana asociada al estómago de eufáusidos de distribución subtropical en el Golfo de California son, en su mayoría, distintos a los asociados a eufáusidos de distribución templada y polar siendo representativos los géneros *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium* y *Vibrio* en latitudes tropicales y los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Flavobacterium* en ecosistemas templados y polares. Únicamente los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* han sido aislados en ambos ecosistemas. Si la comparación de la comunidad bacteriana es realizada en taxa mayores (Órdenes) las comunidades de latitudes bajas y altas son notablemente similares, sugiriendo que las bacterias ocupan nichos ecológicos similares en ambos sistemas aunque ocupados por ecotipos bacterianos distintos, propios de cada sistema. Los eufáusidos subtropicales tuvieron una mayor riqueza bacteriana que los eufáusidos polares.
- El mecanismo de infección más probable para que el ciliado parasitoide del género *Collinia* infecte al eufáusido *Nyctiphanes simplex* es el de ingestión de filamentos con ciliados encistados (infección trófica). Esto es fundamentado en la observación

de la presencia de cepas bacterianas (idénticas o de alta similaridad) en el estómago de euphausíidos saludables, en el hemocele de krill parasitado por ciliados del género *Collinia* y bacterias asociadas a la fase de vida libre de *Collinia*, así como la presencia del 16S ARNr de cloroplastos de diatomeas en el hemocele de organismos infectados que sugieren la invasión de la microbiota intestinal al hemocele del krill.

- La riqueza bacteriana en el estómago de euphausíidos saludables fue comparativamente más alta que en euphausíidos infectados por ciliados del género *Collinia* y considerablemente dominada en ambos sistemas por γ -proteobacterias, siendo los miembros de este grupo bacterianos los ecotipos menos afectados por el sistema inmunológico del euphausíido y encuentran un microambiente favorable para su proliferación durante el proceso de endoparasitoidismo, de vida libre y de ciliados encistados (filamentos).
- Los eventos de sucesión entre la comunidad bacteriana del estómago de euphausíidos sanos y de euphausíidos en las distintas etapas del proceso parasitoide (tanto las fases endoparasíticas, como las fases de vida libre) indican que la interacción *Collinia-Nyctiphanes* modifica y reduce sustancialmente la estructura de la comunidad bacteriana, aunque las bacterias de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Photobacterium* parecen permanecer a lo largo de todo el ciclo de vida de este ciliado parasitoide.

6. REFERENCIAS

- Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V. y Polz M.F. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12): 8966-8969
- Allredge A.L. y Cohen Y. 1987. Can microscale chemical patches persist in the sea? microelectrode study of marine snow, fecal pellets. *Science.* 235:689-691
- Amann R.I., Wolfgang L., Karl-Heinz S. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169
- Ayala R, G.A. 2004. Asociaciones fitoplanctónicas y condiciones oceanográficas de la región sur del Golfo de California (octubre del 2002). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de los Mochis. Los Mochis, Sinaloa
- Baker J.R. 1994. The origins of parasitism in the protists. *Int. J. Parasitol.* 24:1131-1137
- Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83
- Baumann P. y Baumann L. 1981. The marine gram negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* an *Alcaligenes*. En: Starr M. P., Stolp H. , Trüper H. G., Balows A. y Schlegel H.G. (Eds) *The prokariotes. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria.* Springer. Berlin 1302-1330p.
- Belló A.R.R., Fortes E., Belló-Klein A., Llesuy S.F., Robaldo R.B. y Bianchini A. 2000. Lipid peroxidation induced by *clinostomum detruncatum* in muscle of the freshwater fish *rhamdia quelen*. *Dis. Aquat. Org.* 42:233-236
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. y Wheeler D.L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 33:D34-D38
- Bradbury P.C. 1994. Parasitic protozoa of mollusks and crustacea. En: Kreier JP (ed.) *Parasitic protozoa*, Vol 8. Academic Press. San Diego, CA. p 139–263
- Bradbury P.C. y Goyal V. 1976. The fine structure of a parasitic ciliate *Terebrospira* during ingestion of the exoskeleton of a shrimp *Palaemonetes*. *Tissue Cell.* 8(4):573–582
- Brenner D., Krieg N., Garrity G., Staley J., Boone D., Vos P., Goodfellow M., Rainey F., y Schleifer K. 2005a. *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2: The proteobacteria (part C).* Springer. 2^{da} edición. New York. 1388p.

