



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE
BACTERIAS ASOCIADAS A LA ESPONJA
Aplysina gerardogreeni DEL GOLFO DE
CALIFORNIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

P R E S E N T A

RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ

LA PAZ, B. C. S. NOVIEMBRE DEL 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 8 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA ESPONJA

Aplysina Gerardogreeni DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

Presentada por el alumno:

ÁGUILA

Apellido paterno

RAMÍREZ

materno

RUTH NOEMÍ

nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	1	6	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
Directora de Tesis

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2ª. Directora de Tesis

DRA. SILVIE DUMAS

DR. JESÚS IVÁN MÚNILLO ÁLVAREZ

DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 14 del mes Noviembre del año 2012
el (la) que suscribe MC. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro A090167 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"CARACTERIZACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA ESPONJA

Aplysina gerardogreeni DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: cguerrer@ipn.mx - bgonzal@ipn.mx - raguilar@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

R. Noemí Águila R.

MC. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ

nombre y firma

*“ La cura para todo es siempre agua salada:
el sudor, las lágrimas o el mar”*

I. DINESEN

Este trabajo esta dedicado para las personas más especiales en mí vida, a mis padres Erasmo (q.e.p.d) y Rebeca porque gracias a ellos soy lo que soy.

A mis hermanos, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia.

A Víctor, por tu gran apoyo, amor, paciencia y por darme ánimos en esos momentos en que tanto los necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por darme las facilidades para la realización de este posgrado.

Al CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios y mi estancia en el extranjero.

A mis directoras de tesis Dra. Claudia Hernández Guerrero y Dra. Bárbara González Acosta, por animarse a compartir sus conocimientos conmigo y adentrarme en este nuevo campo de la investigación.

A los miembros de mi comité revisor Dra. Silvie Dumas, Dr. Iván Murillo y Dr. José De la Cruz, por estar al pendiente de mi desarrollo académico y por las sugerencias y comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la Universidad de Portsmouth, en especial a la Dra. Claire Hellio, a la C. Dra. Rizlene Id Daoud y a Jo Pope por el apoyo y amistad que me brindaron durante mi estancia en el Reino Unido.

A Delia Rojas por su ayuda en la obtención de los resultados de identificación.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Abigail, Sonia, Ismael, Cynthia, Yessi, Erika, Francisco y Karla con los que compartí días de frustración y de logros, gracias por su amistad y por tantos buenos momentos que espero sigamos disfrutando.

A José Borges y Alejandra Chávez por ser parte importante de este trabajo y por esos gratos momentos que compartimos en las salidas a campo.

A todas aquellas personas que hicieron posible que llevará a cabo esta meta de superación personal.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO GRACIAS A LOS APOYOS ECONÓMICOS DE
LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN: SEP-CONACYT 79707, Y DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SIP 20080250, SIP 20090866, 20100862 Y
20111046.

ÍNDICE

GLOSARIO	iii
ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	6
I. Esponjas y sus simbioses	6
II. Actividad biológica de productos naturales marinos: Bacterias asociadas.	9
II.1. Actividad antimicrobiana.	10
II.2. Actividad antiepibiótica.	11
ANTECEDENTES	13
Actividad antimicrobiana	15
Actividad antiepibiótica	17
Actividad biológica de <i>Aplysina</i> y de sus microorganismos asociados	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Obtención del material biológico.	23
Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	23
Cuantificación de bacterias por epifluorescencia	24
Identificación de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	26
Caracterización bioquímica	28
Obtención de extractos orgánicos.	29
Ensayos de actividad biológica.	29
- Frente a bacterias patógenas para el hombre	29
- Antiepibiótica	30
RESULTADOS	32
Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	32
Cuantificación de bacterias por epifluorescencia	34

Identificación de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	35
Diversidad anual.....	40
Caracterización bioquímica.....	44
Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i>	46
Actividad biológica de las bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	54
Actividad antimicrobiana.....	54
Variación temporal de la actividad antimicrobiana.....	57
Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de bacterias cultivadas.....	61
Variación temporal de la actividad antimicrobiana de los extractos.....	63
Bioensayos de actividad antiepibiótica.....	63
- Bacterias marinas.....	63
- Microalgas.....	67
DISCUSIÓN.....	71
Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	71
Cuantificación de bacterias por epifluorescencia.....	73
Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i>	77
Actividad biológica de las bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	78
Variación temporal de los extractos con actividad biológica.....	82
CONCLUSIONES.....	85
LITERATURA CITADA.....	87
ANEXO I. Características morfológicas de las cepas aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	109
ANEXO II. Comparación de grupos taxonómicos de las bacterias asociadas a la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> con secuencias reportadas en el NCBI.....	114
ANEXO III. Análisis de homologías de las secuencias de las especies.....	119
ANEXO IV. Secuencias de las bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	131

GLOSARIO

Antagonismo microbiano: interacción entre microorganismos que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

Antibióticos: sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Antiepiibiótica: proceso de inhibir o prevenir el asentamiento o acumulación de organismos en superficies sumergidas.

Bioactivos: que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

Blast: por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*. Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias en una base de datos.

Bootstrap: es un método estadístico de remuestreo que puede estimar las distribuciones por creación repetida y análisis de conjuntos de datos artificiales.

Células totipotentes: células que dan origen a otros tipos celulares.

Desnaturalización: proceso que por medio de altas temperaturas produce una separación de la doble hélice del ADN rompiendo los enlaces o puentes de hidrógeno durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Electroforesis: técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. Utilizada entre otras cosas para verificar la concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN (por ejemplo, productos de PCR).

Epifluorescencia: utiliza como fuente de iluminación la luz procedente de una lámpara que emite distintas longitudes de onda. Dependiendo del fluorocromo presente en la muestra, la luz reflejada o fluorescencia emitida por el espécimen, después de atravesar un sistema de filtros de emisión, llega al detector.

Farmacología: es la ciencia que estudia el origen, las acciones y las propiedades que las sustancias químicas ejercen sobre los organismos vivos.

Genbank: es la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN.

Halo: zona alrededor de un disco o área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

Homología: relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Hospedero: organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí.

Incrustantes: son organismos que se adhieren al casco de las embarcaciones o de cualquier material sumergido.

Morfotipo: grupo de cepas bacterianas que son distinguibles de otras debido a las características morfológicas.

Oligonucleótido: es una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos utilizados con diversos fines, uno de ellos como cebadores en reacciones de amplificación.

Secuenciación: es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Sonicación: aplicación de la energía del sonido para agitar las partículas de una muestra, con diversos fines científicos o industriales.

Solución stock: o solución madre a partir de la cual se puede hacer una disolución con la finalidad de preparar muestras a diferentes concentraciones.

SYBR Gold: un colorante de cianina que se utiliza para la tinción fluorescente de los ácidos nucleicos con una gran sensibilidad.

Taq polimerasa: es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas.

Tinción Gram: es una tinción diferencial utilizada para clasificar a las bacterias en Gram + y Gram -, de acuerdo a las propiedades de su pared celular.

Tirosina: aminoácido importante en la biosíntesis de proteínas, así como intermediario metabólico en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio
DNTP's	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido Etilenediaminotetraacético
LB	Colorante azul de bromofenol y sacarosa o glicerol
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Buffer solución salina/paraformaldehído 8%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAse	Ribonucleasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Solución amortiguadora Tris- ácido bórico- EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TSA	Agar tripticasa soya
TSB	Caldo tripticasa soya

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Esponjas y microorganismos asociados productores de metabolitos secundarios.	16
Tabla 2. Cantidad de bacterias por gramo de esponja obtenidas del conteo por epifluorescencia en cada mes de estudio. Las diferencias significativas están indicadas con letras diferentes. Tukey HSD ($p < 0.05$).	34
Tabla 3. Número de bacterias por gramo de esponja en las diferentes profundidades de recolecta	35
Tabla 4. Comparación de grupos taxonómicos de bacterias asociadas a la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> en los diferentes meses de muestreo con secuencias reportadas en el NCBI.	38
Tabla 5. Clasificación taxonómica de las bacterias asociadas a <i>Aplysina gerardogreeni</i>	43
Tabla 6. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	45
Tabla 7. Especies de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i> en los meses de muestreo.	46
Tabla 8. Bacterias por género identificadas en los diferentes meses de muestreo.	48
Tabla 9. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	55
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	63
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las bacterias que mostraron actividad antiepibiótica frente a bacterias marinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).	64
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las bacterias que mostraron actividad antimicroalgal ($\mu\text{g mL}^{-1}$).	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una esponja, capas celulares que la conforman (tomado de Brooks/Cole-Thomson Learning 2001, modificado al español).	7
Figura 2. Área de recolecta de las esponjas.....	23
Figura 3. Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i> en los meses de muestreo a) Ap0216, b) Ap0205, c) Ap0881, d)Ap0467, e) Ap02139, f)Ap02159, g) Ap02125, h) Ap0879, i) Ap04117.	32
Figura 4. Distribución porcentual de los grupos de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	33
Figura 5. Variación bimensual de cepas aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> durante el periodo de abril de 2008 a febrero de 2009.	33
Figura 6. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold en donde se muestra el ADN extraído de las bacterias.	36
Figura 7. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	36
Figura 8. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> y cepas de referencia.	41
Figura 9. Análisis de la diversidad de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	44
Figura 10. Variación bimensual de las bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i>	48
Figura 11. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> y cepas de referencia del mes de a) abril y b) junio.	49
Figura 12. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> y cepas de referencia del mes de a) agosto y b) octubre.	50
Figura 13. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> y cepas de referencia del mes de a) diciembre y b) febrero.	51
Figura 14. Porcentaje de aparición de los géneros de bacterias aisladas en los diferentes meses de muestreo.	52
Figura 15. Número de especies aisladas de la esponja <i>Aplysina gerardogreeni</i> por profundidad.....	53
Figura 16. Número de bacterias por género aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i> por género y por profundidad.	54

Figura 17. Halos de inhibición de crecimiento de a) <i>Staphylococcus aureus</i> , b) <i>Escherichia coli</i>	55
Figura 18. Número de bacterias aisladas y de aquellas que mostraron actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> en los diferentes meses.....	58
Figura 19. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de <i>A. gerardogreeni</i> con actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i>	58
Figura 20. Número de especies de bacterias aisladas y de aquellas que mostraron actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> en los diferentes meses.	59
Figura 21. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de <i>A. gerardogreeni</i> con actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i>	60
Figura 22. Número de bacterias con actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> , de acuerdo al tamaño del halo de inhibición.	60
Figura 23. Número de bacterias con actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> , de acuerdo al tamaño del halo de inhibición.	61
Figura 24. Halos de inhibición de los extractos orgánicos de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i> frente a <i>S. aureus</i>	62
Figura 25. Halos de inhibición de los extractos orgánicos de bacterias aisladas de <i>Aplysina gerardogreeni</i> frente a <i>E. coli</i>	62
Figura 26. Número de extractos activos frente a las bacterias marinas a diferentes concentraciones (0.01 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	65
Figura 27. Número de extractos con actividad antiepibiótica frente a bacterias marinas en cada mes de muestreo.	66
Figura 28. Número de extractos activos frente a bacterias marinas a las diferentes concentraciones probadas.....	66
Figura 29. Número de extractos activos frente a las microalgas de prueba a diferentes concentraciones (0.01 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).	67
Figura 30. Número de extractos con actividad antiepibiótica frente a microalgas marinas en cada mes de muestreo.	69
Figura 31. Número de extractos activos frente a microalgas marinas a las diferentes concentraciones probadas.....	69
Figura 32. Porcentaje de bacterias a nivel de género que presentan actividad antiepibiótica frente a bacterias y microalgas marinas.....	70

RESUMEN

La relación biológica entre bacterias y esponjas como fuente de productos naturales ha generado considerable interés. Las esponjas del género *Aplysina* constituyen una fuente natural de metabolitos bromados con interesantes propiedades antimicrobianas y antiepibióticas. Es bien conocido que estas esponjas contienen microorganismos asociados, que pueden llegar a representar hasta el 60% de su biomasa, por lo que esta investigación tiene como objetivo identificar las bacterias heterótrofas cultivables que se encuentran asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni*, así como la variación temporal de estas bacterias y su actividad biológica. Durante un ciclo anual, se recolectaron bimensualmente ejemplares de *A. gerardogreeni*, en Punta Arena, Baja California Sur, México a tres profundidades. El número total de bacterias se determinó mediante el método de microscopía de fluorescencia. Para obtener las bacterias susceptibles de ser cultivadas, en ambiente estéril, se tomó una alícuota de 100 μL del tejido macerado de la esponja y se sembró en placas con agar TSA, incubando de 3 a 5 días a temperatura ambiente. Las colonias aisladas se resembraron confirmando su pureza mediante la morfología colonial y microscópica (tinción de Gram). La identificación de las bacterias se realizó a través del análisis del gen ARNr 16S, mediante su amplificación por PCR y su posterior secuenciación. A partir de la biomasa de las cepas cultivables se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y con los extractos obtenidos de las bacterias se realizaron ensayos de actividad antiepibiótica. De las esponjas recolectadas en los diferentes meses y profundidades se aislaron y purificaron en total 167 cepas, de las cuales el 90.5% son Gram positivas, siendo la mayoría de ellas en forma de bacilos. El número promedio anual de bacterias fue de 9.7×10^8 cél g esponja⁻¹, presentando variaciones bimensuales, con el mayor número en febrero y el mínimo en agosto. La identificación de las bacterias mediante ADN reveló la presencia de 83 especies durante el ciclo anual, siendo las pertenecientes al género *Bacillus* las mejor representadas, ya que constituyen el 62% de las bacterias aisladas. Existe una variación temporal en el número de bacterias aisladas, encontrando una mayor cantidad y diversidad en febrero y abril y un menor número en octubre, con respecto a la profundidad no se observó una variación significativa. Los bioensayos mostraron que el 58% de las bacterias aisladas, presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* siendo las bacterias identificadas como *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* las que mostraron los mayores halos de inhibición, mientras que frente a *Escherichia coli* el 22% fueron activas, siendo *B. subtilis* y *Psychrobacter maritimus* las que mostraron los mayores halos de inhibición. En los bioensayos de actividad antiepibiótica, el 87% de los extractos

fueron activos frente a alguna de las bacterias marinas probadas. La cepa más sensible fue *Bacillus subtilis*, siendo inhibida por el 69% de los extractos, la mayoría a la más baja concentración probada (MIC de 0.01 µg mL⁻¹). El 23% de los extractos mostraron actividad frente a alguna de las microalgas probadas. La más sensible fue *Cylindrotheca closterium*, 29 extractos fueron capaces de inhibir su crecimiento a bajas concentraciones. Se observó una evidente variación temporal en la actividad antiepibiótica, siendo los extractos de febrero y junio los más activos.

