

Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo sobre geotextil asociados a las raíces de manglares (canal de marea Puerto Rico, Tumbes, Perú) y aislamiento de cepas de diatomeas caracterizadas molecularmente

Marco Antonio Zapata Cruz ^a Krizia Pretell Monzon^b

^a Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar. Universidad Nacional de Tumbes. Departamento Académico de Acuicultura. E- mail: mzapata53@gmail.com

^b Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes. E- mail: krizmar_5@hotmail.com

Resumen. La metagenómica es el estudio del conjunto de genomas presente en muestras ambientales sin necesidad de aislar y cultivar esas especies. Pocos estudios de metagenómica han evaluado la diversidad de los microorganismos asociados a los manglares y ninguno caracterizó las comunidades fotosintéticas. En cuanto a las comunidades cultivables, varias publicaciones son relacionadas a los microorganismos asociados con los sedimentos y la rizósfera de los manglares pero pocos estudios son específicos de las diatomeas a pesar de su importancia ecológica y acuícola. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar las comunidades de microorganismos en desarrollo sobre geotextiles asociados a las raíces de *Rhizophora mangle* y aislar cepas de diatomeas caracterizadas molecularmente. El análisis metagenómico ha sido dirigido al ADN ribosómico plastídico 23S para las comunidades microbianas fotosintéticas y al ADN ribosómico 16S para los procariotas. Los microorganismos fueron colectados sobre sustratos artificiales, ubicados en el canal de marea Puerto Rico, Tumbes, Perú entre los meses de noviembre del 2013, a junio del 2014, para el análisis del 23S y en el mes de marzo del 2014 para el análisis de 16S. La caracterización a nivel metagenómico dirigido al 23S indicó que el grupo prominente pertenece a las algas verdes (70,7%) dominadas por algas unicelulares (Prasinophyceae 50,4%, Trebouxiophyceae 6,8%, y las Pedinophyceae 4,6%) y en menor proporción por macroalgas verdes (mesostigmatophyceae 8,9%). Le siguen en importancia las algas rojas Florideophyceae (13,0%) y las flageladas (Euglenida 5,6%). El 50,9% de la comunidad bacteriana estuvo representada por las vibrionaceae 10,5%, las cytophagaceae 9,6%, las alteromonadaceae 8,5% las rhodobacteraceae 8,2%, las oceanospirillaceae (5,7%) las pseudoalteromonadaceae 5,3% y las flavobacteriaceae (3,1%). En paralelo, 14 diatomeas han sido aisladas y exitosamente cultivadas. La caracterización molecular del 23S permitió identificar las cepas como: *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia* sp., *Asterionella formosa*. Los análisis metagenómicos de este estudio indican una predominancia de Proteobacteria y de Bacteroidetes.

Palabras clave: Metagenómica, sustratos de geotextil, bacterias, microalgas, diatomeas bentónicas, *Rhizophora mangle*.

Abstract. Metagenomics is the study of whole genomes present in environmental samples without isolating and culturing these species. Few studies have evaluated the metagenomic diversity of microorganisms associated with mangroves and none characterized photosynthetic communities. As for arable communities, various publications are related to microorganisms associated with sediment and the rhizosphere of mangroves but few studies are specific to diatoms despite their ecological importance and aquaculture. The aim of this investigation was to characterize the microbial communities developing geotextiles associated with mangrove roots and isolate strains Rhizofora diatomaceous molecularly characterized. The metagenomic analysis has been directed to 23S ribosomal DNA for plastid photosynthetic microbial communities and 16S ribosomal DNA for prokaryotes. Microorganisms were collected on artificial substrates located in the tidal channel Puerto Rico, Tumbes, Peru between the months of November 2013 to June 2014, for the analysis of 23S and March 2014 for the analysis of 16S. The metagenomic characterization aimed at the 23S level indicated that the group belongs to a prominent green algae (70,7%) dominated by unicellular algae (Prasinophyceae 50,4% Trebouxiophyceae 6,8% and Pedinophyceae 4,6%) and lesser extent by green macroalgae (mesostigmatophyceae 8,9%). Next in importance Florideophyceae red algae (13%) and flagellates (Euglenida 5,6%). The 50,9% of bacterial community was represented by 10,5% vibronaceae, the 9,6% cytophagaceae, the 8,5% alteromonadaceae, the 8,2% rhodobacteraceae, the 5,7% oceanospirillaceae, the 5,3% pseudoalteromonadaceae, and the 3,1% Flavobacteriaceae. In parallel, 14 diatoms have been isolated and successfully cultured. Molecular characterization of 23S strains identified as *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia sp.*, *Asterionella formosa*. The metagenomic analysis of this study indicate a predominance of Proteobacteria and Bacteroidetes.

Keywords: Metagenomics, geotextile carpets, substrates, bacteria, algae, benthic diatoms, Rhizofora mangle.

1 Introducción

La metagenómica (o también llamada Genómica Ambiental, o Genómica de las Comunidades, o Metagenómica), es un campo emergente que estudia las estructuras y funciones de las comunidades microbianas, no cultivables principalmente y sus interacciones con el hábitat que ocupan [1]. Estudia el conjunto de genomas presentes en muestras ambientales sin necesidad de aislar y cultivar esas especies. Pocos estudios de metagenómica han evaluado la diversidad de los microorganismos asociados a los manglares y ninguno caracterizó las comunidades fotosintéticas. En cuanto a las comunidades cultivables, varias publicaciones están relacionadas a los microorganismos asociados con los sedimentos y la rizósfera de los manglares pero pocos estudios son específicos de las diatomeas a pesar de su importancia ecológica y acuícola.

Se estima que cerca del 99% de los procariotas pertenecen al grupo de microorganismos no cultivables [2] [3]. El desarrollo de nuevos métodos moleculares ha permitido comenzar a caracterizar desde un punto de vista genómico este tipo de microorganismos no cultivables. El avance en las tecnologías de clonado y secuenciación ha posibilitado reducir la cantidad de material de partida necesario para realizar una biblioteca genómica y los costos de secuenciación. Ambos factores han generado las condiciones necesarias para posibilitar la construcción de bibliotecas genómicas de muestras complejas [4]. El principio de la taxonomía molecular moderna se basa en el uso del ADN genómico de una región dada como código de barra representativa de una especie. En este sistema, la premisa es que, las variaciones de nucleótidos coincidan con la separación biológica de las especies [5].

En la taxonomía bacteriana, la secuenciación del gen 16S ARNr y en particular de la región V4 es considerada como la técnica de referencia que desplazó los métodos clásicos de cultivos y pruebas metabólicas, y en la taxonomía de microalgas, la base de datos más grande corresponde al gen 23S propuesto por Sherwood y Presting [6] en el 2007 quienes pudieron identificar varios organismos fotosintéticos como algas rojas, verdes, marrones, diatomeas, xantophitas y euglenoides. En este estudio, se logró obtener productos de amplificación (400 - 450 pb) de las cepas aisladas y a partir de ADN total de geotextil aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1.

Las primeras investigaciones y cultivos de diatomeas bentónicas enfocadas a alimentar organismos cultivados se han realizados 30 años atrás. Por lo tanto, pocos laboratorios (con excepción a los moluscos tipo abalones) utilizan diatomeas sésiles en su dieta. De forma excepcional, algunos laboratorios de larvas de camarones de Brasil usan especies de este grupo en estadios larvarios mayores [7]. Dentro de las microalgas, las diatomeas son consideradas como los organismos más deseables, tanto al nivel silvestre como a nivel de sistemas de cultivos [8] [9]. Se estima que las diatomeas son responsables de la fijación de más del 40% del CO₂ fijado en los océanos, y más de 20% de la producción primaria global o sea el equivalente de todas las selvas tropicales [10] [11].

Las diatomeas son una de las comunidades microalgales más importantes del perifiton, la presente investigación quiso determinar, las especies de diatomeas nativas que forman parte del perifiton que se adhieren a sustratos artificiales, para posteriormente aprovecharlas, inoculadas en sustratos artificiales dentro de estanques de cultivo de langostino para desarrollar poblaciones de diatomeas que sirvan como

alimento vivo y nativo para el langostino. El hecho de que las diatomeas sean nativas del ecosistema del manglar es una ventaja para que se puedan adaptar y fijar a los sustratos artificiales dentro de los estanques, ya que estos cuentan con agua del ecosistema del manglar donde dichas diatomeas habitan.

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar las comunidades de microorganismos en desarrollo sobre geotextil asociados a las raíces de *Rhizophora mangle* y aislar cepas de diatomeas para ser caracterizadas molecularmente. Técnicamente, el trabajo permite conocer las comunidades de microorganismos y contar con cultivos de diatomeas bentónicas aisladas a partir de sustratos artificiales ubicados en canales de marea, dichos cultivos posteriormente podrán ser llevados a mayor escala y utilizarlos como inóculo de perifiton domesticado en los estanques de cultivo para mejorar la producción langostinera o acuícola.

2 Material y Métodos

2.1 Ubicación del lugar de ejecución

Las muestras fueron tomadas entre los meses de noviembre del 2013 a junio del 2014, para el análisis del 23S y en el mes de marzo del 2014 para el análisis de 16S, utilizando sustratos artificiales (fibra geotextil), colocados a lo largo del canal de marea de Puerto Rico, ubicado en Puerto Pizarro, Tumbes, Perú. Entre las coordenadas geográficas: Punto de salida en Puerto Pizarro con las Coordenadas en UTM: (Este: 0567812 y Norte: 9613165) y colocando sustratos colectores del perifiton en los puntos siguientes: 0567128E y 9612079N, 0567097E y 9612136N, 0567051E y 9612120N, 0566967E y 9612328N, 0566772E y 9612157N, 0567046E y 9612556N, 0566892E y 9612665N, 0566773E y 9612946N, El análisis de las muestras se realizó en los laboratorios de: Microcultivos y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes (Fig. 1).