- Brenner D., Krieg N., Staley J., Garrity G., Boone D., Vos P., Goodfellow M., Rainey F. y Schleifer K. 2005b. Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2: The proteobacteria, part B: The gammaproteobacteria. Springer. 2^{da} edición New York. 1108p.
- Brinton E. 1962. The distribution of Pacific euphausiids. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. 8(2):51-270
- Brinton E. 1967. Vertical migration and avoidance capability of euphausiids in the California Current. Limnol. Oceanogr. 12:451-483
- Brinton E. y Townsend A.W. 1980. Euphausiids in the Gulf of California-the 1957 cruises. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 21:1-236
- Brinton, E., Ohman M.D., Townsend A.W., Knight M.D. y Bridgeman A.L. 2000. Euphausiids of the world ocean. Series: World Biodiversity Database CD-ROM, Series Window version 1.0.. Expert Center for Taxonomic Identification. Amsterdam, Netherlands. Springer Verlag. New York.
- Bruno W. J. y Halpern A. L. 1999. Topological bias and inconsistency of maximum likelihood using wrong models. Mol. Biol. Evol. 16:564-566
- Bruno W. J., Succi N. D., y Halpern A. L. 2000. Weighted Neighbour Joining: a likelihood-based approach to distance based phylogeny reconstruction. Mol. Biol. Evol. 17(1): 189-197
- Capriulo G.M. y Small E.B. 1986. Discovery of an apostome ciliate (*Collinia beringensis* n. sp.) endoparasitic in the bering sea euphausiid *Thysanoessa inermis*. Dis. Aquat. Org. 1:141-146
- Capriulo G.M., Pedone M.J., y Small E.B. 1991. High apostome ciliate endoparasite infection rates found in the bering sea euphausiid *Thysanoessa inermis*. Environ. Microbiol. 72:203-204
- Carman K. R., y Dobbs F. C. 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. Microsc. Res. Tech. 37:116-135
- Chatton E. y Lwoff A. 1935. Les cilies apostomes. I. apercu historique et general; etude monographique des genres et des especes. Arch. Zool. Exp. Gen. 77:1-453
- Christensen H., Bisgaard M., Frederiksen W., Mutters R., Kuhnert P., y Olsen J.E. 2001. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? proposal to modify recommendation 30b of the bacteriological code (1990 revision). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2221-2225

- Cieslinski H., Bialkowska A., Dlugolecka A., Daroch M., Tkaczuk K., Kalinowska H., Kur J. y Turkiewicz M. 2007. A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. strain 643A. *Arch. Microbiol.* 188:27-36
- Cieslinski H., Kur J., Bialkowska A., Baran I., Makowski K. y Turkiewicz M. 2005. Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein. Expr. Purif.* 39:27-34
- Cohan F.M. 2002. What are bacterial species?. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:457-487
- Cohan F.M. 2001. Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.* 50:513-524
- Cohan F.M. y Perry E.B. 2007. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr. Biol.* 17:R373-R386
- Colwell R.R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 104:410-433
- Dabrowski J., Mierzejewski J. y Skoczek A. 1983. Isolation of mesophilic anaerobes from antartic krill (*Euphausia superba*). *Acta Microbiol. Pol.* 32:95-98
- Denner E., Vybiral D., Fischer U.R., Velimirov B. y Busse H.J. 2002. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0.2 microm-filterable marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:549-553
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R., y Andersen G. 2006. NAST: A multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucl. Acids. Res.* 34:W394-399
- Dilling L. y Brzezinski M.A. 2004. Quantifying marine snow as a food choice for zooplankton using stable silicon isotope tracers. *J. Plankton. Res.* 26:1105-1114
- Dilling L., Wilson J., Steinberg D., y Alldredge A. 1998. Feeding by the euphausiid *Euphausia pacifica* and the copepod *Calanus pacificus* on marine snow. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:189-201
- Donachie S.P. 1995. Ecophysiological description of marine bacteria from admiralty bay (Antarctica), and the digestive tracts of selected euphausiidae. En: Rakusa-Suszczewski S. y Donachie S. P. (eds.) Department of Antarctic Biology. Polish Academy of Sciences. Warsaw. p 101-196
- Donachie S. P., Saborowski R., Gerrit P., y Buchholz F. 1995. Bacterial digestive enzyme activity in the stomach and hepatopancreas of *Meganyctiphanes norvegica* (M. sars, 1857). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 188:151-165