ABSTRACT

The biological relationship between bacteria and sponges has obtained a substantial interest as a source of natural products generator. Sponges of genus *Aplysina* constitutes a natural source of brominated metabolites with interesting antimicrobial and antiepiibiotic properties. It is well known that these sponges have associated microorganisms, which can represent up to 40% of the biomass; therefore, the goal of present research is to identify cultivable bacteria found in associated with the sponge *Aplysina gerardogreeni*, as well as their seasonal variation and their biological activity. Specimens of the sponge *A. gerardogreeni* were collected bimonthly during one annual cycle at Punta Arena Baja California Sur, México. The total number of bacteria was determined using the fluorescence microscopy method. To obtain bacteria with the likelihood of being cultured, an aliquot of 100 µl of sponge macerated tissue was plated in TSA agar, incubating for three to five days at room temperature. The isolated colonies were purified through the colonial and microscopic morphology (Gram stain). The identification of bacteria was made with DNA amplification by PCR and its subsequent sequencing. Antibacterial activity assays were made from the cultivated strains biomass using an agar diffusion method against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; and antiepiibiotic activity assays were made with the obtained bacterial extracts. From the collected sponges in the different months and depths; a total of 167 strains were isolated and purified, from which 90.5% are Gram positive, most of them were bacilli shaped. The average annual number of bacteria was 9.7 x 10⁸ cel g sponge⁻¹, presenting bimonthly variations, with maximal numbers in February and minimal in August. DNA based bacterial identification revealed the presence of 83 species during the annual cycle; species within genus *Bacillus* were the best represented ones, since they constituted 62% of the isolated bacteria. There is a seasonal variation in the number of isolated bacteria, finding a greater quantity and diversity in February and April, and smaller numbers in October; there was no significant variation regarding depth. The bioassays showed that 58% of the isolated bacteria were active against *Staphylococcus aureus*, were bacteria identified as *Bacillus licheniformis* and *B.*

subtilis had the greatest inhibition halos, while against *Escherichia coli* 22% were active, where *B. subtilis* and *Psychrobacter maritimus* showed the greatest inhibition halos. According to the antiepiibiotic activity bioassays, 87% of the extracts were active against any of the tested marine bacteria. The most sensitive strain was *Bacillus subtilis*, being inhibited by 69% of the extracts, most of them at the lowest tested concentration (MIC of 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Twenty three percent of the extracts presented activity against any of the tested microalgae. The most sensitive one was *Cylindrotheca closterium*, 29 extracts were capable of inhibiting its growth in low concentrations. An evident seasonal variation was observed in the antiepiibiotic activity, being February and June extracts the most active ones.

INTRODUCCIÓN

Las esponjas son un recurso natural marino de gran relevancia biomédica, ya que representan una de las fuentes más prometedoras de sustancias para el desarrollo de nuevos fármacos, y es uno de los grupos más ampliamente estudiados, a partir del cual se ha obtenido el mayor número de compuestos pertenecientes a diversos grupos estructurales como terpenos, esteroides, policétidos, péptidos, alcaloides, etc. Actualmente algunos productos naturales aislados de esponjas se encuentran bajo investigación clínica o preclínica avanzada en distintas áreas terapéuticas (Newman & Cragg, 2004a, 2004b; Simmons *et al.*, 2005; Mayer & Gustafson, 2006), ya que presentan propiedades antivirales, antitumorales, antimicrobianas y citotóxicas (Faulkner, 2002; Donia & Hamann, 2003; Gustafson *et al.*, 2004; Blunt *et al.*, 2007) por lo que tienen un considerable interés biotecnológico.

Es bien conocido que las esponjas contienen de forma abundante microorganismos asociados que pueden constituir hasta el 60% del volumen total de una esponja (Hentschel *et al.*, 2003; Usher *et al.*, 2004) y tienen una gran influencia en el metabolismo y reciclaje de nutrientes, en el transporte de metabolitos a través del mesohilo de la esponja, en la rigidez estructural y defensa química mediante la producción de compuestos bioactivos, como antibióticos, antifúngicos y antidepredatorios que protegen a la esponja de organismos no deseados (Wilkinson, 1980; Osinga *et al.*, 2001). Las asociaciones simbióticas encontradas en esponjas involucran una diversa gama de microorganismos como bacterias heterótrofas, cianobacterias, anaerobios facultativos, algas unicelulares y del dominio archaea. A pesar de que la comunidad microbiana en el mesohilo de las esponjas ha sido estudiada desde hace mucho tiempo mediante microscopia (Vacelet & Donadey, 1977 citado en Müller, 2003; Wilkinson, 1978), la descripción, caracterización e identificación de las comunidades microbianas asociadas a éstas aún es escasa (Friedrich *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2002; Chelossi *et al.*, 2004). La búsqueda de los microorganismos que produzcan compuestos bioactivos es un esfuerzo que vale la pena, porque una vez que se obtenga un cultivo exitoso, el metabolito de interés

puede obtenerse en cantidades ilimitadas. Varios autores que le han dado este enfoque a sus investigaciones, se han dado a la tarea de buscar sustancias bioactivas a partir de bacterias aisladas de organismos marinos (Kon-Ya *et al.*, 1995; Bultel-Ponce *et al.*, 1998; Ramm *et al.*, 2004; Kanagasabhapahty *et al.*, 2005; Bhalla *et al.*, 2008; Blunt *et al.*, 2009).

La relación biológica entre bacterias y esponjas ha generado un considerable interés en la búsqueda de productos naturales activos, ya que a veces la fuente del metabolito es incierta. La determinación exacta de su origen resulta en ocasiones difícil, básicamente debido a complicaciones generadas en los cultivos microbianos de los simbioses. Para ello, el uso de métodos moleculares para describir la diversidad microbiana ha mejorado considerablemente el conocimiento sobre ellas (Holben & Harris, 1995; Friedrich *et al.*, 1999; 2001; Webster *et al.*, 2001; Hentschel *et al.*, 2002) mejorando así el cultivo de estos microorganismos con el diseño de nuevos medios para aquellas que hasta ahora no han podido ser cultivados, lo cual es esencial para la búsqueda de cepas productoras de compuestos bioactivos. La comprensión de las relaciones simbióticas entre las bacterias y esponjas marinas en general, puede proporcionar un mejor entendimiento de la función ecológica de algunos productos naturales bioactivos y con ello realizar una selección para el descubrimiento de fármacos potenciales combinando técnicas biológicas, químicas y moleculares (Burja & Hill, 2001).

Las esponjas del género *Aplysina* constituyen una de las fuentes naturales de metabolitos bromados biogenéticamente relacionados con la tirosina, muchos de los cuales generan gran interés debido a sus propiedades antimicrobianas, antimicobacterianas, antitumorales y antiadherentes (Kreuter *et al.*, 1990; Acosta & Rodríguez, 1992; Rodríguez & Piña, 1993; Weiss *et al.*, 1996; Hentschel *et al.*, 2001; Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; Karpushova *et al.*, 2005; De Oliveira *et al.*, 2006; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007).

En el arrecife rocoso de Punta Arena, B.C.S el género *Aplysina* se encuentra presente durante todo el año. Aunado al hecho de que este género contiene una gran cantidad de microorganismos asociados y debido a que existen antecedentes de que estas esponjas presentan actividad biológica (Montes-Plasencia *et al.*, 2010; Valencia-Agami, 2010) resulta de gran interés conocer más acerca de la comunidad bacteriana asociada a la esponja *A. gerardogreeni*, identificar los principales grupos de bacterias presentes y la actividad biológica que estos microorganismos puedan presentar.

MARCO TEÓRICO

I. Esponjas y sus simbioses.

Las esponjas son consideradas como los animales multicelulares más simples y primitivos, ya que han existido por más de 700 millones de años. Pueden encontrarse desde el ecuador hasta los polos, fijas al fondo o a los objetos sumergidos (Belarbi *et al.*, 2003). Se caracterizan por estar compuestas de células totipotentes. El cuerpo de una esponja típica está constituido por varios tipos de células dispuestas libremente; no tienen tejidos verdaderos, aunque tienen un conjuntivo bien desarrollado. Presentan un sistema de acuíferos con poros pequeños por donde penetra el agua, y poros más grandes por donde sale. En las paredes de su cuerpo se encuentra el esqueleto, formado por espículas y fibras de una sustancia elástica llamada espongina (Cifuentes *et al.*, 1999). El mesohilo es la capa en la cual se pueden encontrar fibras de soporte, espículas del esqueleto y una variedad de células ameboides conocidas como arqueocitos o amebocitos. Las capas que rodean al mesohilo son el pinacodermo, que es la superficie externa y está formada por células planas llamadas pinacocitos y el coanodermo que es la capa interna formada por células esféricas llamadas coanocitos (Müller, 2003) (Fig. 1).

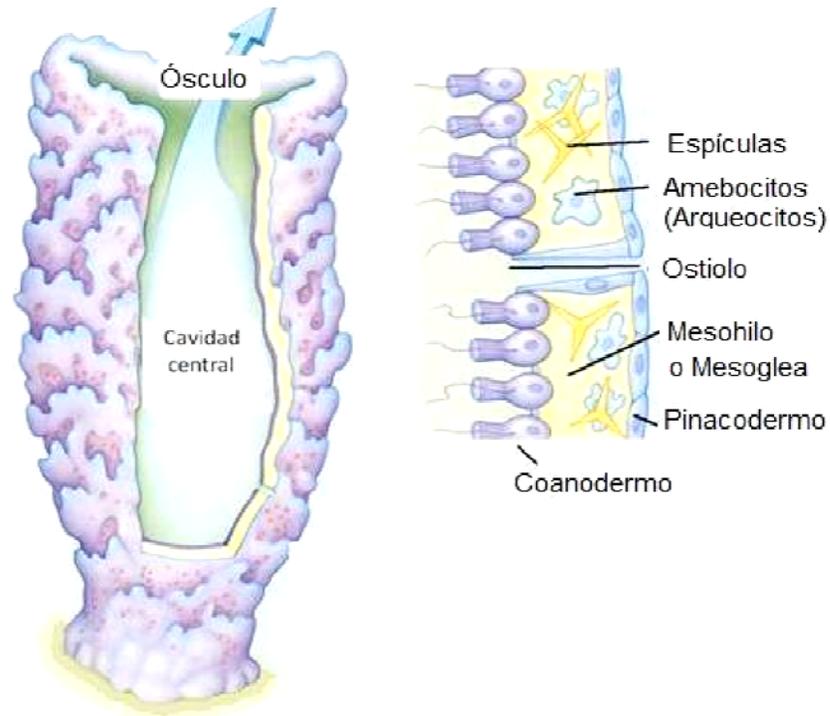


Figura 1. Esquema de una esponja, capas celulares que la conforman (tomado de <http://siera104.com/bio/porifera.html>, modificado al español).

Las esponjas son organismos sésiles que se alimentan por filtración y son capaces de bombear grandes volúmenes de agua por medio de su sistema acuífero para capturar partículas orgánicas. Debido a la eficiencia de este sistema acuífero las esponjas pueden capturar el 70% de las bacterias suspendidas en la materia orgánica (Hooper *et al.*, 2002; Brümmer & Nickel, 2003). Los microorganismos y otras partículas de alimento son transportados al interior del mesohilo de la esponja y son digeridos por arqueocitos ameboides que se mueven libremente a través de la matriz extracelular o mesoglea (Fig. 1).

Las esponjas se alimentan de partículas de hasta 50 μm , que es el tamaño máximo de los poros (Pile *et al.*, 1996; Ribes *et al.*, 1999). Los microorganismos que pueden resistir la fagocitosis forman parte de la población que habita en una esponja (Wilkinson, 1978), la cual puede constituir hasta el 60% del volumen total del invertebrado (Pabel *et al.*, 2003). Basándose en la abundancia de bacterias

asociadas a la esponja, han sido clasificadas en dos grupos, "esponjas con gran abundancia microbiana" y "baja abundancia microbiana" (Vacelet & Donadey, 1977, citado en Müller, 2003). La concentración de bacterias asociadas con "esponjas de baja abundancia microbiana" es similar a la del agua de mar. Mientras que las concentraciones de microorganismos asociados en "esponjas de alta abundancia microbiana" supera por dos o tres órdenes de magnitud la del agua del mar circundante (Friedrich *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001).