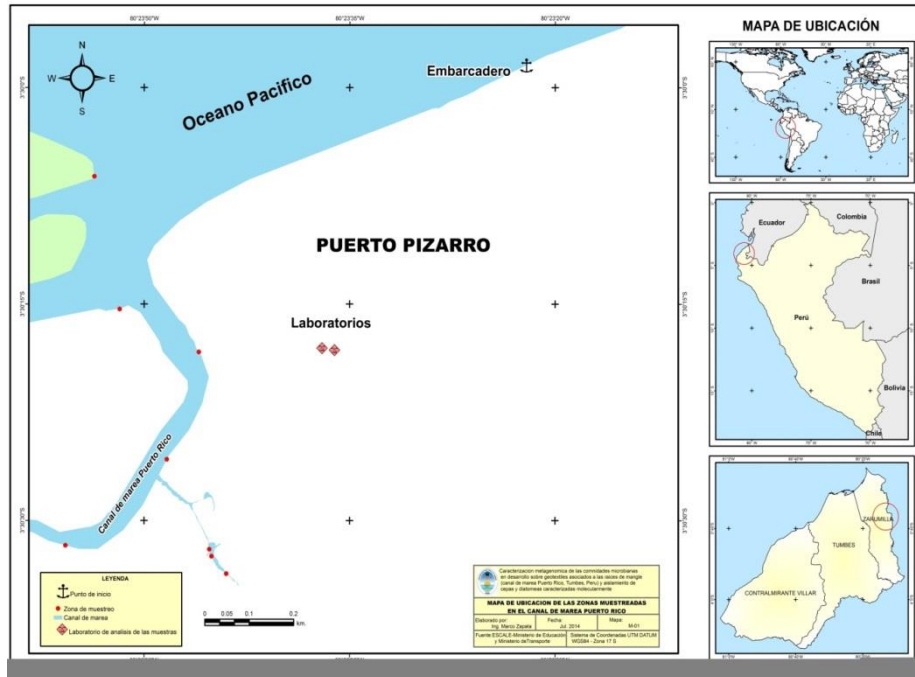


Figura 1. Lugar de ejecución de la investigación. Canal de marea Puerto Rico. Tumbes

2.2 Tratamiento de muestras y extracción del ADN

Las muestras se tomaron colocando sustratos artificiales (fibra geotextil) en diferentes puntos a lo largo de la orilla del canal de marea Puerto Rico, ubicado en Puerto Pizarro, Tumbes, con el fin de lograr la fijación de las comunidades fotosintéticas incluyendo las diatomeas bentónicas asociadas a los manglares y después de un mes fueron recolectados y llevados al laboratorio de Microcultivos de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, colocados en baldes plásticos transparentes con agua de mar nutrida con medio Guillard f/2, se le instaló aireación e iluminación constante para su conservación. Se realizaron cortes de 2 cm² que fueron colocados en tubos falcon con agua de mar filtrada y estéril, hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio de biología Molecular. Luego en tubos ependorf de 1,5 mL por duplicado, se colocó la mezcla tomada de los sustratos artificiales extraídos del canal de marea Puerto Rico, y se siguió el protocolo siguiente para extraer el ADN: Se maceró y se tomó 1,5 mL de la muestra, se centrifugó a 13 000 rpm durante 8 minutos; y se descartó el sobrenadante, se añadieron 400 µL de TENS (TRIS-HCl+EDTA+ClNa), más 2 µL de proteinasa K; luego se incubó a 37 °C por 1 hora y se adicionó 200 µL de Fenol y 200 µL de Cloroformo: Isoamyl; homogenizando lentamente; luego, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos; la fase superior fue transferida, con mucho cuidado, a un nuevo

tubo con 400 μL de etanol al 100%, helado y se dejó reposar a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora. A continuación se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con 300 μL de etanol al 75%, helado, luego se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se dejó secar cerca de un mechero y el pellet fue resuspendido en 50 μL de TE (TRIS-HCl+EDTA), se añadió 01 μL de ARN asa y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, para finalmente almacenarlo a -20 $^{\circ}\text{C}$.

Para asegurar la presencia del ADN se realizó una migración en gel de agarosa al 1% por 30 min. Posteriormente se utilizó 2 μL de la muestra para realizar la amplificación por la técnica de PCR convencional.

2.3 Amplificación por PCR

El análisis metagenómico ha sido dirigido al ADN ribosómico plastídico 23S para las comunidades microbianas fotosintéticas y al ADN ribosómico 16S para los procariontes.

Se emplearon los primers p23SrV-f1 y p23SrV-r1[6] cuyas características se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Principales Características de los Iniciadores utilizados.

Nombre	Secuencia	Descripción	Producto
p23SrV-f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	23SrDNAplastid	400 - 450 pb
p23SrV-r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	23SrDNAplastid	400 - 450 pb

Por cada reacción de PCR se adicionó: 12,5 μL de master mix 2X (2,5 μL de taq bufer, 2,5 μL de CIMg, 0,2 μL de Taq polimerasa, 0,5 de dNTPs); 9,3 μL de agua ultra pura; 0,6 μL de sondas p23srV_f1; 0,6 μL de sondas p23srV_r1 y 2 μL del ADN extraído. En la tabla 2 se detallan las condiciones de amplificación empleadas para cada juego de primers.

Tabla 2. Programa de Amplificación para los Primers.

PROCESO/PRIMERS	p23SrV-f1 / p23SrV-r1
Desnaturalización inicial	94 $^{\circ}\text{C}$ - 4 min
Número de ciclos	35
Desnaturalización	94 $^{\circ}\text{C}$ - 45 seg
Hibridación	58 $^{\circ}\text{C}$ - 60 seg
Polimerización	72 $^{\circ}\text{C}$ - 2 min
Polimerización Final	72 $^{\circ}\text{C}$ - 10 min
Conservación	04 $^{\circ}\text{C}$ - 24 h

2.4 Migración en electroforesis

La migración de los amplicones (15 μ L) se realizó en gel de agarosa al 1,5% conteniendo bromuro de etidio como sustancia de revelado (0,5 mg/mL), se utilizó como tampón de migración TAE 1 X (Tris + Ácido acético + EDTA) y como tampón de depósito azul de bromofenol al 5% durante 30 minutos a 90 voltios. Finalmente las bandas se visualizaron con luz ultra violeta, considerando que la obtención de una banda luminosa significa la presencia de fragmento de ADN de un único tamaño, mientras que la ausencia de bandas en los controles de extracción y PCR permitieron verificar que no hubo contaminaciones durante la manipulación. Una vez que se comprobó que los amplicones son correctos (presencia de una sola banda y del tamaño esperado), estos se enviaron a secuenciar (Figura 2a y 2b).

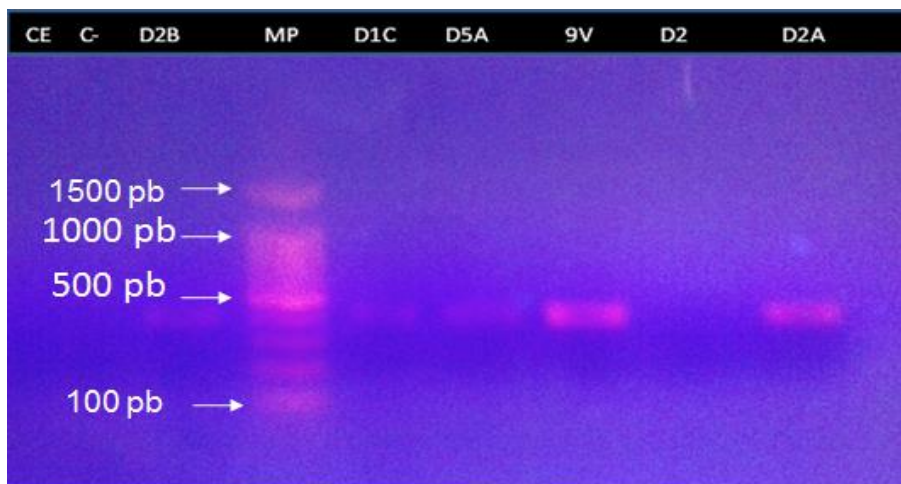


Figura 2 a. Amplificación que expresa la presencia de diatomeas aisladas de sustratos artificiales colocados en el canal de marea “Puerto Rico”. Tumbes.

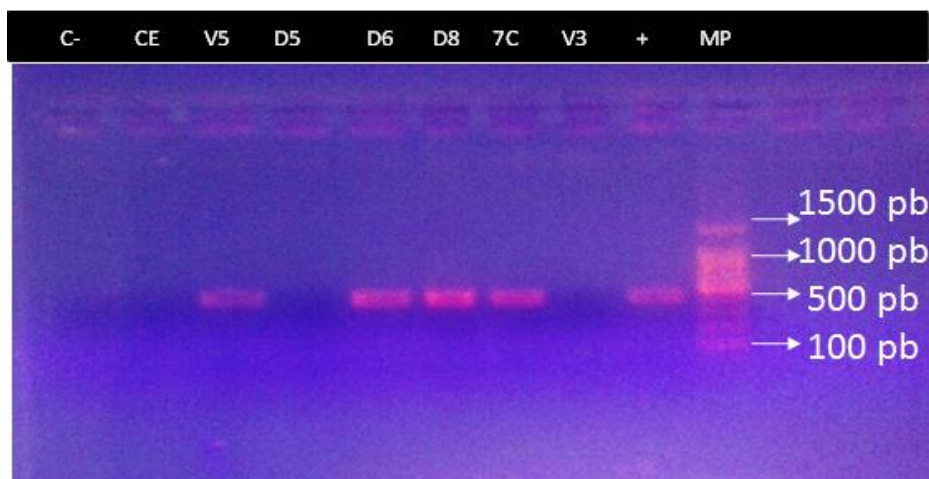


Figura 2 b. Amplificación que expresa la presencia de diatomeas aisladas de sustratos artificiales colocados en el canal de marea “Puerto Rico”. Tumbes.

2.5 Caracterización molecular de diatomeas

La identificación molecular se realizó a través de la técnica de reacción de la cadena polimerasa (PCR) y consistió en amplificar selectivamente fragmentos de ADN genómicos. Los genes amplificados son regiones “universales”, es decir que son partes de ADN conservadas en todas las especies de microalgas y que pueden ser reconocidas por un mismo tipo de iniciadores. Estas regiones contienen zonas altamente conservadas (zona de hibridación de los iniciadores) y zonas que presentan suficientes variaciones nucleotídicas para poder diferenciar los microorganismos. Para la caracterización molecular de cepas de diatomeas aisladas del perifiton, se utilizaron protocolos y kits de amplificaciones de ADN ribosomal comerciales.