- Donachie S.P. y Zdanowski M.K. 1998. Potential digestive function of bacteria in krill *Euphausia superba* stomach. *Aquat. Microb. Ecol.* 14:129-136
- Dubos R., Schaedler R.W., Costello R. y Hoet P. 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122:67-76
- Fevolden S. E. y Edisa G. 1981. Bacteriological characteristics of antartic krill (Crustacea; Euphausacea). *Sarsia.* 66:77-82
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-373
- Fischer S.G. y Lerman L.S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:1579-1583
- Gauthier G., Gauthier M. y Christen R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:755-761
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., y Swings J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:733-739
- Giovannoni S.J. 1991. The polymerase chain reaction. En: Stackebrandt E. y Goodfellow M. (eds.) *Modern microbiological methods: nucleic acids techniques in bacterial systematics.* John Wiley and Sons. New York. p 177-203
- Giovannoni S.J. y Stingl U. 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature.* 437:343-348
- Gomez-Gutierrez J., Peterson W.T., De Robertis A., y Brodeur R.D. 2003. Mass mortality of krill caused by parasitoid ciliates. *Science.* 301:339
- Gomez-Gutierrez J., Peterson W.T., y Morado J.F. 2006. Discovery of a ciliate parasitoid of euphausiids off Oregon, USA: *Collinia oregonensis* n. sp. (apostomatida: Colliniidae). *Dis. Aquat. Organ.* 71:33-49
- Gómez-Gutiérrez J. y Robinson C.J. 2006. Tidal current transport of epibenthic swarms of the euphausiid *Nyctiphanes simplex* in a shallow, sub-tropical bay on Baja California peninsula, México. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 320:215-231

- Grimes B.H. y Bradbury P.C. 1992. The biology of *Vampyrophrya pelagica* (Chatton and Lwoff, 1930), a histophagous apostome ciliate associate with marine calanoid copepods. *J. Protozool.* 39(1):65-79
- Gutell R. R., Larsen N. y Woese C. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative prespective. *Microbiol. Rev.* 58(1): 10-26
- Ivanova E.P., Sawabe T., Hayashi K., Gorshkova N.M., Zhukova N.V., Nedashkovskaya O.I., Mikhailov V.V., Nicolau D.V. y Christen R. 2003. *Shewanella fidelis* sp. nov., isolated from sediments and sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:577-582
- Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K., y Söderhäll K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191:45-52
- Johnson C.A. y Bradbury P.C. 1976. Observations on the occurrence of the parasitic ciliate *Synophrya* in decapods in coastal waters off the southeastern united states*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 23:252-256
- Kawaguchi S. y Toda T. 1997. Discovery of ciliates reproducing in the gut of antarctic krill. *Polar. Biol.* 18:158-160
- Keller M. y Zengler K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:141-150
- Kelly M.D., Lukaschewsky S. y Anderson C.G. 1978. Bacterial flora of antartic krill (*Euphausia superba*) and some of their enzymatic properties. *J. Food. Sci.* 43:1196-1197
- Koeppl A., Perry E.B., Sikorski J., Krizanc D., Warner A., Ward D.M., Rooney A.P., Brambilla E., Connor N., Ratcliff R.M., Nevo E., y Cohan F. 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(7) 2504:2509
- Komatsoulis G. A. y Waterman M. S. 1997. A new computational method for detection of chimeric 16S rRNA artifacts generated by PCR amplification from mixed bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2338-2346
- Konings D. A. M. y Gutell R. R. 1995. A comparison of thermodynamic foldings with comparatively derived structures of 16S and 16S-like RNAs. *RNA.* 1:559-574
- Lafferty K.D. y Kuris A.M. 2002. Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends. Ecol. Evol.* 17:507-511.
- Lavaniegos B.E. 1996. Vertical distribution of euphausiid life stages in waters adjacent to Baja California. *Fish. Bull.* 94:300-312.