Las asociaciones entre microorganismos e invertebrados son comunes en los ambientes marinos, la mayor parte de ellas tienen un carácter metabólico en donde los organismos se benefician mutuamente. Estas asociaciones pueden proveer energía o compuestos para la supervivencia del hospedero, protegerlo de patógenos u organismos oportunistas, protegerlos de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta o sintetizar compuestos que sirvan como defensas químicas (Henstchel *et al.*, 2002). El hospedero a su vez, provee un sustrato en donde el microorganismo encuentra refugio y aprovecha los productos del metabolismo (Hill, 2004).

En cuanto a las esponjas se refiere, los beneficios que estos simbioses pueden proveer son una mejora nutricional por la incorporación de materia orgánica disuelta en el agua marina, un mejor transporte de metabolitos a través del mesohilo de la esponja, un mejoramiento de la rigidez estructural y de la defensa química ante agentes amenazadores mediante la producción de compuestos bioactivos, como los antibióticos, antifúngicos que impiden la depredación o para proteger a la esponja contra los microorganismos no deseados (Osinga *et al.*, 2001).

El mesohilo de las esponjas parece proporcionar un nicho ecológico único para especies de bacterias muy particulares. Por lo tanto, las comunidades bacterianas asociadas se han convertido en un destino interesante para la investigación microbiológica, revelando nuevas especies de bacterias e incluso nuevos Phyla con características metabólicas sin precedentes (Thoms & Schupp, 2005).

II. Actividad biológica de productos naturales marinos: Bacterias asociadas.

Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de un organismo, por otra parte los productos metabólicos que tienen funciones distintas a éstas se conocen como metabolitos secundarios. Estos compuestos juegan un papel muy importante para sus productores y sus funciones son en muchos casos de carácter ecológico, que afectan a otros organismos en el medio ambiente circundante, principalmente para detener el crecimiento de los competidores. Estos compuestos antimicrobianos también inhiben a microorganismos patógenos cuando se administran a los seres humanos (Galbis-Perez, 2004).

Varios autores han revelado un número cada vez mayor de actividades biológicas y/o compuestos estructuralmente únicos aislados de bacterias (Barsby *et al.*, 2001). En el medio natural, los antibióticos y otros metabolitos secundarios producidos por los microorganismos cumplen múltiples funciones relacionadas con su supervivencia. Su producción está sujeta a complejas redes reguladoras y, en general, es inducida en la fase estacionaria en condiciones de nutrientes limitados. En el mesohilo de las esponjas, la producción de sustancias antimicrobianas juega un papel importante en la relación antagónica bacteria-bacteria, se cree que los compuestos antimicrobianos les confieren una ventaja selectiva en el momento de la competencia con otras bacterias que habitan el mismo nicho ecológico. Otra función importante de los metabolitos secundarios producidos por bacterias es la capacidad para escapar de la digestión mediante la prevención de la fagocitosis por los arqueocitos de la esponja, una propiedad crucial para su supervivencia (Hentschel *et al.*, 2001).

En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas de interés, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento, ya que la supervivencia de los organismos con éstas características no se basa en la velocidad de natación ni en defensas físicas, sino en

la generación de arsenales químicos, producto de su metabolismo secundario de elevada complejidad, que se utilizan para el ataque y la defensa frente a otras especies (Jiménez *et al.*, 2007). Las esponjas producen una gran variedad de productos químicos para repeler y alejar a los depredadores (Uriz *et al.*, 1996; Pawlik *et al.*, 2002), para competir por el espacio con otras especies sésiles (Porter & Targett, 1988; Becerro *et al.*, 1997) y para la protección contra infecciones (Belarbi *et al.*, 2003). Han sido consideradas como una mina de oro durante los últimos cincuenta años, debido a la diversidad de sus metabolitos secundarios (Koopmans *et al.*, 2009). Este grupo es uno de los más ampliamente estudiados y a partir del cual, se ha obtenido el mayor número de compuestos biológicamente activos con potencial biomédico (Faulkner, 1997; Duckworth & Battershill, 2003).

II.1. Actividad antimicrobiana.

Algunas enfermedades infecciosas producidas por bacterias como la tuberculosis o el cólera han causado grandes mortalidades en niños y jóvenes adultos (Tibayrenc, 2007). Por lo general, se han utilizado dos grupos de agentes antimicrobianos en el tratamiento de estas enfermedades. El primero de ellos incluye los antibióticos, los cuales son compuestos naturales producidos por ciertos grupos de microorganismos y el segundo comprende los agentes quimio-terapéuticos que son sintetizados químicamente. Dentro de éste último grupo surgen también las sustancias híbridas, que son antibióticos semisintéticos producidos en un principio por los microorganismos y que luego son químicamente modificados para obtener un efecto deseado o evitar los efectos tóxicos de la droga principal (Cordiés *et al.*, 1998).

El descubrimiento del cloranfenicol, estreptomina, gentamicina, tetraciclina y otros antibióticos estimuló a la industria a desarrollar más investigación y programas para el descubrimiento de productos naturales activos (Cordiés *et al.*, 1998). Sin embargo, el continuo uso indiscriminado de antibióticos ha tenido como consecuencia la aparición de cepas de bacterias multiresistentes a los antibióticos comúnmente utilizados, como es el caso de *Staphylococcus aureus* (cepa resistente

a la meticilina), la cual es encontrada frecuentemente en pacientes de centros de salud, principalmente en enfermos de SIDA, pacientes de quimioterapia de cáncer o por trasplante de órganos (Usama, 2010). En 2005 se registraron más de 19 mil casos de *S. aureus* resistentes a meticilina relacionados con muertes en Estados Unidos (Centro de control de enfermedades de los E.U.) y en el Reino Unido, las muertes relacionadas con ésta especie han aumentado considerablemente de 51 en 1993, a 1652 en 2006 (Oficina de estadística Nacional, U.K.; Kennedy *et al.*, 2009). En México, se ha observado que la frecuencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina es elevada (50-85%) (Miranda-Novales, 2011). La Red hospitalaria de vigilancia epidemiológica reportó que en el período de 1998-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

Los mecanismos de resistencia consisten principalmente en la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos y diversas especies de bacterias (Daza, 1998). Por ello, el aumento de los problemas por la creciente resistencia de numerosos agentes patógenos junto con la aparición de nuevas enfermedades infecciosas agregado a los efectos tóxicos de algunos de los medicamentos utilizados, exige la búsqueda de nuevos medicamentos anti-infecciosos (Usama, 2010).

II.2. Actividad antiepibiótica.

En los ambientes acuáticos, la epibiosis es un proceso natural de colonización de superficies sumergidas, ya sean artificiales (o permanentemente húmedas) o en organismos vivos, en donde intervienen varios organismos, desde las bacterias hasta los invertebrados. A pesar de la alta variabilidad de las condiciones ambientales y la gran diversidad de organismos involucrados, se observa con frecuencia una secuencia general de la colonización en el asentamiento y el final establecimiento de una comunidad compleja. Después del acondicionamiento inicial de las superficies

sumergidas, las bacterias pioneras se adhieren y eventualmente forman un biofilm o biopelícula compuesta de varias especies (Hutchinson *et al.*, 2006). La complejidad de la comunidad microbiana, a menudo referida como "*microfouling*" se incrementa cuando las microalgas (especialmente las diatomeas), hongos y protozoos están presentes en la biopelícula (Briand, 2009).

La prevención de la adhesión o acumulación de organismos incrustantes en las superficies incluye tanto los procesos biológicos con fines defensivos utilizados por macroorganismos para limitar la epibiosis, como la tecnología aplicada para proteger estructuras artificiales sumergidas, tales como equipos de acuicultura, dispositivos ópticos y cascos de buques, en los cuales causa desde la corrosión prematura, hasta la disminución en la eficiencia del combustible (Yebra *et al.*, 2004).

Las compañías navieras han empleado pinturas que utilizan como base compuestos tóxicos como arsénico y mercurio para contrarrestar los efectos de los organismos epibiontes. A partir de la década de 1960 se difundió el uso de *TBT* (tributiltina), sin embargo los efectos adversos de este compuesto en el ambiente, tales como contaminación, daños a organismos terrestres y marinos de consumo humano, así como posibles mutaciones genéticas que ocasionan en poblaciones animales expuestas, hicieron inminente la prohibición de este compuesto en la fabricación de productos con fines anti-incrustantes (Yebra *et al.*, 2004). Además, existe incertidumbre sobre el impacto ambiental de algunos de los biocidas actuales disponibles comercialmente, tales como el cobre y zinc.

En los últimos años, la aplicación de compuestos antimicrobianos naturales en la prevención de la contaminación biológica marina, ha despertado un gran interés para la industria, en especial la naviera. El principal enfoque de estas investigaciones es la búsqueda de compuestos que eviten la formación de biopelículas, previniendo también la biocorrosión en objetos sumergidos como tuberías, por consecuencia del ácido producido por las bacterias anaeróbicas (Briand, 2009).

ANTECEDENTES

Los primeros estudios que reportan la presencia de un gran número de bacterias en las esponjas fueron realizados mediante microscopia (Levi & Levi, 1965; Vacelet & Donadey, 1977 citado en Müller, 2003; Wilkinson, 1978). Wilkinson fue uno de los pioneros en el campo, creó una colección extensa de cepas de bacterias aisladas de tres esponjas de Australia y las clasificó de acuerdo a un conjunto de características metabólicas y fisiológicas (Wilkinson, 1978; Wilkinson *et al.*, 1981).

Más recientemente, la aplicación de técnicas moleculares que permiten identificar bacterias sin tener que cultivarlas, como la secuenciación del gen 16S del ácido desoxirribonucleico (ADNr), la electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE), el análisis de conformaciones polimórficas de una sola hebra (SSCP) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) han contribuido al conocimiento de las comunidades microbianas, clasificando e identificando no solo las bacterias cultivables sino todas aquellas que habitan en el tejido de las esponjas (Lee *et al.*, 2001; Imhoff & Stöhr, 2003; Hill, 2004; Hentschel *et al.*, 2006; Olson & Kellogg, 2010). Estas técnicas permitieron describir una gran gama de microorganismos que incluyen bacterias heterótrofas, cianobacterias, anaerobios facultativos, algas unicelulares y del dominio archaeae (Friedrich *et al.*, 1999; Manz *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2001; 2002; Margot *et al.*, 2002; Pabel *et al.*, 2003; Webster *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios sobre asociaciones esponja-microorganismo reportan la diversidad ya sea en un huésped en particular o en un grupo de esponjas (Webster & Hill, 2001; Taylor *et al.*, 2007). Los Phyla más comúnmente encontrados en esponjas y que han sido reportados como metabólicamente activos son los pertenecientes a los Acidobacteria, Chloroflexi y Proteobacteria (Webster & Hill, 2001; Fieseler *et al.*, 2004; Scheuermayer *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Wehrl *et al.*, 2007). Además, se han encontrado otros géneros en menor proporción como *Nitrospira*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia* aislados de diversas esponjas marinas

(Althoff *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2001; Hentschel *et al.*, 2002; Enticknap *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Montalvo & Hill, 2011). Webster *et al.* (2010) realizaron una compilación de secuencias de genes ADNr 16S de bacterias asociadas a tres esponjas que incluyen representantes de 23 Phyla de bacterias, dominando las α , γ y δ - Proteobacterias así como las Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacterias, Firmicutes y el Phyla candidato "Poribacteria".

La mayoría de los estudios con esponjas del género *Aplysina* se han realizado en el mar Mediterráneo. Friedrich *et al.* (1999) mediante *FISH* encontraron que la gran mayoría de las bacterias presentes en el mesohilo de *A. cavernicola* pertenecen al dominio de bacterias con bajo contenido en GC (Guanina-Citosina). Entre estas, las δ - Proteobacteria fueron las más abundantes, seguidas por las γ - Proteobacteria. Hentschel *et al.* (2001) en un estudio enfocado a búsqueda de actividad biológica con *A. aerophoba* y *A. cavernicola* aislaron bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Arthobacter* y *Micrococcus*, así como α y γ - Proteobacteria. Fieseler *et al.* (2004) encontraron y describieron un nuevo candidato a Phyla al que llamaron Poribacteria en un estudio realizado con *A. aerophoba*, *A. fistularis*, *A. insularis*, *A. lacunosa*, *Verongula gigantea* y *Smenospongia aurea*. En Brasil, Haroim *et al.* (2009) analizaron la composición de bacterias de la esponja *A. fulva*, siendo las Cyanobacterias, Chloroflexi, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria las más abundantes.

Aplysina fistularis, *A. cavernicola* y *A. aerophoba* son llamadas bacterioesponjas o de alta abundancia microbiana (Hentschel *et al.*, 2006), debido al alto porcentaje de bacterias en relación con su biomasa, la concentración bacteriana estimada de *A. aerophoba* equivale a $6.4 \pm 4.6 \times 10^8$ bacteria g^{-1} de tejido de esponja (arriba del 40%) (Friedrich *et al.*, 2001).

Actividad antimicrobiana.