2.6 Bacterias asociadas al perifiton

De igual forma se procedió a tomar las muestras para extraer el ADN de las bacterias presentes con el perifiton, de la siguiente manera:

Los tubos conteniendo el cultivo bacteriano se centrifugaron a 12 000 rpm durante cinco minutos se descartó el sobrenadante y se agregaron 700 μ L de bufer de extracción CTAB (Bromuro Cetil Triamonio) precalentado a 60 $^{\circ}$ C, se agregó 2 μ L de Beta – mercaptaethanol y 2 μ L de proteinasa K y se incubó a 60 $^{\circ}$ C por una hora. Se mezcló suavemente invirtiendo los tubos y se agregó 700 μ L de cloroformo isoamílico (24:1) y nuevamente se mezcló por inversión suave de los tubos. Se centrifugó por 10 minutos a 14 000 x g a 4 $^{\circ}$ C, el sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo y agregó 600 μ L de isopropanol (2/3 del volumen recuperado) y mezcló por inversión suave de los tubos e incubó a -20 $^{\circ}$ C durante 02 horas. Luego se

centrifugó por 15 minutos a 14 000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y agregó 500 µL de etanol al 75%. Luego se centrifugó por 10 minutos a 14 000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y secó el pellet. Luego se resuspendió el pellet en 50 µL de TE tibio y agregó 01 µL de ARN asa (D Nase-free) e incubó durante 30 min a 37 °C, para finalmente almacenar a -20 °C y para asegurar la presencia del ADN se realizó la migración por electroforesis de este material.

La amplificación por PCR se realizó empleando juegos de primers 16S RNA, se migraron los amplicones, las bandas se visualizaron con ultra violeta, y una vez que se comprobaron los amplicones correctos (presencia de una sola banda y del tamaño esperado), estos se enviaron a secuenciar igual como se hizo con las microalgas (Figura 7 del anexo).

2.7 Secuenciación y clasificación taxonómica

Los amplicones seleccionados fueron enviados a secuenciar al laboratorio Macro Gen. El análisis y comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas con las secuencias disponibles en los bancos genómicos se realizó con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible online en el sitio National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3 Resultados

La caracterización a nivel metagenómico dirigido al 23S indicó que el grupo prominente pertenece a las algas verdes (70,7%) dominadas por algas unicelulares (Prasinophyceae 50,4%, Trebouxiophyceae 6,8%, y las Pedinophyceae 4,6%) y en menor proporción por macroalgas verdes (mesostigmatophyceae 8,9%). Le siguen en importancia las algas rojas Florideophyceae (13,0%) y las flageladas (Euglenida 5,6%) (Tabla 3 y Figura 3). Y (Figura 13, 14 y 15 a y b).

Tabla 3. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo a nivel de Clase sobre geotextil asociados a las raíces de manglares durante el desarrollo del proyecto entre noviembre 2013 - junio 2014.

Clase	NOV.	ENERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	Sumatoria	%
							(N° ORG.)	Diversidad
Prasinophyceae	12676	64004	115	142424	65177	56300	340696	50,4106
Florideophyceae	121	32728	45	12419	15946	26388	87647	12,9700
Mesostigmatophyceae	104	6866	4	26733	25087	1727	60521	8,9549
Trebouxiophyceae	347	3969	13	8783	22520	10590	46222	6,8400
Euglenida	9	28342	26	1705	792	6871	37745	5,5849
Pedinophyceae	80	16087	12	12154	1653	1334	31320	4,6342

Chlamydiae	150	24596	10	96	213	316	25381	3,7554
gammaproteobacteria	21	16187	10	92	80	165	16555	2,4500
alphaproteobacteria	19	12677	9	109	494	671	13979	2,0700
chlorokybophyceae	2	4718	2	345	46	50	5163	0,7640
nephroselmidophyceae	2036	822	6	161	435	1272	4732	0,7000
Clostridia	3	1415	1	151	103	41	1714	0,2500
Flavobacteriia	1	831	0	19	13	226	1090	0,1600
Cytophagia	1	582	0	7	63	271	924	0,1360
Ulvophyceae	4	162	1	75	57	272	571	0,0840
Chlorophyceae	3	137	0	13	246	120	519	0,0767
Coccidia	0	320	0	13	2	6	341	0,0500
Caldilineae	0	205	0	4	4	2	215	0,0320
Chlorobia	0	155	0	3	1	11	170	0,0250
Spirochaetes	0	102	0	3	0	7	112	0,0160
Thermotogae	1	54	0	5	0	23	83	0,0120
Streptophyta	0	28	1	11	2	3	45	0,0070
Stramenopiles	0	29	0	1	2	0	32	0,0050
Bacilli	0	2	0	2	0	20	24	0,0040
Anthocerotopsida	0	22	0	0	0	1	23	0,0030
Deinococci	0	1	0	0	1	13	15	0,0020
Aconoidasida	0	1	0	2	0	0	3	0,0004
Total	15578	215042	255	205330	132937	106700	675842	100

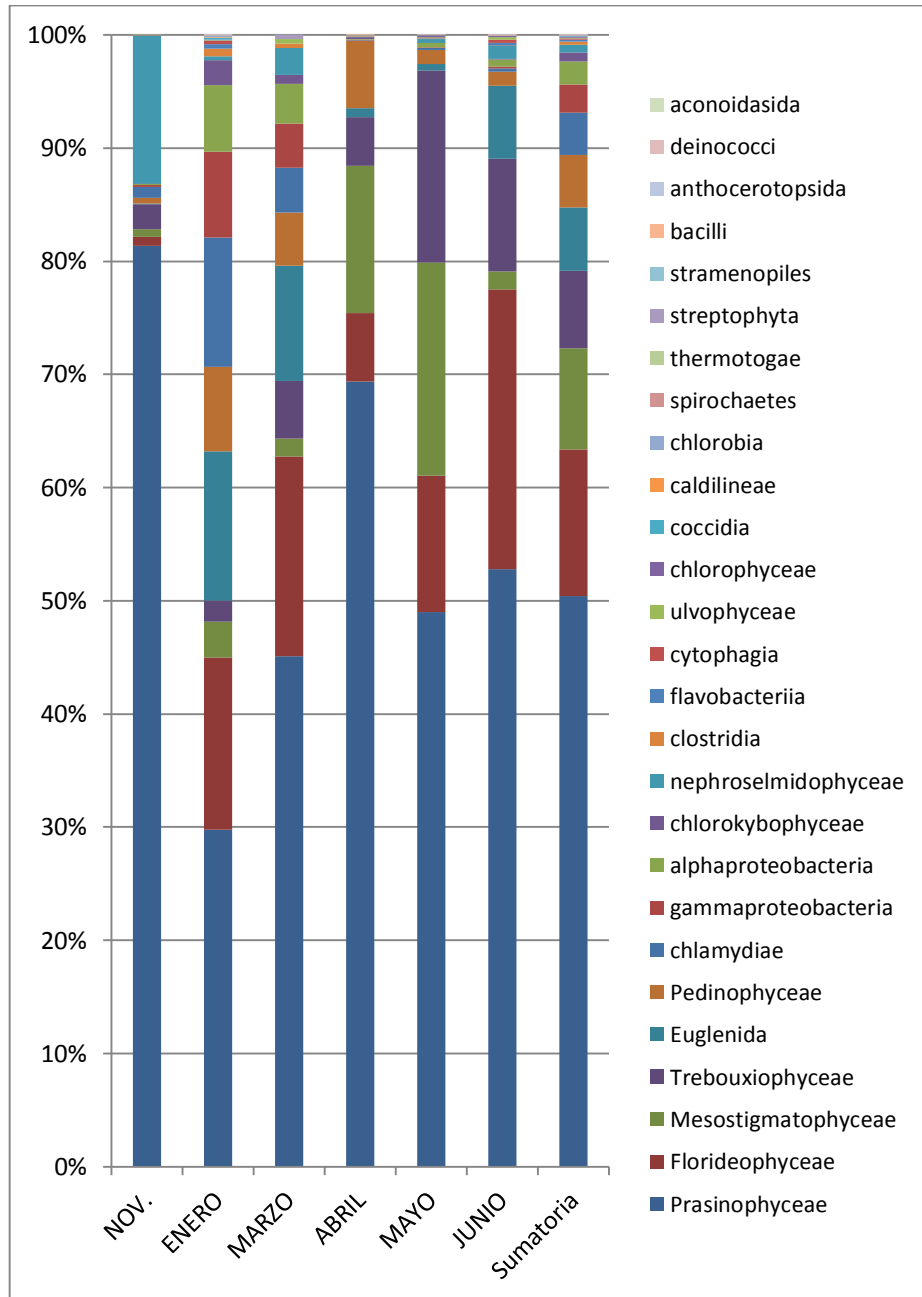


Figura 3. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo a nivel de Clase sobre geotextil asociados a las raíces de manglares durante el desarrollo del proyecto entre noviembre 2013 - junio 2014.

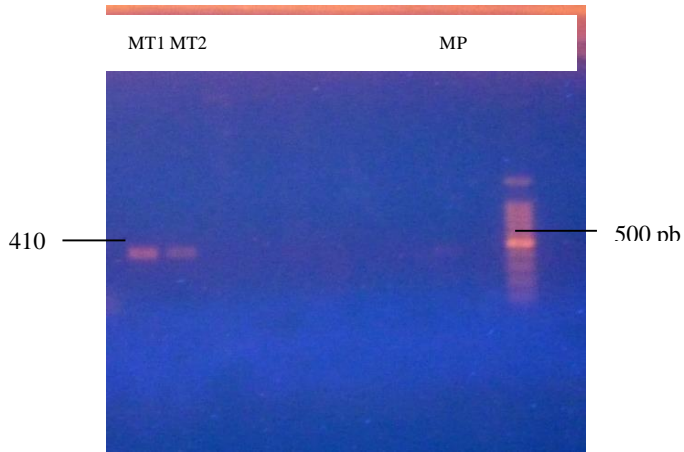


Figura 13. Metagenómica de muestras. Amplificación que expresa la migración de ADN genómico, en muestras extraídas en sustratos directamente del manglar.

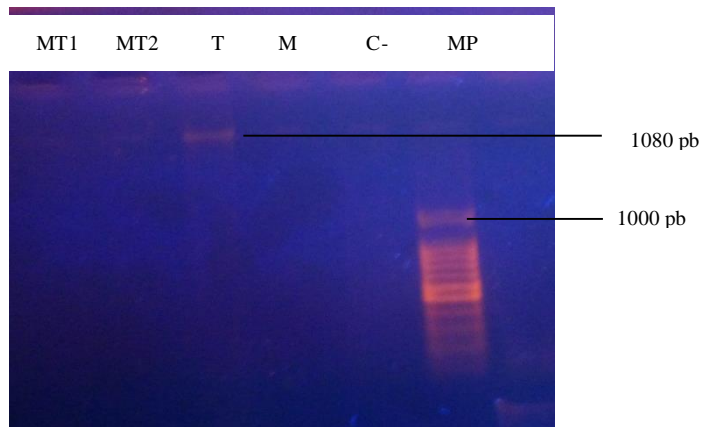


Figura 14. Metagenómica de muestras. Amplificación que expresa la migración de ADN genómico, en muestras extraídas en sustratos directamente del manglar.