- Landers S.C., Gómez-Gutiérrez J. y Peterson W.T. 2006. *Gymnodinioides pacifica*, n. sp., an exuviotrophic ciliated protozoan (Ciliophora, Apostomatida) from euphausiids of the Northeastern Pacific. *Europ. J. Protistol.* 42:97-106.
- Landers S.C. Gómez-Gutiérrez J. y Peterson W.T. 2007. The fine structure of the phoront of *Gymnodinioides pacifica*, a ciliated protozoan (Ciliophora, Apostomatida) from euphausiids of the Northeastern Pacific. *Europ. J. Protistol.* 43:239-249
- López-Cortés A., Schumann P., Pukall R. y Stackebrandt E. 2006. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:183-190
- MacLeod, R.A. 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Adv. Microbiol. Sea*, 1:95-126
- Maidak B., Cole J., Parker C., Garrity G., Larsen N., Li B., Lilburn T., McCaughey M., Olsen G., y Overbeek R. 1999. A new version of the RDP (ribosomal database project). *Nucl. Acids. Res.* 27:171-173
- Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T., Saxman P.R., Farris R.J., Garrity G.M., Olsen G.J., Schmidt T.M. y Tiedje J.M. 2001. The RDP-II (ribosomal database project). *Nucl. Acids. Res.* 29:173-174
- Margalef R. 1974. *Ecología*,. Omega 1^{er} ed. Barcelona. 951p.
- Martin D.L., Ross R.M., Quetin L.B. y Murray A.E. 2006. Molecular approach (PCR-DGGE) to diet analysis in young antarctic krill *Euphausia superba*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 319:155-165
- Mohankumar K. y Ramasamy P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res.* 115:69-75
- Mohr K.I. y Tebbe C.C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ. Microbiol.* 8:258-272
- Morado J.F. y Small E.B. 1995. Ciliate parasites and related diseases of crustacea: A review. *Rev. Fish. Sci.* 4:275-354
- Morris R.M., Rappe M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Siebold W.A., Carlson C.A. y Giovannoni S.J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature.* 420:806-810
- Munn C. 2004. *Marine microbiology*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers. New York. 282p.

- Muyzer G., De Waal E. y Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700
- Muyzer G. y Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 73:127-141
- Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. y Wawer C. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3:1-17
- Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S. y Maniatis T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13:3131-3145
- Nienhuis H.J. 1982. Phytoplankton characteristics in the southern part of the Gulf of California. *CIBCASIO Trans.* 6:152-186
- Ohtsuka S., Hora M., Suzaki T., Arikawa M., Omura G. y Yamada K. 2004. Morphology and host-specificity of the apostome ciliate *Vampyrophrya pelagica* infecting pelagic copepods in the Seto Inland Sea, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 282:129-142
- Øvreås L. 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* 3:236-251
- Passmore A., Jarman S., Swadling K., Kawaguchi S., McMinn A. y Nicol S. 2006. DNA as a dietary biomarker in antarctic krill, *Euphausia superba*. *Mar. Biotech.* 8:686-69
- Polz M.F. y Cavanaugh C.M. 1997. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on in vitro transcription of 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1028-1033
- Rakusa-Suszczewski S. y Zdanowski M. K. 1989. Bacteria in krill (*Euphausia superba* dana) stomach. *Acta Protozool.* 28:87-90
- Rippka R. Waterbury J.B. y Stanier R.Y. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: Some general principles, En: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A. y Schlegel H.G. (eds) Springer-Verlag. New York. p 212-220
- Rossellö-Mora R. y Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:39-67
- Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-426

- Sambrook J. y Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 800p.
- Savage D.C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:107-133
- Schlegel H.G. y Jannasch H.W. 1981. Prokaryotes and their habitats En: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A. y Schlegel H.G. (eds) *The Prokariotes*. Springer-Verlag, New York, p 43-82
- Schloss P, D. y Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1501-1506
- Shannon C.E. y Weaver W. 1963. *Mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Illinois. 55p.
- Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S. y Myers R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:232-236
- Smith A.L. 1977. *Microbiology laboratory manual and workbook*. 4^a edición. The C. V. Mosby Company. St. Louis USA. 159 p.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kampfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A. y Whitman W. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047
- Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O. y Schumann P. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* cohn 1872 gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:682-692
- Stackebrandt E. y Woese C. 1979. A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. *Curr. Microbiol.* 2:317-322
- Suzuki M.T. y Giovanonni S.J. 1996. Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):625-630
- Szpilewska H., Czyz A. y Wgrzyn G. 2003. Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 47:379-382

- Takahashi K., Kawaguchi S., Kobayashi M., y Toda T. 2003. Parasitic eugregarines change their spatial distribution within the host digestive tract of antarctic krill, *Euphausia superba*. Pol. Biol. 26:468-473
- Takahashi K., Kawaguchi S., Kobayashi M., y Toda T. 2004. The variability of eugregarines living in the Antarctic krill. Polar Bioscience, 17: 16-25.
- Tatusova T.A. y Madden T.L. 1999. BLAST 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250
- Teske A., Wawer C., Muyzer G. y Ramsing N.B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (mariager fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 62:1405-1415
- Thompson F.L., Thompson C.C., Naser S., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Munn C., Bourne D. y Swings J. 2005. *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:913-917
- Tremblay, N., 2008. Variación estacional de los indicadores de estrés oxidativo asociada a la migración vertical de los eufáusidos subtropicales del Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, BCS, México, pp 125.
- Turkiewicz M., Galas E. y Kalinowska H. 1982. Microflora of antarctic krill (*Euphausia superba*). Acta Microbiol. Pol. 31:175-184
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. y Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60:407-438
- Vargas-Albores F., Hernández-López J., Gollas-Galván T., Montaña-Pérez K., Jiménez-Vega F. y Yepiz-Plascencia G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products, Chiangmai, Thailand En: Flegel T.W. (ed) BIOTEC, Thailand, p26-30
- Vattanaviboon P., Panmanee W. y Mongkolsuk S. 2003. Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*. FEMS Microbiol. Lett. 221:89-95
- Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White D.C., Nishijima M. y Sano H. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:705-724