Varios estudios muestran que las bacterias marinas son capaces de producir compuestos bioactivos que no han sido aislados de especies terrestres (Fenical, 1993; Fenical & Jensen, 1993; Williams, 2009). Desde el descubrimiento del primer compuesto antibiótico producido por la bacteria marina *Alteromonas* sp. aislada de los pastos marinos del Caribe *Thalassia* sp. en 1966 (Fenical, 1993), el número de nuevos compuestos aislados de bacterias marinas se ha incrementado sustancialmente. Algunos de estos compuestos ya están en ensayos clínicos farmacológicos y otros son usados como agentes de control biológico en la acuicultura (Faulkner, 2000; Williams, 2009).

A partir de esponjas marinas se han obtenido microorganismos con actividad antimicrobiana, la mayoría de los estudios se han enfocado en realizar bioensayos utilizando cepas clínicas resistentes como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, entre otras (Bultel-Ponce *et al.*, 1998; Hentschel *et al.*, 2001; Thiel & Imhoff, 2003; Chelossi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005; Anand *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2009; Devi *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). En muchos de los casos se ha logrado aislar el o los compuestos responsables de la actividad (Tabla 1).

Existe una especulación de la contribución de los microorganismos en el metabolismo secundario de las esponjas, ya que comprenden una parte substancial del total de una esponja, sin embargo ha sido difícil probarlo (Faulkner *et al.*, 1999) ya que a fin de proporcionar evidencia inequívoca, el microorganismo tiene que producir el compuesto de interés en condiciones de laboratorio, pero una vez fuera de su hábitat natural, cambian a menudo su perfil metabólico, debido a las condiciones de crecimiento alterado por la falta de presión selectiva.

Tabla 1. Esponjas y microorganismos asociados productores de metabolitos secundarios.

Esponja	Microorganismo	Producto Natural	Referencia
<i>Aciculites orientalis</i>	Bacteria filamentosa	Theonegramida	Bewley <i>et al.</i> , 1996
<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Esteres	Karpushova <i>et al.</i> , 2005
<i>Dysidea herbacea</i>	Cianobacteria	Metabolito clorado	Unson & Faulkner, 1993
<i>Dysidea herbacea</i>	<i>Oscillatoria spongelliae</i>	Difenil éter polibromado	Unson <i>et al.</i> , 1994
<i>Dysidea</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.	Difenil éter bromado	Elyakov <i>et al.</i> , 1991
<i>Halicondria okadai</i>	<i>Alteromonas</i> sp.	Alteramide A	Shigemori <i>et al.</i> , 1992
<i>Halicondria okadai</i>	<i>Prorocentrum lima</i>	Ácido okadaico	Kobayashi & Ishibashi, 1993
<i>Halicondria panicea</i>	<i>Antarcticum vesiculatum</i>	Compuesto neuroactivo	Perovic <i>et al.</i> , 1998
<i>Halicondria panicea</i>	<i>Psychroserpens burtonensis</i>	Compuesto neuroactivo	Perovic <i>et al.</i> , 1998
<i>Homophymia</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Antimicrobianos	Bultel-Ponce <i>et al.</i> , 1998
<i>Suberea creba</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Quinolonas	Debitus <i>et al.</i> , 1998
<i>Tedania ignis</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	Dicetopiperazina	Stierle <i>et al.</i> , 1998
<i>Theonella swinhoei</i>	Bacteria filamentosa	Theopalauamida	Schmidt <i>et al.</i> , 2000
<i>Theonella swinhoei</i>	Bacteria unicelular	Swinholida A	Schmidt <i>et al.</i> , 2000

A pesar de los recientes avances en el cultivo de nuevas bacterias marinas, hay pocos ejemplos de bacterias asociadas a invertebrados que produzcan el metabolito original en cultivo (Hentschel *et al.*, 2001), como es el caso de la esponja *Hyatella* sp. de la cual se aisló a *Vibrio* sp., esta bacteria produjo el péptido andrimida, misma sustancia bioactiva que fue encontrada en el extracto de la esponja, por lo que sugieren que el compuesto es sintetizado por el microorganismo asociado y no propiamente por la esponja (Oclarit *et al.*, 1994). Asimismo, la manzamina A, un compuesto que presenta efectos citotóxicos, insecticidas, y antibacterianos se aisló originalmente de esponjas del género *Haliclona* en Okinawa (Sakai *et al.*, 1986), y posteriormente se aisló de un microorganismo marino, perteneciente a los Actinomicetos (*Micromonospora*), por lo que se sospecha que el origen de este compuesto sea por microorganismos asociados a *Haliclona*. Además este compuesto ha sido encontrado en 17 especies diferentes de esponjas con una amplia distribución geográfica, con lo cual queda la especulación de que podría ser producida por los microorganismos y no por las esponjas (Peraud, 2006).

Han sido descritas diversas bacterias marinas con actividades antimicrobianas por más de 50 años (Rosenfeld & Zobell, 1947). Sin embargo, en la actualidad, la literatura en México acerca de la diversidad microbiana de nuestras costas es dispersa o escasa (Cetina *et al.*, 2010), especialmente en relación con microorganismos asociados a invertebrados productores de compuestos antimicrobianos frente a bacterias patógenas humanas.

Actividad antiepibiótica.

Una gran variedad de productos naturales marinos aislados de macroorganismos, como macroalgas e invertebrados, han mostrado actividad en bioensayos de laboratorio frente a organismos marinos identificados como incrustantes (Clare, 1998; Rittschof, 2001). Los microorganismos marinos son prometedoras fuentes potenciales de compuestos antiepibióticos no tóxicos o menos tóxicos, ya que pueden producir sustancias que inhiben no sólo la fijación y/o crecimiento de otros microorganismos, sino también la fijación de esporas de macroalgas, larvas e invertebrados. Sin embargo, la información sobre actividad antiepibiótica a partir de microorganismos marinos, es bastante limitada en comparación con la de macroorganismos (Fusetani, 2004).

La identificación de biocidas y recubrimientos eficaces requiere de ensayos de laboratorio para detectar numerosos candidatos ya que la evaluación directa en el océano sería muy costosa, se requerirían grandes cantidades de productos de prueba y tiempos de inmersión prolongados. Se han llevado a cabo bioensayos con el fin de dilucidar el mecanismo de defensa química en el control de epibiosis (Dobretsov & Qian, 2004; Dworjanyn *et al.*, 2006; Nylund *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007), así como evaluar su variación en el tiempo y en el espacio (Hellio *et al.*, 2004; Marèchal *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios se han enfocado en comprender la influencia de la colonización inicial por parte de las bacterias en la inhibición del asentamiento y crecimiento de la macrofauna (De Nys *et al.*, 1995; Maximilien *et al.*, 1998; Dobretsov & Qian, 2004; Dobretsov *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2006; Nylund *et al.*, 2007).

Para el descubrimiento de nuevos biocidas se han realizado ensayos con especies dominantes. En algunos sin embargo, se usa una sola especie de macroorganismo debido a la dificultad y los costos de cultivo de estos organismos bentónicos, por el contrario, para los ensayos de *microfouling*, generalmente se utilizan consorcios mixtos principalmente de los microorganismos involucrados, es decir, bacterias, microalgas y/o diatomeas (Kobayashi & Okamura, 2002; Da Gama *et al.*, 2003; Briand, 2009).

Se han realizado pocos estudios con bacterias asociadas a otros organismos, uno de ellos es el de Egan *et al.* (2000) quienes realizaron ensayos de actividad antiepibiótica con bacterias aisladas del alga *Ulva lactuca*. Todas las cepas fueron capaces de prevenir el asentamiento de larvas de invertebrados y la germinación de esporas algales. Tres de las cepas también inhibieron el crecimiento de una variedad de bacterias y hongos probados. Se ha reportado también que los miembros del género *Pseudoalteromonas* aislados de diferentes organismos marinos producen compuestos bioactivos capaces de prevenir el asentamiento de esporas algales, larvas de invertebrados, bacterias y hongos (Holmström *et al.*, 2002).

En específico para bacterias asociadas a esponjas se tiene muy poca información. Kon-ya *et al.* (1995), aislaron el compuesto ubiquinona 8, el cual inhibe el crecimiento del balano *Balanus amphitrite*. Este compuesto se encontró en un cultivo de *Alteromonas* que están asociadas con la esponja *Halichondria okadai*. Kanagasabhapahty *et al.* (2005) examinaron el efecto antiepibiótico de cuatro bacterias aisladas de la esponja *Pseudoceratina purpurea*, tres pertenecientes al género *Bacillus* y una al género *Virgibacillus* frente a bacterias incrustantes o epibióticas y encontraron que tuvieron actividad frente a cuatro de las 12 cepas probadas. Más recientemente, Satheesh *et al.* (2012) probaron la actividad antiepibiótica de ocho bacterias aisladas de la esponja *Sigmadocia* sp., una de ellas identificada como *Bacillus cereus* mostró actividad inhibitoria de bacterias y microalgas.

Actividad biológica de *Aplysina* y de sus microorganismos asociados.

Las esponjas del orden Verongida contienen una variedad de metabolitos bromados que son característicos de esta familia. Se han reportado más de 100 compuestos derivados de halo-tirosinas. Las esponjas de la familia Aplysinidae son abundantes en aguas tropicales y subtropicales del mar Mediterráneo, en el océano Pacífico y Atlántico. Particularmente, se ha documentado que en las esponjas del género *Aplysina*, los compuestos bromados pueden contribuir hasta en un 12% de su peso seco (Teeyapant & Proksch, 1993). Estos compuestos están presentes en las fibras de la esponja y en vacuolas conocidas como células esferulosas, donde probablemente sea el sitio de producción (Turon *et al.*, 2000).

Los metabolitos aeroplysinina 1 y dienona han atraído la atención debido a su actividad antimicrobiana, propiedades repelentes contra los depredadores y la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama (Hentschel *et al.*, 2001, Karpushova *et al.*, 2005). En el medio natural, al lesionarse el tejido de la esponja, los precursores inactivos se convierten a aeroplysinina-1 y dienona, un proceso que se considera como un mecanismo de defensa química contra depredadores y contaminación biológica (Pabel *et al.*, 2003).

Las esponjas del género *Aplysina* han sido ampliamente estudiadas ya que se ha encontrado que son una fuente muy importante de sustancias bioactivas, cuyas propiedades biológicas van desde la actividad antimicrobiana (Acosta & Rodríguez, 1992; Montes-Plascencia *et al.*, 2010; Valencia-Agami, 2010), antimicobacteriana (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2006), citotóxica (Acosta & Rodríguez, 1992; Rodríguez & Piña, 1993; Compagnone *et al.*, 1999; Hernández-Guerrero *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2008), antiangiogénica (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002), y antiepibiótica (Weiss *et al.*, 1996).

Aplysina lacunosa ha mostrado actividad hemoaglutinante sobre eritrocitos humanos, así como actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, *Bacillus*

cereus, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (Kazanjian & Fariñas, 2006). La esponja *Aplysina aerophoba* del Mediterráneo contiene metabolitos bromados con una potente actividad antimicrobiana (Hentschel *et al.*, 2001), propiedades repelentes contra depredadores (Weiss *et al.*, 1996), y actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de mama (Kreuter *et al.*, 1990).

Estas esponjas albergan grandes cantidades de bacterias que pueden sumar poco más del 40% de la biomasa del animal y que puede superar las concentraciones de bacterias del agua de mar por dos órdenes de magnitud (Hentschel *et al.*, 2001). Una gran fracción de la comunidad microbiana es específica y está permanentemente asociada con la esponja (Friedrich *et al.*, 1999; 2001; Hentschel *et al.*, 2002). Estas bacterias pueden estar expuestas a altas concentraciones de metabolitos bromados activos de la esponja.

La alta densidad, así como la diversidad taxonómica de las bacterias dentro del mesohilo de *Aplysina* puede crear un entorno propicio para la producción de antibióticos y otros compuestos de defensa. A partir de esponjas de este género se han aislado bacterias con actividad antimicrobiana. Hentschel *et al.* (2001) realizaron un estudio con las esponjas *Aplysina aerophoba* y *A. cavernicola* del Mediterráneo, y obtuvieron 27 cepas, las cuales fueron sometidas a ensayos de actividad antimicrobiana frente a cepas de origen clínico de *Staphylococcus aureus* y *S. epidemidis*. Pabel *et al.* (2003) realizaron pruebas frente a diferentes cepas patógenas y encontraron que dos cepas identificadas como *Bacillus subtilis* y *B. pumilus* producen lipopéptidos con muy buena actividad antimicrobiana y antifúngica. Karpushova *et al.* (2005) indicaron en su estudio que el microorganismo *Bacillus* sp. asociado a *Aplysina aerophoba* del Mediterráneo produce ésteres con actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente el conocimiento acerca de la diversidad de microorganismos asociados a invertebrados, en específico a esponjas es muy escaso, más aún en nuestro país en donde los estudios se han enfocado principalmente a bacterias en sedimento o agua de mar. Para ello, el uso de métodos cultivo-dependientes es muy importante debido a que son de gran ayuda para la caracterización fenotípica e identificación de esta diversidad cultivable. Uno de los enfoques que ha cobrado más interés en las últimas décadas es el estudio de las asociaciones esponja-microorganismos como fuentes potenciales de compuestos bioactivos. Las bacterias asociadas a esponjas constituyen un recurso potencial de nuevas sustancias bioactivas, además su aislamiento e identificación ayudaría a subsanar los problemas relacionados con el suministro, ya que en otros organismos, la utilización de los productos naturales como un recurso potencial para el desarrollo de nuevos fármacos se ve obstaculizada en muchos casos, ya que llevar un compuesto novedoso al mercado como nueva droga requiere de ensayos preclínicos y clínicos durante los cuales debe estar disponible un suministro continuo del compuesto bioactivo. La ventaja de usar microorganismos como fuente de compuestos bioactivos es que pueden producirlos en corto tiempo y en grandes cantidades. Con base en ello, se formularon las siguientes preguntas 1) ¿Cuáles son las características de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*?, 2) ¿Las bacterias presentan actividad antimicrobiana y antiepibiótica?, 3) ¿Presentan variaciones temporales en cuanto a su abundancia, composición específica y actividad biológica?.