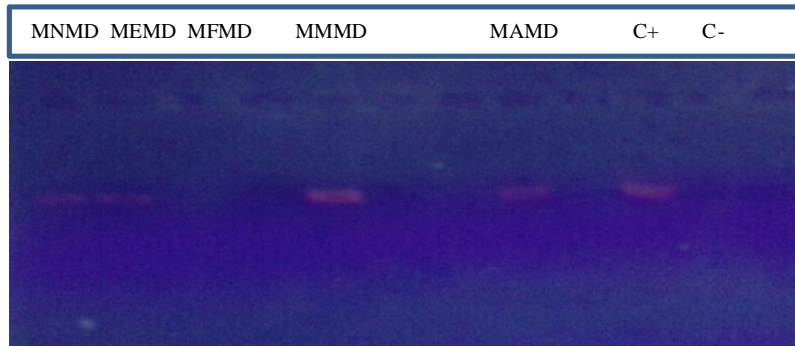


Figura 15. A. Migración de ADN genómico en muestras extraídas en sustratos artificiales directamente del manglar.

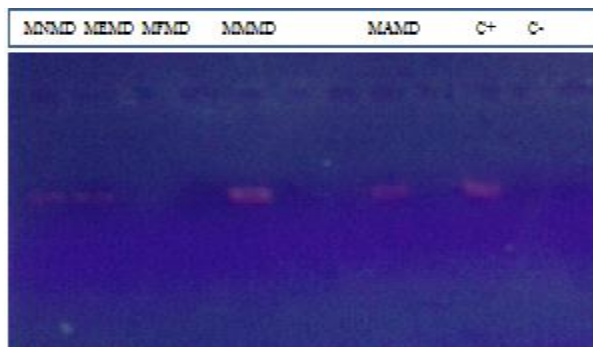


Figura 15.B. Migración de ADN genómico en muestras extraídas en sustratos artificiales directamente del manglar.

A nivel de genero la comunidad microbiana estuvo representada por: pseudoscourfieldia 32,2%, scherffelia 18,0%, halymenia 13,0%, mesostigma 8,9%, parachlamydia 3,7%, euglenaria. 2,8%, scourfieldia 2,7%, y azotobacter 2,3%, el resto están presentes en porcentaje menor del 2,0% (Tabla 4 y Figura 4).

Tabla 4. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo a nivel de Genero sobre geotextil asociados a las raíces de manglares durante el desarrollo del proyecto entre noviembre 2013 - junio 2014

Genero	Nov	Enero	Mar	Abril	Mayo	Junio	suma	%
pseudoscourfieldia	12568	14118	83	99288	44089	47726	217872	32,23
scherrffelia	46	49255	29	43099	21066	8050	121545	17,98
halymenia	121	32728	45	12419	15946	26388	87647	12,96
mesostigma	104	6866	4	26733	25087	1727	60521	8,95
microthamnion	64	489	9	6391	17453	7996	32402	4,79
parachlamydia	150	24596	10	96	213	316	25381	3,75
euglenaria	1	14618	13	883	482	3219	19216	2,84
scourfieldia	71	15081	8	1391	500	986	18037	2,66
azotobacter	20	15611	9	79	75	126	15920	2,35
pedinomonas	9	1006	4	10763	1153	348	13283	1,96
euglena	4	7399	9	555	235	2476	10678	1,58
trebouxia	5	2805	4	2241	3451	2022	10528	1,55
rickettsia	16	9325	7	79	416	594	10437	1,54
otros menor al 1%	2399	21145	21	1313	2771	4726	32,375	4,79

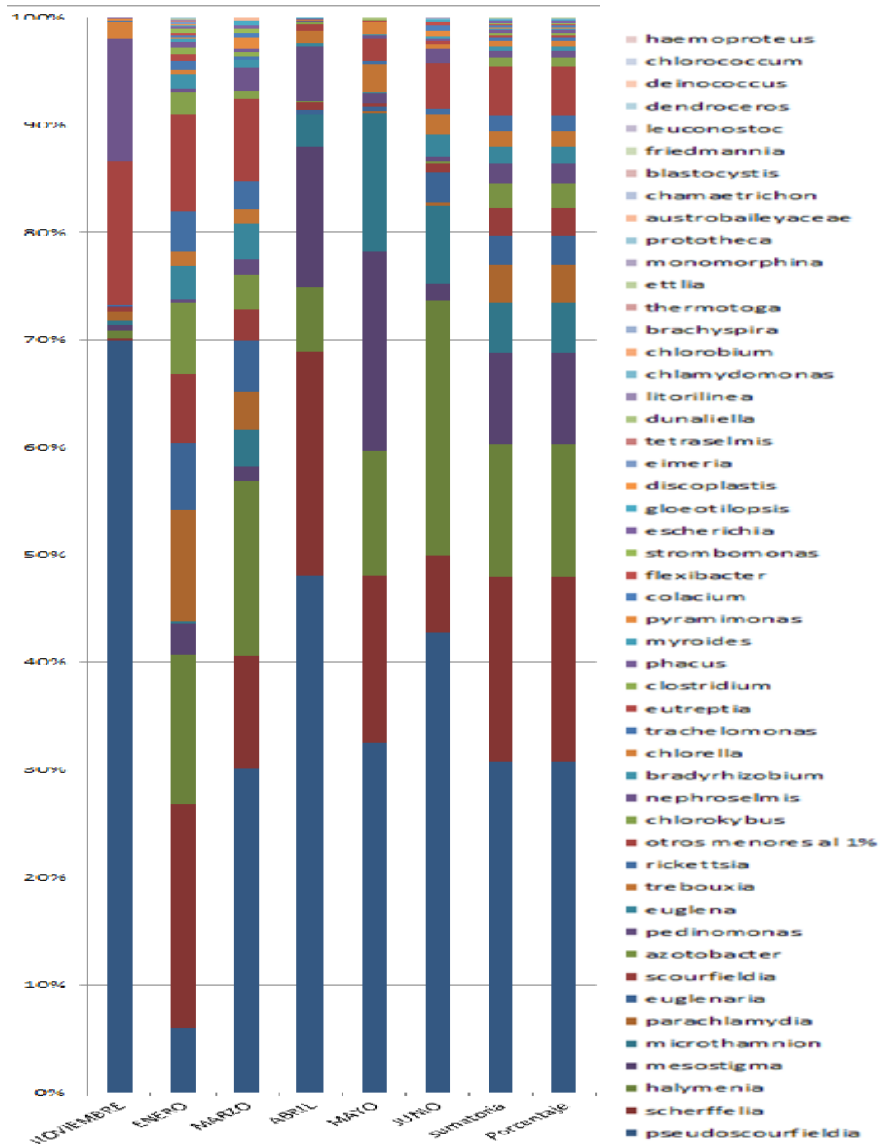


Figura 4. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo a nivel de genero sobre geotextil asociados a las raíces de manglares.

El 50,9% de la comunidad bacteriana a nivel de familia estuvo representada por: vibrionaceae 10,5%, cytophagaceae 9,6%, alteromonadaceae 8,5%, rhodobacteraceae 8,2%, oceanospirillaceae 5,7%, pseudoalteromonadaceae 5,3%, y flavobacteriaceae 3,1%. Los análisis metagenómicos de este estudio indican una predominancia de Proteobacteria y de Bacteroidetes (Tabla 5 y Figura 5).

Tabla 5. Caracterización metagenómica de las comunidades Bacterianas en desarrollo a nivel de Familia sobre geotextil asociados a las raíces de manglares en marzo de 2014

Mes de Marzo	
Familia bacterias	% Porcentaje
vibrionaceae	10,50
cytophagaceae	9,63
alteromonadaceae	8,49
rhodobacteraceae	8,19
oceanospirillaceae	5,66
pseudoalteromonadaceae	5,31
flavobacteriaceae	3,14
desulfovibrionaceae	2,53
rhodospirillaceae	2,41
planctomycetaceae	2,00
fusobacteriaceae	1,95
desulfobulbaceae	1,76
saprospiraceae	1,68
spirochaetaceae	1,63
phycisphaeraceae	1,57
gn02 (candidate division)	1,26
psychromonadaceae	1,25
flammeovirgaceae	1,22
cryomorphaceae	1,20
puniceicoccaceae	1,02
desmidiaceae	0,88
cystobacterineae	0,86
mitochondria	0,86
campylobacteraceae	0,82
colwelliaceae	0,71