- Ward D.M., Bateson M.M., Ferris M.J., Kühl M., Wieland A., Koeppl A. y Cohan F.M. 2006. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of mushroom spring (yellowstone national park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function. *Philos. T. R. Soc. B. Sciences.* 361:1997-2008
- Wayne L. G., Brenner D. J., Collwel R. R., Grimont A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P., y Trüper H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(4): 463-464
- Wen-Tso L., Terence L.M., Cheng H. y Forney L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522
- Zdanowski M.K. 1981. Growth of bacteria in the course of decomposition of *Euphausia superba* dana. *Bull. Pol. Acad. Sci.* 29:155-161
- ZoBell C.E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* 4:42-75
- Zoetendal E.G., Cheng B., Koike S. y Mackie R.I. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: From phylogeny to function. *Curr. Issues. Intestinal. Microbiol.* 5:31-48

7. ANEXOS

7.1 Morfología colonial de los primo-aislamientos recuperados durante este estudio.

Morfología Colonial								
Cepa	Color	Textura	Margen	Opacidad	Eufáusido	Grupo	Calve Genbank	Género
158XA1	Mamey	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	1	EU090135	Dietzia sp.
19XA	Naranja	Acuosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	2		
16XA2	Naranja	Esponjosa	Filamentoso	Opaca	<i>N. simplex</i>	3		
54XA1	Naranja	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	4	EU090134	Shewanella
10XB1	Café	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	5	EU090137	Pseudoalteromonas
46XB5	Blanca-Café	Grumosa	Continuo	Semiopaca	Ciliados	6	EU440055	Ralstonia
134X ⁻¹ A1	Blanca-Café	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	6		
45X ⁻¹ B2	Blanca-Café	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	6		
45XB3	Blanca-Café	Seca	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	7		
42X ⁻¹ A4	Blanca-Café	Creмоса	Continuo	translucida	<i>N. simplex</i>	8	EU440051	Photobacterium
49XB1	Blanca-Café	Creмоса	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	8	EU090129	Roseobacter
159XB3	Blanca	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	9		
42XB4	Blanca	Grumosa-Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	9	EU090132	Alteromonas
54XB1	Blanca	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	9		
54XB2	Blanca	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	9		
65XA1	Blanca	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	9		
131X ⁻¹ A2	Blanca	Creмоса	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	10	EU440063	Marinobacter
134XA3	Blanca	Creмоса	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	10	EU440042	Marinobacter
159XA1	Blanca	Creмоса-Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	10		
42XB1	Blanca	Creмоса	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	10		
50XB2	Blanca	Creмоса-Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	10		
63X ⁻¹ A2	Blanca	Grumosa	Continuo	translucida	Filamentos	11		
131XB1	Blanca	Grumosa	Solido	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	11	EU440057	Vibrio
135XA1	Blanca	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	11	EU440050	Pseudoalteromonas
135XB1	Blanca	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	11	EU440048	Vibrio
135XB2	Blanca	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	11	EU440059	Vibrio
160XA2	Blanca	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	11		
18XC1	Blanca	Grumosa	Solido	Translucida	<i>N. simplex</i>	11		
42X ⁻¹ A2	Blanca	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	11		
42X ⁻¹ B4	Blanca	Grumosa	Continuo	translucida	<i>N. simplex</i>	11	EU440047	Photobacterium
42XA2	Blanca	Grumosa	Continuo	translucida	<i>N. simplex</i>	11	EU440062	Photobacterium
54XA4	Blanca	Grumosa	Solido	Translucida	<i>N. simplex</i>	11		
8X-11	Blanca	Grumosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	11		
42XA1	Beige	Butirosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	12		
116XB2	Beige	Butirosa	Continuo	Translucida	<i>E. eximia</i>	13		
34XA1	Beige	Butirosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	13		
46XB1	Beige	Dura	Continuo	Opaca	Ciliados	14	EU440052	Alteromonas
158XB2	Beige	Dura	Continuo	Muy Opaca	<i>N. simplex</i>	14		
158XB7	Beige	Dura	Continuo	Muy Opaca	<i>N. simplex</i>	14		