HIPÓTESIS

Las bacterias cultivables asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* se caracterizan por ser Gram positivas y su abundancia y actividad biológica presentan variaciones temporales.

OBJETIVOS

Objetivo General: Conocer la diversidad, actividad biológica y variación temporal de las bacterias heterótrofas asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* en el arrecife rocoso de Punta Arena, B.C.S.

Objetivos Particulares

1. Aislar, cuantificar e identificar bimensualmente las bacterias cultivables asociadas a *Aplysina gerardogreeni* durante un ciclo anual.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana y antiepibiótica de las bacterias asociadas a la esponja.
- 3.
4. Analizar la variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* y de su actividad biológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del material biológico.

Las esponjas se recolectaron bimensualmente durante un ciclo anual (Abril 2008 - Febrero 2009) en Punta Arena, B.C.S. México (Lat. 24°03'40''N y Long. 109°49'52''W. Fig. 2) a tres profundidades: 2, 4 y 6 m mediante buceo SCUBA. En cada profundidad se tomaron 5 organismos y se transportaron de manera inmediata hasta el laboratorio de microbiología del CICIMAR dentro de bolsas plásticas estériles en hielo (para evitar el crecimiento bacteriano durante el transporte).

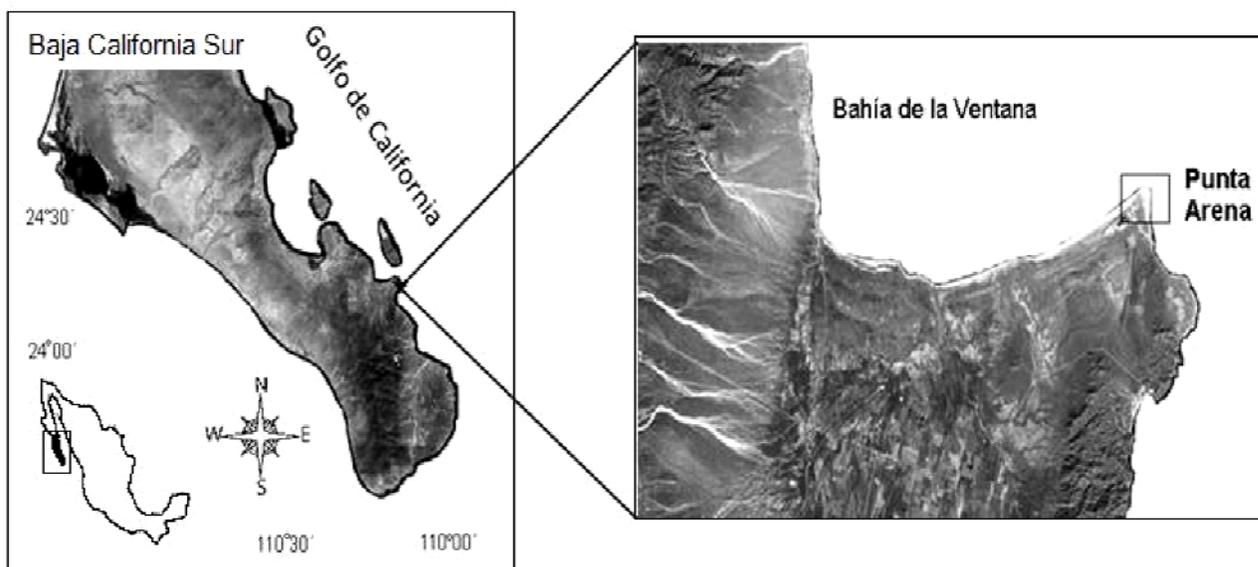


Figura 2. Área de recolecta de las esponjas.

Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

Una vez en el laboratorio, el tejido de las esponjas se procesó de manera inmediata para lo cual se cortó en trozos en ambiente estéril, se pesaron 5 g en una balanza analítica y se lavaron pasándolas por alcohol al 70% y por agua de mar

filtrada y esterilizada para remover las bacterias no adheridas y/o provenientes de la columna de agua. Se procedió a macerar el tejido en un mortero con 10 mL de agua de mar filtrada y estéril. A partir de este macerado se tomó una alícuota de 100 μ L y se sembró en placas de agar tripticasa soya (TSA) y NaCl al 2.7%, este es un medio generalista muy utilizado para el aislamiento de bacterias heterótrofas tanto Gram positivas como negativas. Las placas se dejaron incubar de 3 a 5 días a temperatura ambiente. Una vez que se observó crecimiento, se describió a detalle la morfología de las colonias aisladas con ayuda de un microscopio estereoscópico, con el objeto de seleccionar los diferentes morfotipos presentes. Cada una de las colonias se resembró mediante la técnica de estría cruzada, la pureza de las cepas aisladas fue confirmada nuevamente mediante la morfología colonial y microscópica (tinción de Gram). De las placas con las cepas puras se hizo una resiembra en tubos con 1 mL de medio caldo tripticasa soya (TSB), estos se incubaron a temperatura ambiente de 3 a 5 días. Las cepas aisladas se mantuvieron a -70° C en medio TSB con glicerol al 15% para su conservación y posterior resiembra para la obtención de ADN y los bioensayos de actividad.

Cuantificación de bacterias por epifluorescencia.

Para determinar el número total de bacterias se procesaron en total dieciocho muestras, tres esponjas por bimestre llevando a cabo el siguiente protocolo:

- Preparación de la muestra

Se tomaron 10 mL del macerado inicial del tejido de la esponja y se fijó con un volumen igual de buffer solución salina/paraformaldehído 8% (PBS) del cual se tomaron 200 μ L de la muestra previamente homogenizada y se dejó 15 minutos en el sonicador a 4° C. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 12° C. Se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso con el botón resultante agregando 200 μ L de PBS. De los sobrenadantes obtenidos se tomaron 100 μ L y se le agregaron 850 μ L de Tris-EDTA pH 8.0 (TE) y 50 μ L del colorante SYBR Gold 2.5X dejando incubar durante 15 minutos en la oscuridad. La muestra se filtró en un sistema de filtración de 25 mL de capacidad a través de una membrana de policarbonato de 0.2 μ m

previamente humedecida con TE y se lavó tres veces con 200 μ L de la misma solución para eliminar el exceso del colorante. Una vez que la membrana estuvo seca se colocó en un portaobjetos y se llevó a cabo el montaje poniendo aceite de inmersión de baja fluorescencia sobre la membrana y colocando un cubreobjetos.

- **Conteos**

Las preparaciones fueron observadas inmediatamente o bien conservadas en refrigeración y obscuridad hasta su conteo. Los conteos se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus CH30) a una longitud de onda de entre 450 y 490 nm a partir de 10 diferentes campos o hasta completar un total de 300 células, lo que garantiza un adecuado tamaño de muestra (Kirchman *et al.*, 1982; Caron, 1983; Sherr *et al.*, 1993). El número de bacterias se determinó con la siguiente ecuación, con los respectivos ajustes para microscopía de epifluorescencia como se muestra a continuación:

$$\text{Células}\cdot\text{mL}^{-1} = (\text{N} \times \text{F} \times \text{d}) / \text{V}$$

En donde:

N = Número de células promedio por retícula.

F = Número de veces que cabe el área de la retícula en el área efectiva de filtración del filtro.

$$\text{Área de filtración} = \pi \cdot r^2 \text{ (20106 mm}^2\text{)}$$

$$\text{Área retícula} = 0.01 \text{ mm}^2 \text{ en 100X}$$

d = Dilución.

V = Volumen filtrado de la muestra (mL)

Una vez obtenido el número de células por mililitro se calculó la cantidad por gramo de esponja partiendo del peso inicial de la muestra al momento de procesarla (5 g).

Identificación de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

- Aislamiento del ADN

Se realizó una resiembra masiva en placa de las cepas puras para la obtención de biomasa, cada una de ellas se colocó en tubos eppendorf con 500 μ L de buffer TE pH 8.0, 30 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 5 μ L de proteinasa K (20 mg mL⁻¹) se agitaron en un vortex y se incubaron durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 100 μ L de NaCl 5M y 80 μ L de una solución de bromuro de cetiltrimetil amonio en cloruro de sodio (CTAB/NaCl), mezclando por inversión e incubando 10 min a 65° C. Posteriormente se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron en vortex hasta obtener una solución lechosa, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 24° C, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos de 1.5 mL estériles. Se realizó una segunda extracción con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min a 4° C. La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol preenfriado a -20° C. Los tubos se incubaron a -20° C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4° C. Los botones resultantes (ADN) se lavaron con etanol al 70% preenfriado a -20° C, se centrifugaron nuevamente, el proceso se realizó en dos ocasiones. Los botones se dejaron secar al aire y se resuspendieron en 100 μ L de TE pH 8.0 adicionándoles 1 μ L de RNAsa (1 μ g/ μ L). Los tubos se incubaron en un baño maría a 37° C por una hr. Se realizó una segunda extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar la RNAsa siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Posteriormente el ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR GOLD y buffer TBE bajo luz ultravioleta y se documentaron (Sambrook & Russell, 2001; Ausubel *et al.*, 2002).

- Amplificación de ADN mediante PCR.

El ADN se amplificó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando oligonucleótidos 120f 5'-ACT GGC GGA CGG GTG AGT AA-3' y 518r 5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' para amplificar la región variable V2-V3 de la

sub-unidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S, reportados para análisis de comunidades bacterianas (Tebbe *et al.*, 2001). La reacción de amplificación contenía 100 ng de ADN, 0.25 μ M de cada oligonucleótido, 5 μ L de buffer PCR 10X, 2 μ L de MgSO₄, 10 mM de dNTP's, 1.5 U de Taq polimerasa y agua destilada estéril para tener un volumen final de 50 μ L. Las reacciones se amplificaron en un termociclador BIO-RAD MJMini[®], con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min; 30 ciclos de 94° C por 60 s, 55° C por 60 s, 72° C por 70 s, seguidos de una fase de extensión final a 72° C por 10 min. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1% teñidos con 2 μ L de SYBR GOLD y buffer Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1X. De cada reacción se tomaron 3.0 μ L y se mezclaron con 1 μ L de buffer de carga (LB) (Sambrook & Russell 2001). Como estándar se utilizaron 2 μ L de un marcador de 1 Kb. La electroforesis se corrió a 100 V durante 30 min. Los resultados se observaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador BIODOC-IT.

- **Secuenciación y análisis filogenético.**

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por la empresa MACROGEN (Corea). Se analizaron y editaron las secuencias utilizando el programa CodonCode Aligner, posteriormente se efectuaron los análisis de alineamiento *Blast* entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el *NCBI* (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), adicionalmente se realizaron alineamientos entre todas las secuencias obtenidas mediante la rutina *MUSCLE* incluida en el programa MEGA5, los gráficos de identidad se realizaron mediante el programa GeneDoc y los árboles filogenéticos para evaluar la posición taxonómica de las bacterias fueron generados usando el método del vecino más cercano (*Bootstrap* 1000 repeticiones) (Tamura *et al.*, 2004), estos análisis filogenéticos se realizaron en el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Caracterización bioquímica.

Las pruebas bioquímicas consistieron en distintos test químicos aplicados a medios biológicos para determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo. La metodología se realizó de acuerdo a Barrow & Feltham (1993). Para cada prueba se utilizaron inóculos de los cultivos puros de 24 horas.

1. Crecimiento aeróbico/anaeróbico. Para ello se inocularon por duplicado las cepas en tubos con caldo nutriente (peptona) en agua de mar. Uno de los tubos fue cubierto con una capa de parafina líquida estéril (2 mL). Los tubos se incubaron a 30° C durante 24 horas y se observó la presencia o ausencia de crecimiento.
2. Oxidasa. Se utilizaron palillos comerciales (OXOID, FISHER) impregnados con el reactivo para detección de la enzima citocromo oxidasa (NNN'N tetrametil-p-fenileno-diamina dihidrocloridato). La punta con el reactivo se colocó sobre la cepa bacteriana cultivada en placa de agar peptona. El cambio de coloración de café a púrpura intenso indicó una prueba positiva.
3. Actividad catalasa. Se agregaron dos gotas de peróxido de hidrógeno al 30% sobre la cepa bacteriana cultivada en placa de agar. La producción de burbujas de gas indican una reacción positiva.
4. Producción ácido/gas de carbohidratos. Se inocularon tubos con medio de peptona al 1% y glucosa al 1% a los cuales se les colocaron tubos de Durham y un indicador (2.5 mL púrpura de bromocresol al 1%). Se incubaron a 30° C durante 4 días y se observó la producción de ácido y gas mediante el cambio de color y la presencia de una burbuja de aire en el tubo invertido de Durham.
5. Oxidación/Fermentación de glucosa. Se inocularon por picadura dos tubos con agar semi sólido O-F (medio básico de Hugh Leifson) el cual contiene como indicador azul de bromotimol al 2% (15 mL). Uno de los tubos fue cubierto con 2 mL de parafina líquida estéril. Se incubaron a 30° C por 7 días y se observó el cambio de color en los tubos. La producción de ácido es indicada por el cambio de color de azul a amarillo. Un cambio de color en los tubos aeróbicos

indican oxidación. Si ambos tubos muestran cambio de color se trata de fermentación.