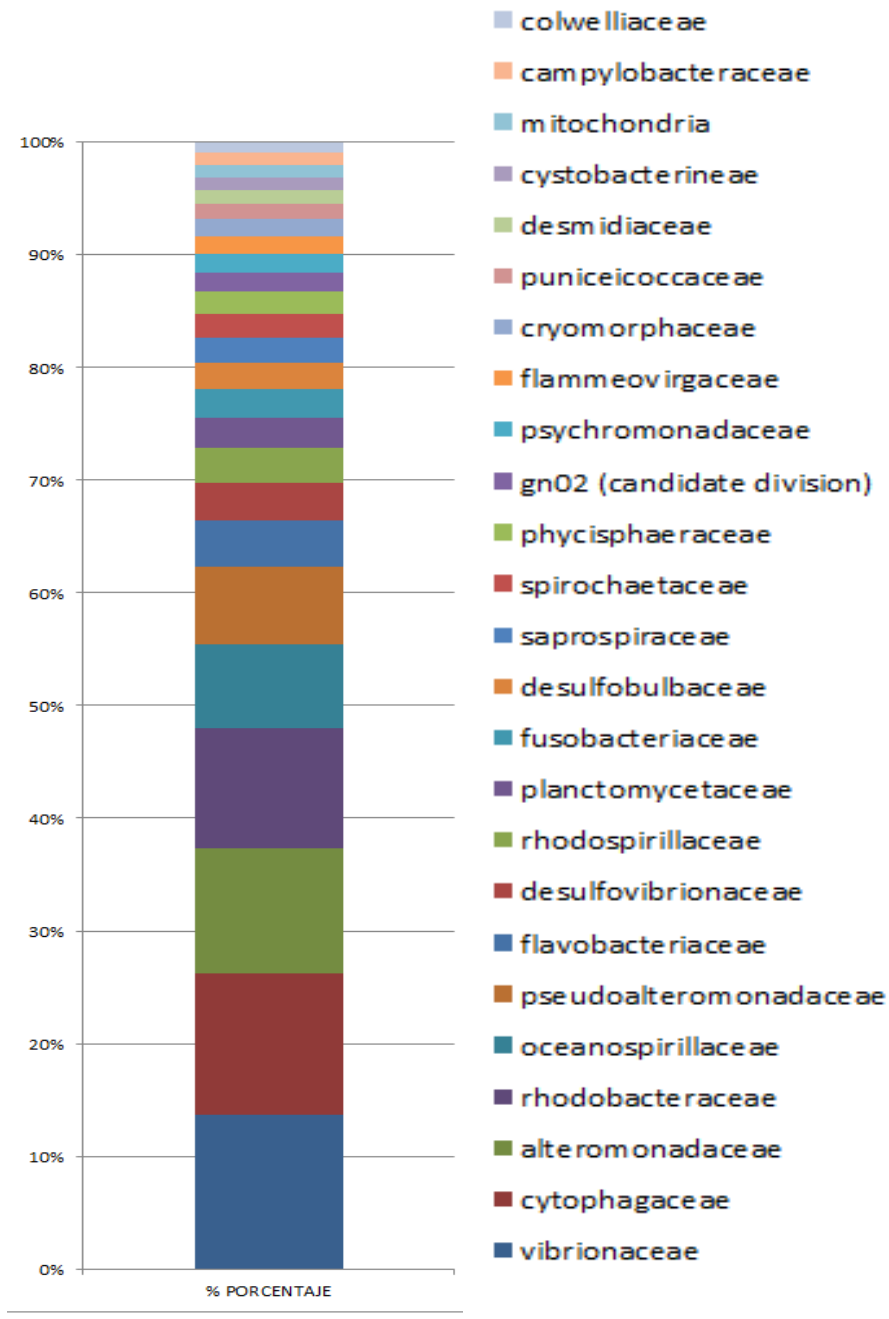


Figura 5. Caracterización metagenómica de las comunidades Bacterianas en desarrollo a nivel de Familia sobre geotextil asociados a las raíces de manglares en marzo de 2014.

A nivel de Especies de la comunidad bacteriana estuvo representada por: *Clostridium ghonii* 9,2%, *Agarivorans albus* 5,2%, *Oceanospirillum spp.* 4,1%, *Vibrio rotiferianus* 3,7%, *Pseudoalteromonas spongia* 3,4%, *Gaetbulicola spp.* 3,0%, *Desulfovibrio spp.* 2,3%, y *Alkaliphilus transvaalensis* 2,1%, el resto están presentes en porcentaje menor del 2,0% (Tabla 6 y Figura 6).

Tabla 6. Caracterización metagenómica de las comunidades Bacterianas en desarrollo a nivel de Especie sobre geotextil asociados a las raíces de manglares en marzo de 2014.

Mes de Marzo	
ESPECIE BACTERIA	% Porcentaje
<i>Clostridium ghonii</i>	9,19
<i>Agarivorans albus</i>	5,21
<i>Oceanospirillum spp.</i>	4,05
<i>Vibrio rotiferianus</i>	3,68
<i>Pseudoalteromonas spongia</i>	3,41
<i>Gaetbulicola spp.</i>	2,96
<i>Desulfovibrio spp.</i>	2,36
<i>Alkaliphilus transvaalensis</i>	2,10
<i>Vibrio ponticus</i>	1,92
<i>Fusobacterium varium</i>	1,80
<i>Borrelia spp.</i>	1,62
<i>Phycisphaera spp.</i>	1,57
<i>Thalassospira spp.</i>	1,48
<i>Vibrio vulnificus</i>	1,46
<i>Desulfotalea spp.</i>	1,45
<i>Algicola pseudoalteromonas sp._r</i>	1,32
<i>Gn02 (candidate division)</i>	1,26
<i>Alteromonas spp.</i>	1,25
<i>Psychromonas ingrahamii</i>	1,11
<i>Cloacibacterium spp.</i>	1,04
<i>Anoxynatronum spp.</i>	1,03
<i>Lewinella spp.</i>	1,00
<i>Ruegeria spp.</i>	0,99
<i>Owenweeksia spp.</i>	0,94
<i>Marinobacterium spp.</i>	0,92
Otras especies	44,74

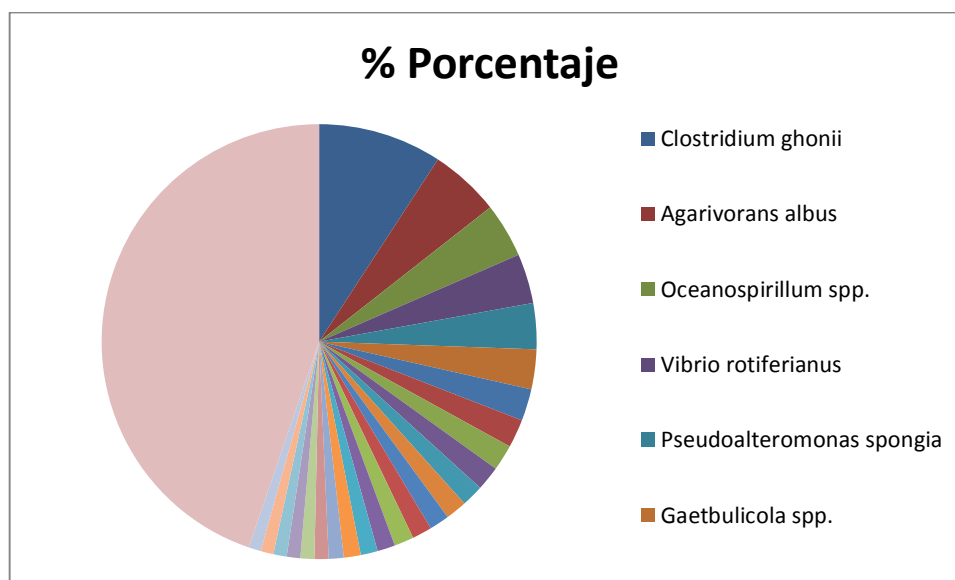


Figura 6. Caracterización metagenómica de las comunidades Bacterianas en desarrollo a nivel de Especie sobre geotextil asociados a las raíces de manglares en marzo de 2014.

De los sustratos artificiales retirados de entre las raíces del mangle, a la fecha, 14 cepas de diatomeas han sido aisladas y cultivadas. La caracterización molecular del 23S permitió identificar las cepas como: *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia sp.*, *Asterionella formosa*.

3.1 Aislamiento de diatomeas bentónicas

Se trabajaron catorce muestras, de ellas al momento se han logrado aislar cuatro cepas de diatomeas bentónicas diferentes, las restantes son repetidas, el aislamiento de ellas fue a partir de la combinación de las técnicas de diluciones sucesivas utilizando el medio Guillar $f/2$ y la siembra en medio sólido (bacto agar).

Durante el proceso de aislamiento, se pudo observar diversidad de diatomeas, pero algunas de ellas al ser sembradas en medio líquido no lograron crecer y otras crecieron únicamente en agar pero con un ritmo de crecimiento bajo.

Las cuatro cepas de diatomea aisladas fueron fueron acondicionadas satisfactoriamente en el cepario a 20 °C de temperatura y 34‰ de salinidad, bajo iluminación constante. (Tubos de 10 mL y en medio sólido).

3.2 Purificación de diatomeas bentónicas

A través de la técnica de siembra y resiembra clonales en placas, se logró obtener cultivos monoalgales de las cuatro cepas de diatomeas aisladas, pero los análisis microbiológicos reflejaron que la carga bacteriana de dichas cepas se encontraba entre 10^2 a 10^4 UFC/mL.

Con la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no se logró eliminar totalmente la concentración bacteriana de los cultivos sin afectar la viabilidad de los mismos. Al aplicar concentraciones de 30 ppm (1 hora) la carga bacteriana se redujo a 10 - 100 UFC/mL sin causar daños sobre la viabilidad de la cepa, las células algales crecieron de manera óptima al ser sembradas en agar y Guillard f/2 solidificado.

En todas las cepas, se observaron daños a mayor tiempo de crecimiento celular y carga bacteriana en tubos y botellas.

Se consideró las interacciones entre bacterias y microalgas, por ello se aisló cepas de bacterias presentes en los sustratos donde se captaron las microalgas obteniéndose tres cepas de bacterias dos de *Vibrio sp.* y una de *Vibrio alginolyticus*.

3.3 Conservación de las cepas de diatomeas bentónicas

Las cepas fueron conservadas a 4 °C en medio Guillard f/2 líquido y sólido, con un tiempo de repique mensual.

Las técnicas de criopreservación no fueron aplicadas, por la falta de reactivos. Las cepas estuvieron expuestas a condiciones de cultivo a nivel de cepario (20 °C de temperatura y 34‰ de salinidad, bajo iluminación constante, presentaron una dinámica de crecimiento normal, es decir su viabilidad no se vio afectada.

3.4 Identificación de las cepas de diatomeas

A partir de las observaciones de muestras vivas, con ayuda del microscopio binocular, se determinaron características tales como: forma general del plano valvar y pleural de cada cepa, tamaño, número y la forma del cloroplasto.

A continuación se describen cada una de las cepas aisladas con su respectivo género, considerando las características morfológicas observadas a través de la microscopía óptica:

Diatomea 1:

Cylindrotheca closterium, con 99% de cobertura y 98% de identidad (Fig. 8).

Es una diatomea bentónica unicelular caracterizada por sus valvas lineales y lanceoladas (con el ápice ligeramente curvado) y la presencia de un nódulo central.

Esta especie presenta una gran variedad de tamaño y forma, aunque en especímenes de la misma localidad, su tamaño oscila entre 30-400 μ m.

Taxonomía:

Organismo: *Cylindrotheca closterium*

Reino: Eukaryota;

Phylum: Stramenopiles;

División: Bacillariophyta;

Clase: Bacillariophyceae;

Subclase: Bacillariophycidae;

Orden: Bacillariales;

Familia: Bacillariaceae;

Género: *Cylindrotheca*;

Especie: *closterium*.