42X ⁻¹ A1	Beige	Dura	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	14		
42XA3	Beige	Dura	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	14		
45X-1b1-K	Beige	Dura	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	14	EU440053	Marinobacter
45Xa1-J	Beige	Dura	Continuo	Muy Opaca	<i>N. simplex</i>	14	EU440049	Alteromonas
26XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
27X-1A2	Beige	Viscosa	Solido	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
27X-1B2	Beige	Viscosa	Difuso	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
27XA1	Beige	Viscosa	Difuso	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
29X-1B2 primera	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
29XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	15		
33XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	15		
35XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	15		
42X ⁻¹ A1	Beige	Viscosa	Continuo	Muy Opaca	<i>N. simplex</i>	15		
42XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	15		
64XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	15		
116XA1	Beige	Viscosa	Solido	Opaca	<i>E. eximia</i>	16		
63XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Muy opaca	Filamentos	16		
158XB4	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	16		
35XA1	Beige	Viscosa	Solido	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	16		
42X ⁻¹ B3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	16	EU440058	Vibrio
50XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	16		
64XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	16		
8X6	Beige	Viscosa	Solido	Translucida	<i>N. simplex</i>	16		
27X-1B1	Beige	Viscosa	Lobulado	Opaca	<i>N. difficilis</i>	17		
46XB4	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	Ciliados	18		
116XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>E. eximia</i>	18		
116XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>E. eximia</i>	18		
117XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>E. eximia</i>	18		
26X-1A1	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	18		
26X-1A2	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	18		
27X-1A1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
27X-1B3	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
27XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
27XA3	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	18		
27XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
27XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
67XA3	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	18		
67XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
67XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
68XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
68XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
91XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	18		
91XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
91XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
92XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
93XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	18		
93XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	18		

93XB1	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
93XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	18		
17XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
19XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
33XA3	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
34XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
35XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
3X4	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
42XB2	Beige	Viscosa	Continuo	translucida	<i>N. simplex</i>	18	EU440061	Vibrio
48XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
4X1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
4X2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
53X-1A1	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	18		
53XB3	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
54XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
55XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
55XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
55XA3	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
55XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
64XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	18		
64XB2	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	18		
65XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
65XA3	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	18		
66XA1	Beige	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	18		
66XA2	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
66XB1	Beige	Viscosa	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	18		
8X1	Beige	Viscosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	18		
8X-23	Beige	Viscosa	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	18		
8X3	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
8X5	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
8X7	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
8X8	Beige	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	18		
9X1	Beige	Viscosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	18		
47XB3	Beige	Creмоса	Continuo	Muy Opaca	<i>N. simplex</i>	19		
63X ⁻¹ A1	Beige	Creмоса	Lobulado	Opaca	Filamentos	20		
46XA2	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	Ciliados	21	EU440044	Pseudoalteromonas
46XB3	Beige	Creмоса	Continuo	Semiopaca	Ciliados	21		
63XB1	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	Filamentos	21		
131X ⁻¹ A1	Beige	Creмоса	Solido	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	21		
158XA4	Beige	Creмоса	Solido	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	21		
47XA4	Beige	Creмоса	Solido	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	21		
47XB1	Beige	Creмоса	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	21		
63X ⁻¹ A3	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	Filamentos	22	EU440045	Photobacterium
63X ⁻¹ B1	Beige	Creмоса	Continuo	Muy Opaca	Filamentos	22	EU440054	Pseudoalteromonas
92XA1	Beige	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	22		
131X ⁻¹ A3	Beige	Creмоса Creмоса-	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	22	EU440056	Pseudoalteromonas
131XA2	Beige	Grumosa	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	22	EU440046	Vibrio