6. Rojo de metilo. Se inocularon tubos con medio de fosfato glucosa por 48 horas a 30° C. A cada tubo se le agregaron dos gotas de la solución rojo de metilo, se mezcló y se observó el color, un rojo intenso indica que el organismo fermenta la glucosa.
7. Voges-Proskauer. Se inocularon tubos con medio fosfato glucosa por 48 horas a 30° C. A cada tubo se le agregaron tres gotas de α -naphthol al 5% y una gota de KOH al 40%. Después de una hora se examinó el cambio de color. Una reacción positiva de fermentación de carbohidratos es indicada por un color rojo intenso.

Obtención de extractos orgánicos.

Para la obtención de biomasa, las bacterias fueron cultivadas en matraces de 250 mL con 100 mL de medio TSB, se incubaron de 4 a 5 días a temperatura ambiente. A los matraces con el cultivo se les agregó una mezcla de hexano:acetato de etilo 60:40 y se dejaron en agitación constante por una hora. Posteriormente se filtró y se realizó una extracción líquido-líquido de los compuestos a temperatura ambiente utilizando embudos de separación. El disolvente se evaporó a presión reducida en un rotoevaporador.

Ensayos de actividad biológica.

Frente a bacterias patógenas para el hombre.

Se utilizaron dos cepas de bacterias patógenas para el hombre (*Staphylococcus aureus* ATCC BAA-42, *Escherichia coli* ATCC BAA-196). Se preparó un pre-inóculo en un medio líquido para cada cepa y se incubó por 24 horas a 35° C. Se preparó una suspensión celular con cada una de las cepas y se ajustó a una dilución de 1×10^8 cel mL⁻¹, se inocularon las cajas de petri con 0.1 mL de la suspensión y se procedió a esparcir con un hisopo estéril. El ensayo se realizó

mediante el método de difusión en pozo. Para ello, a las placas sembradas con la bacteria patógena se les hicieron perforaciones con la ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro en donde se depositó la suspensión bacteriana para la prueba preliminar y posteriormente, en un segundo bioensayo con aquellas que mostraron actividad, se depositó el extracto de la bacteria marina a probar diluido previamente en DMSO (Dimetil sulfóxido) para dar una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como control positivo se utilizó ampicilina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (NCCLS, 1993).

Antiepiibiótica.

Se prepararon soluciones stocks de los extractos en metanol con concentraciones finales de 0.01, 0.1, 1, 10 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se colocaron 50 μL de cada una de estas soluciones en las placas de 96 pozos con seis réplicas. Se dejó evaporar durante 24 horas para tener sólo el extracto en los pozos. Las placas fueron esterilizadas con tapa en un gabinete de esterilización UV (Scie-plas GE UVSC) durante 30 minutos antes de ser retiradas asépticamente e inoculadas con los microorganismos. Se realizaron controles positivos (medio de cultivo sin inocular) y negativos (medio inoculado y con metanol).

- **Antimicrobiana.** Se realizaron pruebas de actividad inhibitoria frente a cepas de bacterias identificadas como colonizadoras de materiales sumergidos, las cuales fueron proporcionadas por el cepario de la Universidad de Portsmouth (Reino Unido) en donde se llevaron a cabo estos bioensayos: *Proteus vulgaris* (ATCC1457), *Shewanella putrefaciens* (ATCC8071), *Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC700519), *Polaribacter irgensii* (ATCC 700398), *Roseobacter litoralis* (ATCC49566), *Bacillus cereus* (ATCC19181), *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus laterosporus*, *Vibrio aesturianus* (ATCC35048), *Vibrio natriegens* (ATCC33788), *Vibrio harveyi* (ATCC14126), *Vibrio proteolyticus* (ATCC15338), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802) y *Vibrio carcharie* (ATCC35084). Las bacterias marinas fueron cultivadas en un medio con peptona al 0.5% (LP0034 Oxoid) y agua de mar.

Los cultivos bacterianos se diluyeron según el método de Amsterdam (1996) para obtener una densidad celular de 2×10^8 células mL^{-1} . Las placas previamente preparadas con los extractos tal como se describió anteriormente, fueron inoculadas con 100 μL de la suspensión de las células bacterianas y se incubaron a 20°C durante 48 horas. Después de la incubación, todos los pozos fueron comparados visualmente con el control, los pozos claros, sin turbidez indicaron la inhibición del crecimiento.

- **Antimicroalgal.** Se probó la actividad inhibitoria frente a cepas microfitobentónicas proporcionadas por el cepario *Algobank-Caen* (Francia): *Cylindrotheca closterium* (AC170), *Exanthemachrysis gayraliae* (AC15), *Navicula jeffreyi*, *Lotharella globosa* (AC132) y *Chlorarachnion reptans*. Estas cepas fueron cultivadas utilizando medio de cultivo f2 (Guillard & Ryther 1962), se mantuvieron a 20°C y luz constante (irradiancia incidente: $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). La biomasa de las microalgas fue estimada mediante la concentración de clorofila *a* (Chl *a*). Se filtraron 5 mL del cultivo en un filtro GFF (Whatman) y fueron trasladados inmediatamente a un frasco con 5 mL de metanol grado analítico. El frasco se mantuvo en la oscuridad a 4°C de 30 min a 2 horas. Se midió la fluorescencia del pigmento del extracto (PolarSTAR Optima BMG Labtech, excitación: 485 nm, emisión: 645 nm) y la concentración de Chl *a* se determinó usando una curva de calibración construida usando Chl *a* de espinaca (C5753 Sigma, coeficiente de extinción a 663 nm en metanol: $77 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para cada especie de microalga, se realizaron diluciones preparando alícuotas con una concentración inicial de $0.1 \text{ mg Chl } a \text{ L}^{-1}$. En cada pozo de las placas recubiertas con los extractos, bajo condiciones asépticas, se inocularon 100 μL de cada cepa de microalga y los controles positivo y negativo. Las placas se incubaron durante cinco días a 20°C en condiciones de luz constante (irradiancia incidente: $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transcurrido el tiempo, los pozos se compararon visualmente con los controles, los pozos claros, sin turbidez indicaron una inhibición del crecimiento, mientras que los pozos turbios indicaron que los extractos no mostraron actividad.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

De las esponjas recolectadas en los diferentes meses y profundidades se aislaron y purificaron en total 167 cepas de bacterias que fueron seleccionadas con base en las observaciones morfológicas al microscopio estereoscópico y que presentaron diferencias evidentes en el color, forma y tinción de Gram en cada uno de los meses. La gran mayoría fueron cepas sin pigmento (blancas o translúcidas) predominando las formas circulares (Fig. 3). Morfológicamente, las formas celulares observadas en el microscopio fueron muy variadas, con representantes de los grupos cocos y bacilos, sin embargo, abundan mayormente los bacilos. De las 167 cepas de bacterias, el 90.5% son Gram positivas y el 9.5% restante Gram negativas (Anexo I). Se conformó un cepario con las bacterias aisladas de esta esponja las cuales se mantienen en congelación con glicerol en congelación para su preservación.

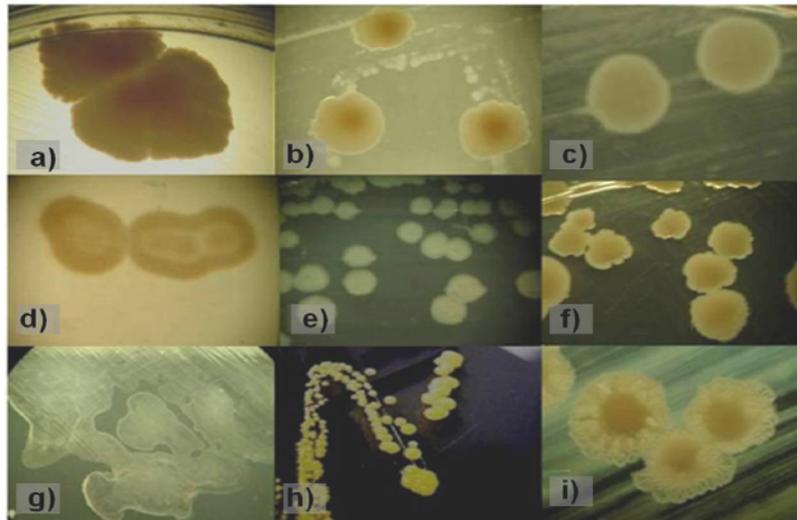


Figura 3. Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni* en los meses de muestreo a) Ap0216, b) Ap0205, c) Ap0881, d)Ap0467, e) Ap02139, f)Ap02159, g) Ap02125, h) Ap0879, i) Ap04117.

En la figura 4 se muestra la distribución porcentual del total de las cepas aisladas. Como se puede observar, el mayor porcentaje le corresponde a las bacterias Gram positivas y dentro de ellas los bacilos positivos son los más representados con el 81%. Al comparar el número de cepas aisladas en los diferentes meses, se observó una evidente variación temporal, con los mayores aislamientos en febrero y abril (39), y los menores en octubre (13) (Fig. 5).

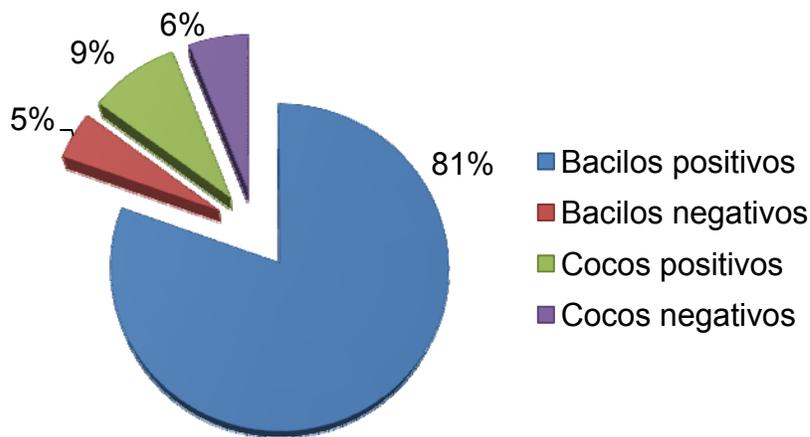


Figura 4. Distribución porcentual de los grupos de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

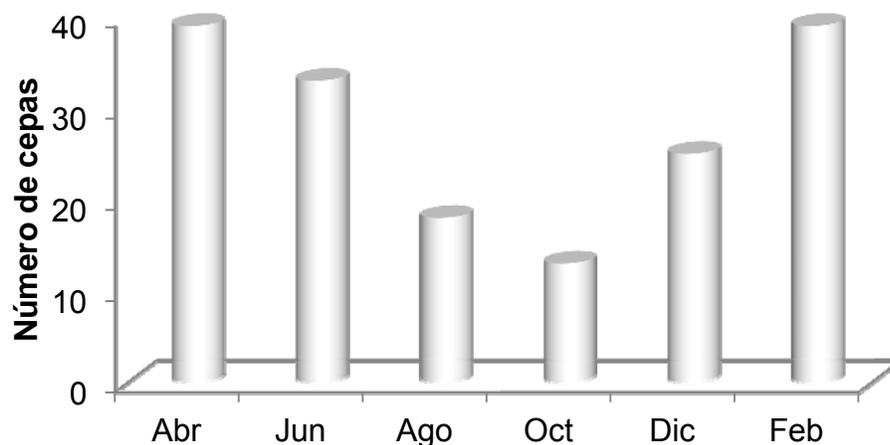


Figura 5. Variación bimensual de cepas aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* durante el periodo de abril de 2008 a febrero de 2009.

Cuantificación de bacterias por epifluorescencia.

Se obtuvo el promedio anual del número de bacterias por gramo de tejido de esponja mediante la fórmula indicada en la metodología, dando como resultado 9.7×10^8 cél g esponja⁻¹ (n=18).

Se encontró una variación temporal, con el mayor número de bacterias por gramo de esponja en el mes de febrero, seguido de abril, siendo estos meses significativamente diferentes del resto (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de bacterias por gramo de esponja obtenidas del conteo por epifluorescencia en cada mes de estudio. Las diferencias significativas están indicadas con letras diferentes. Tukey HSD ($p < 0.05$).

Mes	Número de bacterias/ DS
Abril	$17.81 \times 10^8 \pm 2.43 \times 10^8$ (b)
Junio	$5.23 \times 10^8 \pm 1.18 \times 10^8$ (c)
Agosto	$0.90 \times 10^8 \pm 0.58 \times 10^8$ (c)
Octubre	$2.24 \times 10^8 \pm 2.17 \times 10^8$ (c)
Diciembre	$3.64 \times 10^8 \pm 0.96 \times 10^8$ (c)
Febrero	$28.62 \times 10^8 \pm 7.07 \times 10^8$ (a)

Se encontró que la mayor cantidad de bacterias en el tejido de la esponja coincidió con el mayor número de cepas aisladas (febrero y abril).