MCD1A_23Sr *Cylindrotheca closterium* Secuencia:

```
TGAATTGGACTTTATTTGCGCAGCATAGGTGGGAGGCGTTGAGTANATTC
TTGCGGGAATTTAGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTGGTAATGTTAGA
TTTCTAACTTTGTATCATTATCTGGTCAAAGAACAGTTTCAGGGCGGCAGT
TTGACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAATGGTAACGGAGGCGGTACAAAGGTTT
CCTCTGAACNGTAGAAATCGTATCTAGAGTGTAAGGCATAAGGAAGCT
TGACTGTGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGTCTTAGTGAT
CTGACGGTGCTGAGTGGAAGGCCGTCCTCAACGGATAAAAAGTTACTCT
AGGGAANCAGGCTGAA
```

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Cylindrotheca closterium chloroplast complete genome	618	1236	99%	2e-176	98%	KC509522.1
<input type="checkbox"/>	Nitzschia sp. 00196 23S ribosomal RNA gene, partial sequence, plastid	590	590	99%	2e-168	96%	EF426584.1
<input type="checkbox"/>	Eunotia sp. ECR-2014 chloroplast complete genome	585	1171	99%	9e-167	96%	KF733443.1
<input type="checkbox"/>	Asterionellopsis glacialis chloroplast complete genome	581	1163	99%	1e-165	95%	KC509520.1
<input type="checkbox"/>	Thalassiosira pseudonana chloroplast complete genome	581	1163	99%	1e-165	95%	EF087921.1

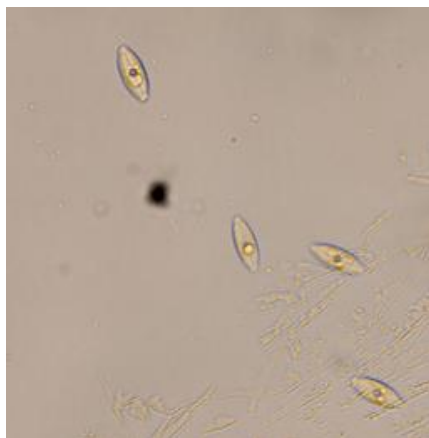


Figura 8. *Cylindrotheca closterium*.

Diatomea 2:

Lithodesmium undulatum, con 99% de cobertura y 96% de identidad (Fig. 9a y 9b).

Células solitarias en constante movimiento pero generalmente se presentan agrupadas. Valvas con margen ventral recto y margen dorsal liso y arqueado, extremos curvados, miden 5 µm de longitud y 2 µm de grosor. Con un cloroplasto en forma de “H”. El rafe es filiforme, margen dorsal sin áreas hialinas.

Taxonomía:

Organismo: *Lithodesmium undulatum*

Reino: Eukaryota;

Phylum: Stramenopiles;

División: Bacillariophyta;

Clase: Mediophyceae;

Subclase: Lithodesmiophycidae;

Orden: Lithodesmiales;

Familia: Lithodesmiaceae;

Género: *Lithodesmium*.

Especie: *undulatum*

MCD2A_23Sr_Vf1 *Lithodesmium undulatum* Secuencia:

```
AATTGGACTTTAGTCGCGCAGTATAGGTGGGAGGCGTTGAGCATATTCTTGCGGGA
ATATAGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCTTCTAATGTTAGATTTCTAACCTTGTAC
CATTATCTGGTCAAGGAACAGTTTCAGGCGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCCTC
CCAAACGGTAACGGAGGCGTACAAAGGTTTCTCTGAACGGATAGAAATCGTATC
TAGAGTATAAAGGCATAAGGAAGCTTGACTGTGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGA
CGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTACTGAGTGGAAAGGCCGTCCTCAACG
GATAAAAGTTACTCTAGGGATAACAGGCTGAA
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lithodesmium undulatum chloroplast complete genome	600	1200	99%	4e-171	96%	KC508525.1
Odontella sinensis complete chloroplast genome	596	1192	99%	5e-170	96%	Z67753.1
Nitzschia sp. 00196 23S ribosomal RNA gene, partial sequence, plastid	590	590	99%	2e-168	96%	EF426584.1
Thalassiosira pseudonana chloroplast complete genome	590	1181	99%	2e-168	96%	EF067921.1
Thalassiosira oceanica CCMP1005 chloroplast complete genome	587	1174	99%	3e-167	96%	GU323224.1

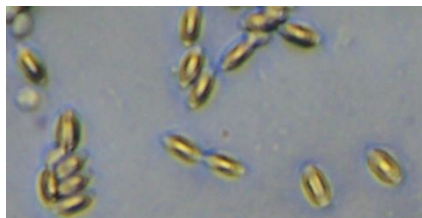


Figura 9.a. *Lithodesmium undulatum*.



Figura 9.b. *Lithodesmium undulatum* formando cadenas.

Diatomea 3:

Eunotia sp., con 99% de cobertura 97 y 98 % de identidad (Fig. 10).

Células solitarias y móviles. Valvas elípticas con extremos redondeados, vista pleural presenta forma rectangular miden 10 a 12 μm de longitud y 4 a 5 μm de grosor. Con dos cloroplastos parietales conectados por un estrecho istmo central; posee dos gránulos esféricos ubicados una en cada polo de la mitad de la célula, con dos rafes medianos filiformes.

Taxonomía:

Organismo: *Eunotia sp.*
 Reino: Eukaryota;
 Phylum: Stramenopiles;
 División: Bacillariophyta;
 Clase: Bacillariophyceae;
 Subclase: Eunotiophycidae;
 Orden: Eunotiales;
 Familia: Eunotiaceae;
 Género: *Eunotia*.
 Especie: *sp.*

MCD5B_23Sr_Vf1 *Eunotia sp.* Secuencia:

```
TTGGACTTTATTTGCGCAGTATAGGTGGGAGNCGTTGAGAATATTCTTGCG
GGAATATWGGAGYCATCAGTGAGATACCACTCTTGTAATGTTAGATTTCT
AACTTTGNATCATTATCTGGTCAAAGNACAGTTTCAGGCGGGCAGTTTGA
CTGGGGCGGTTCGCCTCCCAAACGGTAACGGAGGGCYACAAAGGTTTCCTC
TGAACGTGTAGAAATCGTATCTAGAGTGTAAGGCATAAGGAAGCTTGAC
TGTGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGACGAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGA
CGGTGCTGAGTGGAAAGGCCGTCCTCAACGGATAAAAGTTACTCTAGGG
ATAACAGGCTGAA
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Eunotia sp. ECR-2014 chloroplast complete genome	612	1225	99%	7e-175	97%	KF733443.1
Nitzschia sp. 00195 23S ribosomal RNA gene, partial sequence, plastid	605	605	99%	1e-172	96%	FF426584.1
Didymosphenia geminata chloroplast complete genome	600	1200	99%	4e-171	96%	KC508523.1
Thalassiosira pseudonana chloroplast complete genome	600	1200	99%	4e-171	96%	EF067921.1
Phaeodactylum tricornutum chloroplast complete genome	600	1200	99%	4e-171	96%	EF067920.1

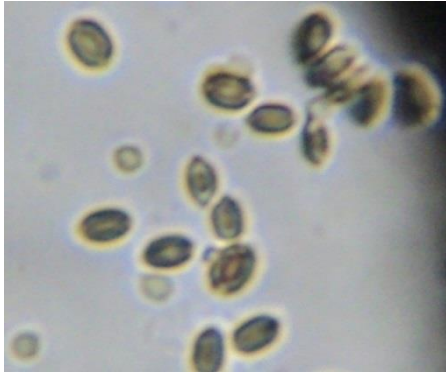


Figura 10. *Eunotia* sp.

Diatomea 4:

Asterionella formosa, con 99 % de cobertura 96 y 97% de identidad (Fig.11)

El tamaño de la célula común es del 60-80 largo y micrómetro 2-4 ancho. Diatomea que forma colonias estrelladas de unas 8 células, sino pueden disenter hasta 20 células. Cada célula presenta un lado pleural, más ancho en los extremos. Las valvas son muy estrechas con los extremos algo abultados. las células están apegadas a cada quien, las colonias a menudo se parecen a las estrellas o cadenas que sube vertiginosamente.

Taxonomía:

Organismo: *Asterionella formosa*

Reino: Chromalveolata

Phylum: Heterokontophyta

División: Bacillariophyta;

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Pennales

Suborden: Araphidineae

Familia: Fragilariaceae

Género: *Asterionella*

Especie: *formosa* Hassall (1850).

MCDV5_23Sr_Vf1 *Asterionella formosa* Secuencia:

ATTGNACTTTACTTGCGCAGTATAGGTGGGAGGTGTTGAAAATATTCTTGCGGGAA
 TATCGGAGCCATCAGTGAGATACCACTCCTGTAATGTTAGATTTCTAACTTTGGATC
 ATTATCTGGTCAAAGAACAGTCTCAGGCGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTGCGCTCC
 CAAATGGTAAACGGAGGGCGCACAAAGGTTTCCTCTGAACGGGTAGAAATCGTATCT
 AGAGTGTAAAGGCATAAGGAAGCTTGACTGTGAGACTTACAAGTCGAGCAGGGAC
 GAAAGTCGGTCTTAGTGATCTGACGGTGCTGAGTGGAAAGGCCGTCACCTAACGG
 ATAAAAGTTACTCTAGGGATAACAGGCTGAA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Asterionella formosa chloroplast complete genome	603	1207	99%	4e-172	97%	KC509519.1
Eunotia sp. ECR-2014 chloroplast complete genome	590	1181	99%	2e-168	96%	KF733443.1
Nitzschia sp. 00195 23S ribosomal RNA gene, partial sequence, plastid	590	590	99%	2e-168	96%	EF428584.1
Phaeodactylum tricornutum chloroplast complete genome	590	1181	99%	2e-168	96%	EF067920.1
Phaeodactylum tricornutum 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile, tRNA-Ala, 23S ribosomal RNA, and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence, chloroplast	590	590	99%	2e-168	96%	DQ174248.1
Didymosphenia geminata chloroplast complete genome	589	1178	99%	8e-168	96%	KC509523.1



Figura 11. *Asterionella formosa*.