131XB2	Beige	Cremosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	22	EU090130	Staphylococcus
159XA2	Beige	Cremosa	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	22	EU440060	Pseudoalteromonas
160XB1	Beige	Cremosa- Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	22		
47XA1	Beige	Cremosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	22		
48XB1	Beige	Cremosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	22		
50XB1	Beige	Cremosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	22		
117XB1	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>E. eximia</i>	23		
26X-1B1	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	23		
26XB3	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	23		
29X-1B2 segunda	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	23		
29XB1	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	23		
29XB3	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	23		
33XA4	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	23		
34XB2	Beige	Grumosa	Difuso	Opaca	<i>N. simplex</i>	23		
35XA2	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	23		
42X ¹ B1	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	23		
49XA1	Beige	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	23		
64XA1	Beige	Grumosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	23		
117XA2	Beige	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>E. eximia</i>	24		
117XB3	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>E. eximia</i>	24		
26X-1B2	Beige	Grumosa	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	24		
26XA1	Beige	Grumosa	Solido	Translucida	<i>N. difficilis</i>	24		
67XA2	Beige	Grumosa	Solido	Opaca	<i>N. difficilis</i>	24		
92XB1	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	24		
17XA1	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
17XA1	Beige	Grumosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	24		
33XA2	Beige	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	24		
3X1	Beige	Grumosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	24		
3X-21	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
49XA2	Beige	Grumosa- Viscosa	Solido	Opaca	<i>N. simplex</i>	24		
4X-42	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
53X-1A2	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
55XB1	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
8X-14	Beige	Grumosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	24		
8X2	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
8X-22	Beige	Grumosa	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	24		
8X4	Beige	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	24		
46XB2	Beige	Seca	Continuo	Opaca	Ciliados	25		
5X1	Beige	Seca	Continuo	Opaca	<i>N. difficilis</i>	25		
8X-13	Beige	Seca	Continuo	Semiopaca	<i>N. simplex</i>	25		
1X1	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	26		
1X-11	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	26		
26XB1	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	26		
5X-21	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	26		
18XB2F	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	26		
8X-12	Beige	Seca	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	26		

1X-21	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. difficilis</i>	27		
17XC3	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
18Xa2Gr	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27	EU090138	Photobacterium
18XB1	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
18XB2G	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
18XB3	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
19XB3	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
20XC2	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
45XA2J	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27	EU440043	Ralstonia
64XB2	Beige	Seca	Continuo	Transparente	<i>N. simplex</i>	27		
69XA1	Amarilla	Butirosa	Continuo	Semiopaca	<i>N. difficilis</i>	28	EU090131	Winogradskyella
47XA2	Amarilla	Butirosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	28		
68XB2	Amarilla	Viscosa	Continuo	Translucida	<i>N. difficilis</i>	29	EU090133	Microbacterium
48XA1	Amarilla	Viscosa	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	29		
9X-21	Amarilla	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	30		
9X-22	Amarilla	Creмоса	Continuo	Opaca	<i>N. simplex</i>	30	EU090136	Kytococcus sp.
8X-15	Amarilla	Grumosa	Continuo	Translucida	<i>N. simplex</i>	31		

7.2 Formulación del agua de mar artificial (AMA 1/2 X)

Modificado de Baumann y Baumann, 1981 (MacLeod, 1968).

NaCl	11.675 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	12.35 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.45 g
Tris buffer (1.0 M, pH 7.5)	50 mL
Agua destilada	950 mL

- Añadir las sales en el orden indicado, adicionar la siguiente hasta que la primera este completamente disuelta.
- Dejar que la mezcla se combine enteramente al menos media hora antes de usarse.
-

Tris buffer 1.0 M, pH 7.5:

HCl (concentrado)	33.3 mL
Trizma Base	60.55 g
Aforar a 500 mL agua deionizada. Almacenar a 4°C	

7.3 Formulación aproximada del agar marino 2216 (ZoBell, 1941)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	1 g
Citrato ferrico	0.1 g
Cloruro de sodio	19.45 g
Cloruro de magnesio	8.8 g
Sulfato de sodio	3.24 g
Cloruro de calcio	1.8 g
Cloruro de potasio	0.55 g
Bicarbonato de sodio	0.16 g
Bromuro de potasio	0.08 g
Cloruro de estronsio	34 mg
Acido borico	22 mg
Silicato de sodio	4 mg
Fluoruro de sodio	2.4 mg
Nitrato de amonio	1.6 mg
Fosfato disodico	8 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 L.

Hervir durante 1 min. y agitar para completa solvatación,

7.4 Tinción de Gram

- Fijar con calor una gota de cultivo líquido de la cepa o una asada de colonia en cultivo solido a un portaobjetos.
- Sumergir momentáneamente en cristal violeta y dejar teñir por 60 segundos
- Retirar el exceso en el chorro de agua (sobre el lado sin bacterias) por no mas de 5 segundos
- Cubrir completamente el portaobjetos con lugol y dejar teñir por 60 segundos
- Retirar el exceso en el chorro de agua por no mas de 5 segundos
- Decolorar con etanol al 95% de 15 a 30 segundos
- Retirar el exceso en el chorro de agua por no mas de 5 segundos
- Cubrir completamente el portaobjetos con safranina y dejar teñir por 60 segundos
- Retirar el exceso en el chorro de agua por no mas de 5 segundos
- Secar a temperatura ambiente.