En cuanto a la profundidad, no se presentó variación entre el número de bacterias, el promedio fue de 9.59, 10.97 y 8.75×10^8 cél g esponja⁻¹, a los 2, 4 y 6 m respectivamente. Analizando por mes, se observa una variación en el número de bacterias por profundidad en el mes de octubre en donde se encontró una mayor

abundancia en las esponjas recolectadas a los 2 m y en febrero con el mayor número de bacterias a los 4 m, cabe señalar que estos datos son el resultado de una sola muestra cuantificada por profundidad y debido a la falta de réplicas no se realizó un análisis estadístico (Tabla 3).

Tabla 3. Número de bacterias por gramo de esponja en las diferentes profundidades de recolecta.

Mes	Profundidad (m)	No. células
Abril	2	21×10^8
	4	16×10^8
	6	17×10^8
Junio	2	5.3×10^8
	4	6.4×10^8
	6	4.0×10^8
Agosto	2	0.84×10^8
	4	0.90×10^8
	6	0.95×10^8
Octubre	2	4.7×10^8
	4	0.97×10^8
	6	0.99×10^8
Diciembre	2	2.7×10^8
	4	4.6×10^8
	6	3.6×10^8
Febrero	2	23×10^8
	4	37×10^8
	6	26×10^8

Identificación de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

Las cepas aisladas de *Aplysina gerardogreeni* fueron identificadas a través del análisis del gen ARNr 16S, mediante la extracción de ADN y amplificación por PCR. El ADN de las bacterias recolectadas en cada uno de los meses y profundidades de muestreo fue aislado y confirmado por electroforesis en el gel de agarosa (Fig. 6) y

posteriormente se amplificó mediante PCR. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa en un fotodocumentador (Fig. 7).

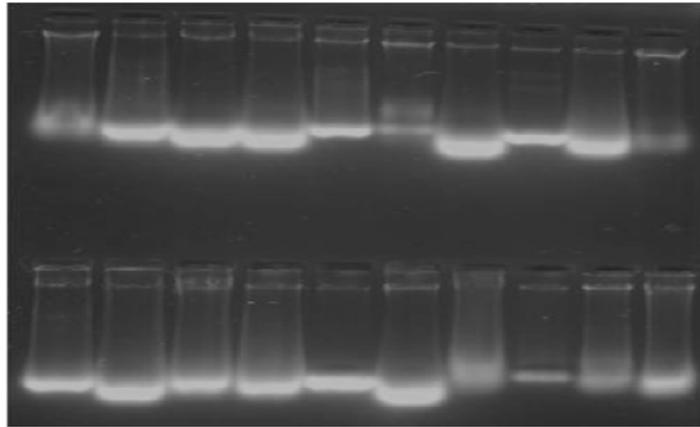


Figura 6. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold en donde se muestra el ADN extraído de las bacterias.

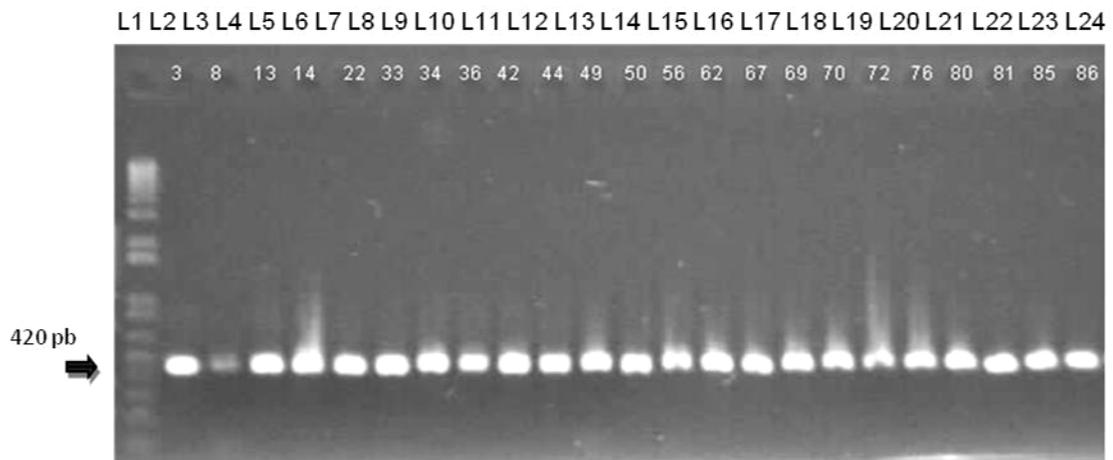


Figura 7. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*. Línea 1 marcador de peso molecular 1 Kb, líneas 2 - 24 diferentes cepas aisladas de la esponja. Los números corresponden al número de etiqueta de la cepa.

A partir de los datos de secuenciación se efectuaron análisis de alineamiento *Blast* entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el *NCBI* (National Center for Biotechnology Information), con lo cual se clasificaron taxonómicamente las cepas aisladas (Anexo II).

Una vez alineadas las secuencias con el programa MEGA5, se encontró que muchas de las cepas aisladas de la esponja que presentaron diferencias morfológicas evidentes, tuvieron un alto porcentaje de homología en sus secuencias, correspondiendo muy probablemente a una misma especie. Con la finalidad de corroborar si se trataba de especies distintas o no, se realizó un análisis utilizando el programa GeneDoc con lo cual se pudieron agrupar a aquellas que presentaron porcentajes de homología por arriba del 96% (Anexo III), dando como resultado un total de 83 especies de las 167 cepas aisladas originalmente en el ciclo anual.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la alineación de estas 83 secuencias indicando el número de acceso al taxa, la especie más cercana reportada en la base de datos *NCBI* y el porcentaje de identidad con estas secuencias. Todas las especies con las que fueron comparadas en el *GenBank* han sido aisladas de ambientes marinos, muchas de ellas de otras esponjas marinas.

Tabla 4. Comparación de grupos taxonómicos de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* en los diferentes meses de muestreo con secuencias reportadas en el *NCBI*.

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap029	Alpha proteobacterium JE019	DQ097255.1	100
Ap12163	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10180	AY859478.1	90
Ap0641	<i>Bacillus cibi</i> 102	FJ607434.1	99
Ap06145	<i>Bacillus cibi</i> 102	FJ607434.1	99
Ap0233	<i>Bacillus flexus</i> NIOT	JQ818414.1	99
Ap0678	<i>Bacillus licheniformis</i> APS2	HQ634792.1	95
Ap04107	<i>Bacillus licheniformis</i> CMST-SSS	HM101154.1	98
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	92
Ap0222	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	99
Ap02142	<i>Bacillus licheniformis</i> OIV 710	GU117643.1	97
Ap02136	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-HK09001	HM006897.1	100
Ap04170	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	97
Ap023	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099	JX164084.1	99
Ap02156	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11225	JX164089.1	97
Ap0444	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	100
Ap0477	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	90
Ap021	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	92
Ap027	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	95
Ap0213	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	95
Ap0630	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	96
Ap1239	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-06	FJ824666.1	99
Ap0694	<i>Bacillus megaterium</i> AUBM29	JN990602.1	99
Ap06115	<i>Bacillus nealsonii</i> CB-KC-1	JN400828.1	99
Ap04121	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX120507.1	96
Ap0211	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX094286.1	100
Ap02159	<i>Bacillus pumilus</i> B10	JX1112644.1	83
Ap0240	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	100
Ap08147	<i>Bacillus pumilus</i> PD3	JQ809230.1	92
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i> CSMCRI 1044	JQ665284.1	99
Ap0475	<i>Bacillus</i> sp. HPB-25	AY433825.1	71
Ap12146	<i>Bacillus</i> sp. ISA-3174	A4936960.1	92
Ap02140	<i>Bacillus</i> sp. I-SI-32	EU787009.1	92
Ap1225	<i>Bacillus</i> sp. RP-234	GU592214.1	92
Ap0488	<i>Bacillus</i> sp. SMAKK003	JN007072.1	92
Ap0695	<i>Bacillus</i> sp. TCPS1	JN710379	89
Ap02135	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap0858	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	96
Ap0499	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	97
Ap04103	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	98
Ap12167	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap04120	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	JX215561.1	98
Ap0204	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	JX120507.1	99
Ap048	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	85
Ap0665	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	92
Ap0693	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	95
Ap06111	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	98
Ap02171	<i>Bacillus subtilis</i> F198_A06	DQ234839.1	97
Ap0635	<i>Bacillus subtilis</i> F198_B09	DQ234853.1	100
Ap02124	<i>Bacillus subtilis</i> K4	JQ8633651.1	85
Ap0216	<i>Bacillus subtilis</i> LLS-M3-11	HM744709.1	100
Ap0684	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap08161	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.8	100
Ap1066	<i>Halomonas</i> sp. H1(2012)	JQ044787.1	97
Ap0498	<i>Micrococcus luteus</i> ADR52	FN667800.1	97
Ap0879	<i>Micrococcus luteus</i> DSM20030	NR_037113.1	99
Ap0471	<i>Micrococcus luteus</i> KS2	JQ581526.1	100
Ap0624	<i>Paracoccus</i> sp. FI1014	JQ691539.1	99
Ap06141	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> CBMAI1103	JN615429.1	97
Ap06113	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> F71059	HQ908691.1	99
Ap022	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad16	HQ647043.1	97
Ap04114	<i>Pseudovibrio</i> sp. JM38	DQ097255	99
Ap0618	<i>Pseudovibrio</i> sp. Mexdt2	JX436425.1	99
Ap0212	<i>Pseudovibrio</i> sp. Pv348	HE818384.1	99
Ap04110	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	92
Ap04175	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	95
Ap06155	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	96
Ap04104	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	97
Ap0869	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	100
Ap02150	<i>Psychrobacter</i> sp. KJF12-16	JQ800211.1	78
Ap1247	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	EU308120.1	92
Ap041	<i>Staphylococcus arlettae</i> An 116	FJ386956.1	100
Ap0870	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JX215561.1	95
Ap0496	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JX215561.1	99
Ap0238	<i>Staphylococcus equorum</i> SCSAAB0024	JQ647888.1	100
Ap06116	<i>Staphylococcus</i> sp. CBMAI 1081	JN615429.1	99
Ap10123	<i>Staphylococcus</i> sp. CBMAI 1081	JN615429.1	99
Ap0881	<i>Staphylococcus</i> sp. clone 68	AB695118.1	100

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap02143	<i>Staphylococcus</i> sp. D88	JX094494.1	99
Ap1217	<i>Staphylococcus</i> sp. DLS6	JN029533.1	99
Ap1049	<i>Staphylococcus</i> sp. EB338	FJ785516.1	100
Ap0859	<i>Staphylococcus</i> sp. J2015s	JF820801.1	99
Ap0846	<i>Terribacillus goriensis</i> CL-CR16	NR_043895.1	100
Ap0637	Uncultured marine bacterium T3690	A4950194.1	99

La mayoría de las bacterias comparten un alto porcentaje de identidad con especies conocidas reportadas en el Genbank, siendo el género *Bacillus* el mejor representado. Por otra parte algunas de las secuencias (24) mostraron un porcentaje de identidad menor al 96% lo que podría sugerir que se trate de taxa no descritos, sin embargo, hace falta un análisis filogenético más profundo para poder apoyar este supuesto. Una bacteria perteneciente al Phylum Proteobacteria (Ap029) se relacionó a una α - Proteobacteria pero no se pudo determinar a qué género, asimismo la Ap0637 se relacionó con una bacteria registrada en el *GenBank* como “Uncultured marine bacterium”.

Diversidad anual.

En el árbol filogenético (Fig. 8) se muestran las relaciones taxonómicas de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* en el ciclo anual y las de referencias obtenidas del *NCBI*. Estos resultados se obtuvieron usando el método del vecino más cercano, a cada lado de las ramas del árbol se observan los porcentajes de replicación a los cuales se asocian los grupos de taxa en las pruebas *bootstrap* (1000 repeticiones).