3.5 Taxonomía Molecular de diatomeas

Se logró obtener productos de amplificación (400 - 450 pb) de las cepas MCD1A, MCD1C, MCD2A, MCD2B, MCD2C, MCD5A, MCD5B, MC7C, MC9V, MCDD6, MCDD8, MCDDA y MCDV5 aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1 y tras el análisis de sus secuencias, se estableció que las cepas MCD1A, MCD1C, MCDDA correspondieron a *Cylindrotheca closterium* (con 99% de cobertura y 98% de identidad), las cepas MCD2A, MCD2B, MCD2C y MCD5A correspondieron a *Lithodesmium undulatum* (con 99% de cobertura y 96% de identidad); las cepas MCD5B, MCDD6 y MC9V correspondieron a *Eunotia sp.*, (con 99% de cobertura y 98% de identidad), las cepas MCDV5 correspondieron a *Asterionella formosa* (con 99% de cobertura y 96 y 97% de identidad), mientras que la cepa MCD5 no pudo ser identificada molecularmente. En su mayoría la identificación realizada hasta nivel de género coincidió con los resultados obtenidos durante el análisis de sus respectivas secuencias.

3.6 Taxonomía Molecular de bacterias

Las cepas de bacterias presentes en los cultivos de diatomeas fueron las siguientes: Obteniéndose tres cepas de bacterias dos de *Vibrio sp.* y una de *Vibrio alginolyticus*. Tal como se muestra en las secuencias siguientes:

>140701-07_K03_MCBA_16SrRNAR800 *Vibrio sp.* Secuencia:

```
GGGGGCCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACAC
CTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCTATTCCG
AGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACACCCCCGTCATGCGCTTTACGC
CCATAATTCCNATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAG
TTAGCCGGTGCTTCTTCTGTGCGCTAACGTCAAATAATGCATCTATTAACACACTAC
CTTCCTCACACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACANACGCGCATG
GCTGCATCGGCTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
CTGGACCGGTCTCACTCC
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio sp. H-222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681	681	99%	0.0	97%	KF021884.1
Vibrio sp. H-169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681	681	99%	0.0	97%	KF021846.1
Vibrio sp. 9-4-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681	681	99%	0.0	97%	JX867745.1
Vibrio sp. enrichment culture clone BH21	681	681	99%	0.0	97%	JX486773.1
Vibrio sp. PSMJVT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	681	681	99%	0.0	97%	JQ398849.1

MCBC_16SrRNAR800 *Vibrio alginolyticus* Secuencia:

```
TCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGGCCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATC
TCTACGCATTTACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCT
GCCAGTTTCAAATGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAAC
AAACCACCTGCATGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTGCGCTAACGTCA
AANAATGCAGTATTAACACTACACNACCTTCCTCACGACTGAAAGTGCTTTACAACC
CGAAGGCCTTCTTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCA
ATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGG
CTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCCGCTTGGTGAGCCCTTACCTCAC
CAACTAGTAAATCCACCTAGGCATATCCTGACGCGAGAGGCCCGAAGGTCCTCCCT
CTTTGGCCCCGTAGGCATCATGCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTATCCCCAC
ATCAGGGCAATTTCTAGGCATTAACCTACCCGTCGCCGCTCGACGCCGTTATCGT
NCCCCGAAGGNTCAGATAACTCGTTTCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCG
CCAGCGTTCAATCTGAGCCATGACTAAACTC
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured bacterium clone SY6_54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1353	1353	100%	0.0	99%	KF521793.1
Vibrio alginolyticus NBRC 15630 = ATCC 17749 chromosome 1, complete sequence	1353	13422	100%	0.0	99%	CP006718.1
Uncultured Vibrio sp. clone ZLI-A33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1353	1353	100%	0.0	99%	JF806777.1
Vibrio alginolyticus strain BPRI053 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1353	1353	100%	0.0	99%	JF700503.1
Vibrio alginolyticus strain BPRI052 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1353	1353	100%	0.0	99%	JF700502.1

3.7 Cultivo de diatomeas

Las cepas de diatomeas aisladas fueron sembradas en placas Petri en medio sólido, mientras que el medio líquido fue utilizado para los tubos de 10 mL, en botellas de medio litro y en bolsas plásticas hasta un litro de volumen donde su crecimiento fue favorable.

3.8 Parámetros Físico – Químicos

La tabla 7 resume los parámetros físico - químicos del agua que circula por el canal de marea Puerto Rico, donde fueron colgados los sustratos artificiales entre las raíces de los mangles, dichos valores presentaron las fluctuaciones producto de las Estaciones climatológicas. En este caso, como podemos observar, La salinidad presentó variaciones, por lo general osciló entre los 30,94 y 34,17‰, y la de los cultivos varió entre 31 y 35‰. Los niveles de oxígeno se establecieron entre 5,31 y 8,73 mg/L durante todo el periodo de estudio. La temperatura fluctuó entre 24,2 y 25,4 °C, mientras que en laboratorio por efectos de estar iluminados durante todo el día se mantuvieron ente 27 y 28 °C. Mientras que el pH se mantuvo en el rango de 6,81 y 7,53 y en los cultivos varió entre 7 y 8,5. Por su lado el promedio de Nitrito como Nitrógeno (NO₂-N) fue menor de 0,05 mg/L.

Tabla7. Promedio de los parámetros Físico – Químicos, del agua del canal de marea Puerto Rico, durante las Estaciones climatológicas

Estación	Verano	Otoño	Invierno
Parametros			
Salinidad (‰)	34,17	30,94	31,72
Oxigeno (mg/L)	5,31	6,37	8,73
Temperatura (°C)	25,42	24,78	24,24
pH	7,53	6,81	6,94
Nitritos (NO ₂)(mg/L)	<0,05	<0,05	<0,05

4 Discusión

Los análisis metagenómicos de este estudio indican una predominancia de Proteobacteria y de Bacteroidetes, lo que coincide parcialmente con los resultados obtenidos a partir de muestras de suelos de manglar en Brasil cuya predominancia fue

Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria [12]. Se resalta la presencia de una gran diversidad de organismos de la comunidad bacteriana fotosintética 17 OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales), cuya contribución en el mes de marzo se podría relacionar con la estación de lluvia.

Sin embargo de estos resultados resaltan la aparente ausencia de diatomeas en los geotextiles colectados, a pesar de su presencia confirmada por las observaciones microscópicas. La aparente ausencia de diatomeas en el análisis metagenómico de la comunidad fotosintética podría resultar de un sesgo del protocolo de extracción de ADN y/o amplificación de PCR y el carácter demasiado universal del gen 23S [13]. Una posible alternativa a investigar sería realizar los estudios de metagenómica considerando genes más específicos a las diatomeas.

Esta hipótesis fue recientemente sustentada por Kermarrec et al. [13] quienes analizaron 3 marcadores moleculares (SSU rDNA, *rbcL* and *cox1*) para el análisis de mezclas de cepas de diatomeas puras y de amplicones de ADN por NGS. Estos autores detectaron casos de falsos negativos y falsos positivos cuando compararon sus resultados metagenómicos con las mezclas realizadas. En consecuencia, su recomendación consiste en optimizar los protocolos de extracción y PCR, así como seleccionar el marcador suficientemente polimórfico y que tenga una buena cobertura taxonómica en los bancos de datos genéticos.

Estos resultados son originales si se considera que a la fecha existen un número muy limitado de publicaciones de metagenómica, por tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) dedicados al estudio de microalgas [13] [14] y solamente una considerando el gen ribosomal plastídico 23S [15].

Otra posibilidad sería utilizar otros genes reconocidos como códigos de barra como SSU rDNA, *rbcL*, *cox1*, 18S, 5.8S, e ITS-2 [5] [16]. Estos autores indican que a la fecha no existe un consenso sobre un gen de referencia para la taxonomía de diatomeas, una alternativa sería integrar las secuencias de 2 genes (5.8S con ITS-2) para poder discriminar las diatomeas.

Se podría planificar una identificación morfológica de las diatomeas aisladas en este estudio e ingresar las secuencias de 23S correspondientes para completar las bases de datos internacionales y así aportar a la comunidad científica en general.

En cuanto a la identificación de las diatomeas cultivadas, las caracterizaciones obtenidas hasta el nivel de género, coincidieron con el sistema utilizado por Vera [17] y Diringer et al. [18].

Las diatomeas bentónicas, por presentar una distribución cosmopolita, se encontraron en los sustratos artificiales utilizados y colocados entre las raíces de los mangles procediéndose a buscar y aislar en un medio preparado coincidiendo con Spiniello [19]. Se trabajaron catorce muestras, de ellas al momento se han logrado caracterizar cuatro cepas diferentes, las restantes son repetidas, y debido a que no todas las diatomeas son cultivables, ya que no hay una técnica apropiada que permita su mejor sistema de cultivo [20]. Se utilizó medio sólido (agar) en la siembra y por la combinación de las técnicas de diluciones sucesivas utilizando el medio Guillard f/2 que cuenta con los nutrientes necesarios [21] [22] [23].

Por ser de fácil cultivo y de un alto valor nutricional, se reportaron diferentes diatomeas y flageladas como *Chaetoceros spp.*, *Thalassiosira fluviatilis*, *Isochrysis*, *Dunaliella*, *Skeletonema*, y *Tetraselmis*, lo que no ocurre con las diatomeas bentónicas que necesitan un mejor manejo y técnica de cultivo [24] [25]. En el

presente trabajo fueron aisladas las diatomeas: *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia sp.* y *Asterionella formosa* mientras que Vera [17] aisló 6 cepas de diatomeas bentónicas, los géneros fueron: *Amphora*, *Navícula*, *Nitzschia* y *Amphiprora*, Por su lado Diringer et al. [18] realizaron aislamientos usando micromanipuladores y aislaron cepas que presentaron los mejores potenciales de uso como: *Cymbella sp.*, *Navicula sp.* y *Amphiphora sp.*

La purificación de las diatomeas bentónicas aisladas se realizó utilizando la técnica de siembra y resiembra clónales en placas, y se logró obtener cultivos monoalgales, se tubo precaución con la aplicación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) utilizado por Vera [17] y Diringer et al. [18], por los daños a mayor tiempo causado en el crecimiento celular.

Al considerar las interacciones entre bacterias y diatomeas, se aisló cepas de bacterias presentes en los sustratos donde se captaron las microalgas obteniéndose tres cepas de bacterias dos de *Vibrio sp.* y una de *Vibrio alginolyticus*.