7.5 Protocolo de extracción de ácidos nucleicos para bacterias Gram. positivas de tejidos fijados en etanol por medio del paquete de extracción DNeasy de Qiagen

Material y reactivos:

Material:

- Baño maria a 70° C
- Baño maria a 37° C
- Vortex
- Centrifuga
- 2 tubos eppendorf por muestra
- Paquete de extracción DNeasy
- Micropipeta 200-1000 (puntas azules)
- Micropipeta 200-1000 (puntas amarillas)

Reactivos:

- Lizozima
- Agua libre de Nucleasas
- PBS pH 7.2 (50 mM fosfato de potasio; 150 mM NaCl)
- Buffer de lisis enzimática o “solución salina-EDTA pH 8 (NaCl 0.15 M; EDTA (0.001 M; 20 mg/mL de lizozima) (**Añadir la lizozima justo antes de usarse**)

Procedimiento:

1.- Lavar el etanol con PBS (8g NaCl: 0.2g KCl: 1.44g Na₂HPO₄: 0.24g KH₂PO₄: 1 lt H₂O pH: 7.4) dos veces

Se da un pulso de centrifuga a las muestras para precipitar la muestra, posteriormente se extrae el etanol con una pipeta y se le agrega un volumen de PBS, se centrifuga y se repite.

2.- Resuspender la muestra en 180 µL de buffer de lisis enzimática

3.- Incubar por lo menos 45 minutos a 37° C.

4.- Añadir 25 µL de proteinasa K. y 200 µL de buffer A1 Mezclar con vortex

No añadir la proteinasa K directamente al buffer A1

5.- Incubar a 70° C por 30 min.

6.- Añadir 200 µL de etanol grado molecular (96%-100%) y mezclar con vortex

7.- Pipetear la mezcla anterior en una columna DNeasy colocada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar a 6000 xg por un minuto y descartar el fluido y el tubo colector

8.- Colocar la columna DNeasy en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW1, centrifugar por un minuto a 6000 xg, descartar fluido y tubo

9.- Colocar la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 20000 xg para secar la membrana. Descartar flujo y tubo colector

10.- Colocar la columna DNeasy en un tubo eppendorf y añadir 50 µL de agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugar un minuto a 6000 xg para eluir

11.- Repetir el paso anterior

7.6 Protocolo de extracción de ácidos nucleicos para bacterias Gram. negativas de tejidos fijados en etanol por medio del paquete de extracción DNeasy de Qiagen

Material y reactivos:

Material:

- Baño maria a 55° C
- Baño maria a 70° C
- Vortex
- Centrifuga
- 2 tubos eppendorf por muestra
- Paquete de extracción DNeasy
- Micropipeta 200-1000 con puntas
- Micropipeta 200-1000 con puntas

Reactivos:

- Agua libre de Nucleasas
- PBS pH 7.2 (50 mM fosfato de potasio; 150 mM NaCl)

Procedimiento:

1.- Lavar el etanol con PBS (8g NaCl: 0.2g KCl: 1.44g Na₂HPO₄: 0.24g KH₂PO₄: 1 lt H₂O pH: 1.4) dos veces

Se da un pulso de centrifuga a las muestras para precipitar la muestra, posteriormente se extrae el etanol con una pipeta y se le agrega un volumen de PBS, se centrifuga y se repite.

2.- Resuspender la muestra en 180 µL de buffer ATL

3.- Añadir 25 µL de proteinasa K. Mezclar con vortex e incubar a 55° C toda la noche

4.- Mezclar con vortex durante 15 segundos, agregar 200 µL de buffer A1 mezclar con vortex de nuevo e incubar a 70° C por 10 min.

5.- Añadir 200 µL de etanol grado molecular (96%-100%) y mezclar con vortex

6.- Pipetear la mezcla anterior en una columna DNeasy colocada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar a 6000 xg por un minuto y descartar el fluido y el tubo colector

7.- Colocar la columna DNeasy en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW1, centrifugar por un minuto a 6000 xg, descartar fluido y tubo

8.- Colocar la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 20000 xg para secar la membrana. Descartar flujo y tubo colector

9.- Colocar la columna DNeasy en un tubo eppendorf y añadir 25 µL de agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugar un minuto a 6000 xg para eluir

10.- Repetir el paso anterior