Las cepas fueron conservadas a 4 °C en medio Guillard f/2 líquido y sólido, con un tiempo de repique mensual, demandando gran trabajo y cuidado su conservación. Las técnicas de criopreservación no fueron aplicadas, por la falta de reactivos. La Identificación de las cepas de diatomeas se realizó con ayuda de un microscopio binocular y por taxonomía molecular. Se logró obtener productos de amplificación (400 - 450 pb) de las cepas aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1 y tras el análisis de sus secuencias se estableció que las cepas correspondieron a *Cylindrotheca closterium* (con 99% de cobertura y 98% de identidad), a *Lithodesmium undulatum* (con 99% de cobertura y 96% de identidad); a *Eunotia sp.*, (con 99% de cobertura y 96% de identidad), a *Asterionella formosa* (con 99% de cobertura y 97% de identidad), mientras que una cepa no pudo ser identificada molecularmente. En su mayoría la identificación realizada hasta nivel de género, coincidió con el sistema utilizado por Vera [17] y Diringer et al. [18] para los resultados obtenidos durante el análisis de sus respectivas secuencias.

En el caso de la taxonomía de microalgas, la base de datos más grande corresponde al gen 23S propuesto por Sherwood y Presting [6] que pudieron identificar varios organismos fotosintéticos como algas rojas, verdes, marrones, diatomeas, xantofitas y euglenoides. En este estudio, se logró obtener productos de amplificación (400 - 450 pb) de las cepas aisladas y a partir de ADN total de geotextil aplicando el juego de primers p23SrV-f1/r1.

Estos resultados no reflejan la mayor diversidad de las especies aisladas si comparamos su morfología. Esta subestimación de especies se explica porque las secuencias de estas cepas no deben estar integradas en los bancos de datos genómicos.

En consecuencia el porcentaje de similitud de identidad es relativamente bajo si consideramos que solo un porcentaje de 99% -100% permite identificar una especie (entre 97-99% a nivel de género y entre 95 y 97% a nivel de familia. Es de considerar que la taxonomía molecular de diatomea es todavía joven y que falta completar los bancos de datos para llegar a niveles de confiabilidad similares a las bases de datos bacterianas. Estas conclusiones coinciden con los estudios de Vera [17] y Diringer et al. [18] para los resultados obtenidos durante el análisis de sus respectivas secuencias.

5. Conclusiones

El grupo prominente pertenece a las algas verdes (74,6%) dominadas por algas unicelulares (Prasinophyceae 50,4%, Trebouxiophyceae 6,8%, y las Pedinophyceae 4,6%) y en menor proporción por macroalgas verdes (mesostigmatophyceae 8,9%). Le siguen en importancia las algas rojas Florideophyceae (13%) y las flageladas (Euglenida 5,6%).

A nivel de genero la comunidad microbiana estuvo representada por: pseudoscourfieldia 32,2%, scherffelia 18,0%, halymenia 13%, mesostigma 8,9%, parachlamydia 3,7%, euglenaria. 2,8%, scourfieldia 2,7%, y azotobacter 2,3%, el resto están presentes en porcentaje menor del 2%.

El 50,9% de la comunidad bacteriana estuvo representada por las vibrionaceae 10,5%, las cytophagaceae 9,6%, las alteromonadaceae 8,5% las rhodobacteraceae 8,2%, las oceanospirillaceae (5,7%) las pseudoalteromonadaceae 5,3% y las flavobacteriaceae (3,1%).

A nivel de especies la comunidad bacteriana estuvo representada por: *Clostridium ghonii* 9,2%, *Agarivorans albus* 5,2%, *Oceanospirillum spp.* 4,1%, *Vibrio rotiferianus* 3,7%, *Pseudoalteromonas spongia* 3,4%, *Gaetbulicola spp.* 3%, *Desulfovibrio spp.* 2,3%, y *Alkaliphilus transvaalensis* 2,1%, el resto están presentes en porcentaje menor del 2%.

Estos resultados resaltan la aparente ausencia de diatomeas en los geotextiles colectados, a pesar de su presencia confirmada por las observaciones microscópicas. Se estableció un cepario con las primeras diatomeas nativas propias de las comunidades perifitónicas; conformado por cuatro diferentes especies de diatomeas, empleando principalmente la combinación de las técnicas de aislamiento: diluciones sucesivas y siembra en medio sólido; lo que permitió deducir que tales técnicas a pesar de no ser selectivas, constituyen unas de las herramientas fundamentales para el aislamiento y la conservación de cepas de microorganismos.

Las diatomeas aisladas se definen como cepas no axénicas, ya que no se obtuvieron cultivos libres de bacterias; pero se destacó la importancia que representa la inclusión de este tipo de microorganismo en los sistemas de producción de diatomeas bentónicas.

Mediante la aplicación de técnicas moleculares se caracterizaron cuatro cepas de diatomeas: *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia sp.* y *Asterionella formosa* respectivamente.

Las cepas de *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium*, *Eunotia sp.*, *Asterionella formosa*, fueron cultivadas exitosamente bajo las condiciones de cultivo preestablecidas; cultivos iniciales 10 ml, 100 ml y 500 ml (20 a 22 °C, 34%, bajo iluminación constante, se adicionó aire a los cultivos de 500 mL).

Se determinó que el tiempo óptimo para realizar cada repique está dado entre el tercer y cuarto día de cultivo (fase exponencial), considerando una dilución de 1 en 10, y que la adición de aire a partir de los cultivos de 0,5 L es importante para su producción, homogeniza el medio nutritivo, limita la fijación y por ende aumenta los niveles de producción.

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento del presente proyecto. A la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar por las facilidades brindadas a las diferentes actividades de investigación.

6. Referencias

1. Chistoserdova, L.: Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnol Lett*, 2010. 32(10): p. 1351-9. (2010)
2. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995. 59(1): p. 143-69.
3. Rappe, M.S., Giovannoni, S.J.: The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 2003. 57: p. 369-94.
4. Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I.: An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. *Cell*, 2008. 134(5): p. 708-13.
5. MacGillivray, ML, Kaczmarek I.: Survey of the efficacy of a short fragment of the *rbcL* gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. *J Eukaryot Microbiol*. 2011 Nov-Dec;58(6):529-36. doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00585.x. Epub 2011 Oct 18.
6. Sherwood A.R., Presting, G.G.: Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*. Volumen 43, Issue 3, pages 605–608, (2007)
7. Alfonso, E., Leal. S.: Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas marinas. Universidad de la Habana, Centro de Investigaciones Marinas. (2000)
8. Schrader, KK, Tucker, CS: Evaluation of diquat as a potential algicide for controlling the musty-odor producing Cyanobacterium, *Oscillatoria perornata* in catfish aquaculture ponds. *J. Appl. Aquaculture* 14: 149-154. (2003)
9. Shelby RA, Schrader, KK, Tucker, A., Klesius, PH, Myers, LM: Detection of catfish off-flavour compounds by trained dogs. *Aquaculture Research* Vol. 35 Issue 9 pages 888. (2004)
10. Field, CB, Behrenfeld, MJ, Randersonand, JT, Falkowski, P.: Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281:237-240. University Press, Cambridge, N.Y. (1998)
11. Nelson, D. M.: Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycle* 9:359–72. (1995)
12. Andreote, FD, Jiménez, DJ, Chaves, D., Días, AC, Luvizotto, DM, Dini-Andreote, F., Fasanella, CC, Lopez, MV, Baena, S., Taketani, RG, De Melo, IS: The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS One*. 2012;7(6):e38600. doi: 10.1371/journal.pone.0038600. Epub 2012 Jun 21.
13. Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, JF, Bouchez, A. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic

- communities: a test for freshwater diatoms. *Ecol Resour.* 2013 Jul;13(4):607-19. doi: 10.1111/1755-0998.12105. Epub 2013 Apr 17.
14. Taib, N., Mangot, Jean-François, Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D.: Phylogenetic Affiliation of SSU rRNA Genes Generated by Massively Parallel Sequencing: New Insights into the Freshwater Protist Diversity. Published online Mar 14, 2013. doi: 10.1371/journal. (2012)
 15. Steven, B., McCann, S., Ward, NL.: Pyrosequencing of plastid 23S rRNA genes reveals diverse and dynamic cyanobacterial and algal populations in two eutrophic lakes. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012 Dic; 82 (3): 607-15. doi: 10.1111 / j.1574-6941.2012.01429.x. Epub 2012 13 Jul. (2012)
 16. Evans, KM, Wortley, AH, Mann, DG: An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist.* 2007 Jul;158(3):349-64. Epub 2007 Jun 19. (2007)
 17. Vera, V., T. P.: Utilización de microalgas (diatomeas bentónicas) asociadas al perifiton sobre sustratos artificiales en el sistema de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) realizado en la estación experimental de la Camaronera Marinazul S.A. Tumbes – Perú. Tesis de Grado. Previo a la obtención del Título de: Biólogo Marino. Universidad Estatal "Península de Santa Elena" Facultad de Ciencias del Mar. Escuela de Biología Marina. Ecuador. (2010)
 18. Diringer, B., Quimi, J., Vera, T., Mattos, C., Cayra, E., Luzardo, J., Torres, T., Mialhe, E., Emmerik, M.: El perifiton para el mejoramiento del cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei*. Tomado del Taller 26: Microorganismos para la acuicultura. Revista tilapia & camarones. El vocero de América Acuicola. Año 2, Nº 8. SLA. Ecuador. (2010)
 19. Spiniello, P.: Las Diatomeas marino costeras de Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Instituto de Zoología Tropical. Laboratorio de Plancton. *Caribbean Journal of Science*, Vol. 32, No. 4, 331-347, College of Arts and Sciences. University of Puerto Rico, Mayaguez. (1996)
 20. Siqueiros, D.: Asociaciones de Diatomeas Bentónicas Marinas; Análisis de su estructura y aplicación. Tópicos selectos sobre microalgas, Universidad autónoma de Baja California Sur, Serie Científica. 2(1): 59-71. (1994)
 21. Coll, J.: Acuicultura marina animal. Tercera edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. Pág: 328-357. (1991)
 22. Tzovenis, I., De Pauw, N., Sorgeloos, P.: Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff.galbana* (clone T-ISO). *Aquacult. Int.* 5, 489 – 507. (1997)
 23. Chu, WL, Phang SM, Goh. SH: Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *J. Appl Phycol.* 8, 389 – 396. (1996)
 24. Álvarez, H.: Cultivo de microalgas: Manual de uso para Acuicultura Tropical. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. (2003)
 25. López-Elías, JA, Voltolina, D., Nieves-Soto, M., Figueroa-Ortiz, L.: Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. (2004). In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII.

Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.16-19
Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.