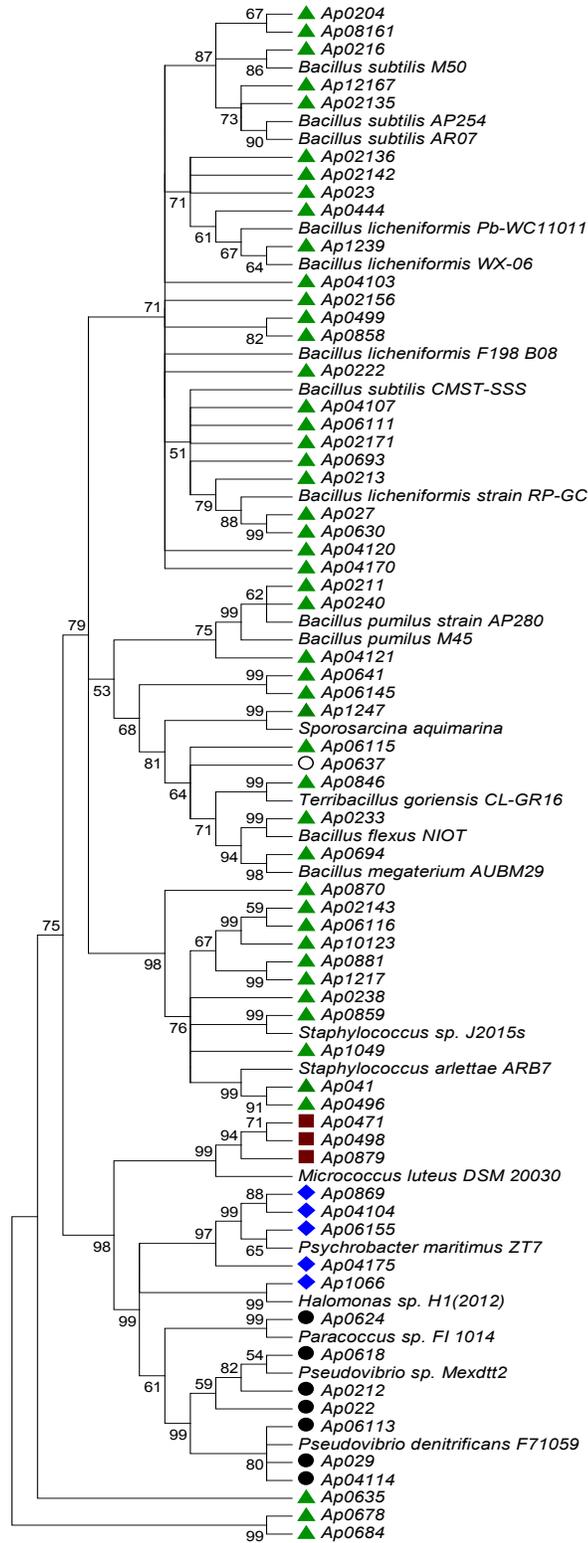


Figura 8. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* y cepas de referencia. Bacilli ▲ Actinobacteria ■ α-Proteobacteria ● γ-Proteobacteria ◆

Las bacterias aisladas de esta esponja fueron asignadas a cuatro clados filogenéticamente diferentes. En el primero se agruparon la mayor parte de las bacterias, mostrando una estrecha relación con el género *Bacillus* y especies pertenecientes al Phylum Firmicutes. Dentro del segundo clado se encontraron a las bacterias Ap0471, Ap0498 y Ap0879, las cuales mostraron una alta identidad con especies pertenecientes a las Actinobacterias y a las bacterias cercanas a los miembros del Phylum Proteobacteria (α - Proteobacteria, γ - Proteobacteria). Al final del árbol se pueden apreciar dos clados alejados del resto, estas tres especies se relacionaron a la clase Bacilli pero no formaron parte del clado de este grupo, esto debido a que, a pesar de que se alinearon con un alto porcentaje de identidad, el porcentaje de cobertura fue bajo; Ap0635 se alineó con 100% de identidad, pero solo el 75% de cobertura (es decir, 300 de las 380 pb), Ap0684 se alineó con un 99% de identidad y 60% de cobertura, en el caso de Ap0678 tanto la identidad como la cobertura fueron bajos (95% y 96% respectivamente).

Se elaboró una ficha para cada una de las diferentes bacterias, en la cual se incluye su secuencia y el nombre de la especie con la que mostró mayor identidad de acuerdo a los resultados obtenidos de la comparación con la base de datos del *NCBI* (Anexo IV).

En resumen, las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni* en el ciclo anual son miembros de tres Phyla (Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria) y corresponden a 9 géneros y dos sin clasificar (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación taxonómica de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

Phylum	Clase	Orden	Género
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Micrococcus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Sporosarcina</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Staphylococcus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Terribacillus</i>
Firmicutes			SC
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	<i>Paracoccus</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	<i>Pseudovibrio</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria		SC
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	<i>Halomonas</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	<i>Psychrobacter</i>

SC sin clasificar

El mayor porcentaje de las bacterias son miembros cercanos al género *Bacillus*, seguido de *Staphylococcus*, *Pseudovibrio*, *Psychrobacter* y *Micrococcus*, mientras que cada uno de los otros solo representan el 1% del total de las bacterias aisladas (Fig. 9).

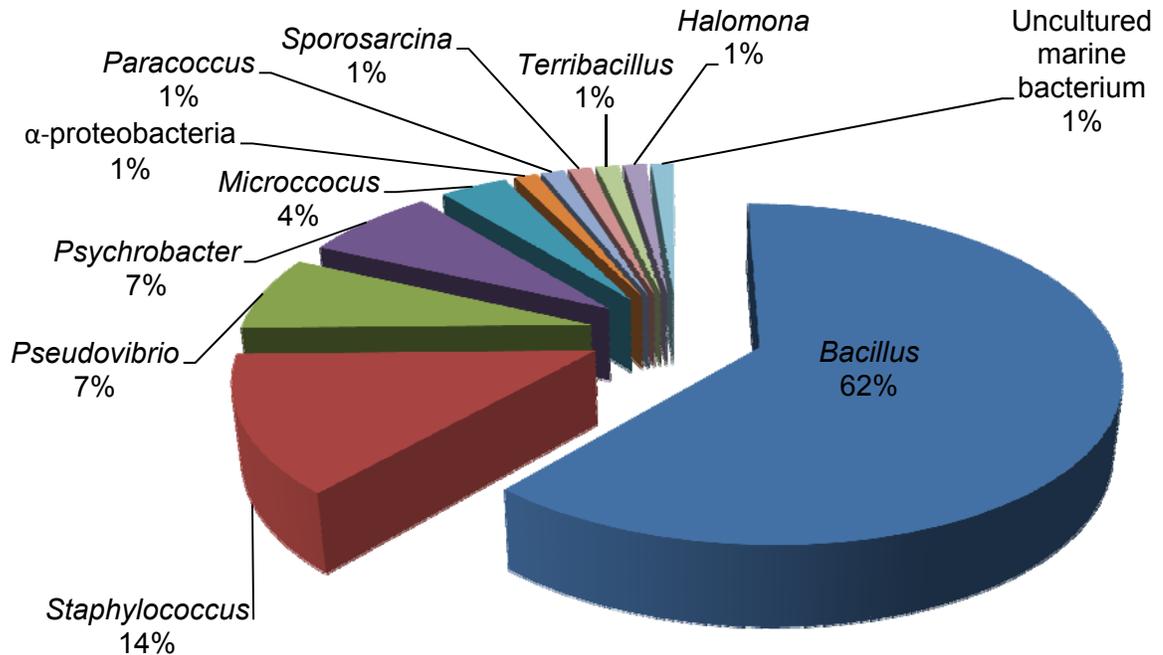


Figura 9. Análisis de la diversidad de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

Caracterización bioquímica.

Las diferentes especies de bacterias identificadas fueron caracterizadas bioquímicamente, en la tabla 6 se presentan los resultados de las pruebas realizadas. El 55% tuvieron crecimiento en condiciones anaeróbicas, el 58% fue positivo a la prueba de oxidasa y el 90% a la de catalasa. La prueba de asimilación de carbohidratos reveló que la mayoría pueden utilizar la glucosa (90%). El 64% tienen un metabolismo oxidativo, el 16% fermentativo y el 20% restante tienen la capacidad de oxidar o fermentar.

Tabla 6. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

ID	Bacteria	Crecimiento Anaeróbico	Oxidasa	Catalasa	O/F	Glucosa	RM	VP
Ap06145	<i>Bacillus cibi</i>	-	+	+	O	+	+	+
Ap0233	<i>Bacillus flexus</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap0630	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap0694	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	O	+	-	+
Ap06115	<i>Bacillus nealsonii</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap04121	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	+	O	+	-	+
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap02128	<i>Bacillus sp.</i>	-	+	+	O	+	+	+
Ap0475	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap0488	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap0695	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap1225	<i>Bacillus sp.</i>	-	+	+	O	+	+	+
Ap02140	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	O	+	+	+
Ap04103	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	O	+	+	+
Ap1066	<i>Halomonas sp.</i>	-	+	+	O	+	+	-
Ap0637	Marine bacterium	+	+	+	O	+	+	+
Ap0471	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+	O	-	-	+
Ap0624	<i>Paracoccus sp.</i>	-	+	+	O	+	+	-
Ap06141	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	+	-	+	O/F	+	+	-
Ap04168	<i>Pseudovibrio sp.</i>	+	-	+	O/F	+	+	+
Ap0618	<i>Pseudovibrio sp.</i>	+	-	+	F	+	-	-
Ap022	<i>Pseudovibrio sp.</i>	+	+	+	O/F	+	+	+
Ap0492	<i>Psychrobacter maritimus</i>	+	+	+	O/F	-	+	-
Ap1247	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	-	-	+	O	+	+	-
Ap041	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	-	+	F	+	+	-
Ap0238	<i>Staphylococcus equorum</i>	-	-	+	O/F	+	+	-
Ap06116	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	+	F	+	+	-
Ap0859	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	+	O/F	+	+	-
Ap0881	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	+	F	+	+	-
Ap1049	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	+	F	+	+	-
Ap0846	<i>Terribacillus goriensis</i>	-	-	+	O	+	+	-

O/F Oxidación/Fermentación, RM Rojo de Metilo, VP Voges-Proskauer

Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni*.

Las bacterias asociadas a *A. gerardogreeni* susceptibles de ser cultivadas mostraron variaciones temporales. En la tabla 7 se presenta el listado con el nombre asignado de la especie más cercana (NCBI) y su variación temporal. En general, se observa que existe una gran variabilidad en la comunidad asociada a la esponja, ya que si bien las bacterias más relacionadas a *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* fueron consistentes encontrándose en prácticamente todos los meses de recolecta, la mayoría de las bacterias se presentaron únicamente en uno o dos de los meses de muestreo, como fue el caso de diciembre, en donde seis especies aisladas fueron exclusivas de ese mes (Tabla 7).

Tabla 7. Especies de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni* en los meses de muestreo.

Especie más cercana	Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb
Alpha proteobacterium JE019						X
<i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10180					X	
<i>Bacillus cibi</i> 102		X				
<i>Bacillus flexus</i> NIOT						X
<i>Bacillus licheniformis</i> APS2		X				
<i>Bacillus licheniformis</i> CMST-SSS	X					
<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08		X	X			X
<i>Bacillus licheniformis</i> OIV 710						X
<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-HK09001						X
<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	X					
<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099						X
<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11225						X
<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	X	X			X	X
<i>Bacillus licheniformis</i> WX-06					X	
<i>Bacillus megaterium</i> AUBM29		X				
<i>Bacillus nealsonii</i> CB-KC-1		X				
<i>Bacillus pumilus</i> AP280	X					X
<i>Bacillus pumilus</i> B10						X
<i>Bacillus pumilus</i> M45	X	X			X	X
<i>Bacillus pumilus</i> PD3			X			
<i>Bacillus sonorensis</i> CSMCRI 1044		X				

Especie más cercana	Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb
<i>Bacillus</i> sp. HPB-25	X					
<i>Bacillus</i> sp. ISA-3174					X	
<i>Bacillus</i> sp. I-SI-32						X
<i>Bacillus</i> sp. RP-234					X	
<i>Bacillus</i> sp. SMAKK003	X					
<i>Bacillus</i> sp. TCPS1		X				
<i>Bacillus subtilis</i> AP254	X				X	X
<i>Bacillus subtilis</i> AR07	X	X	X		X	
<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	X					X
<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	X	X		X		X
<i>Bacillus subtilis</i> F198_A06						X
<i>Bacillus subtilis</i> F198_B09		X				
<i>Bacillus subtilis</i> K4						X
<i>Bacillus subtilis</i> LLS-M3-11						X
<i>Bacillus subtilis</i> M50		X	X	X	X	X
<i>Halomonas</i> sp. H1(2012)				X		
<i>Micrococcus luteus</i> ADR52	X					
<i>Micrococcus luteus</i> DSM20030			X			
<i>Micrococcus luteus</i> KS2	X					
<i>Paracoccus</i> sp. FI1014		X				
<i>Pseudovibrio denitrificans</i> CBMAI1103		X				
<i>Pseudovibrio denitrificans</i> F71059		X				
<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad16						X
<i>Pseudovibrio</i> sp. JM38	X					
<i>Pseudovibrio</i> sp. Mexdtt2	X	X				
<i>Pseudovibrio</i> sp. Pv348						X
<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	X	X	X			
<i>Psychrobacter</i> sp. KJF12-16						X
<i>Sporosarcina aquimarina</i>					X	
<i>Staphylococcus arlettae</i> An 116	X					
<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	X		X			
<i>Staphylococcus equorum</i> SCSAAB0024						X
<i>Staphylococcus</i> sp. CBMAI 1081		X		X		
<i>Staphylococcus</i> sp. clone 68			X			
<i>Staphylococcus</i> sp. D88						X
<i>Staphylococcus</i> sp. DLS6					X	
<i>Staphylococcus</i> sp. EB338				X		
<i>Staphylococcus</i> sp. J2015s			X			
<i>Terribacillus goriensis</i> CL-CR16			X			
Uncultured marine bacterium T3690		X				

Una vez que se realizó la identificación de las bacterias y se descartaron aquellas que presentaron homologías, el número de bacterias por mes cambió con respecto a las cepas aisladas (Tabla 8), aunque la tendencia se mantuvo (Fig. 10), con lo que se observó una variación temporal disminuyendo hacia los meses del verano y otoño e incrementándose en el invierno para alcanzar el mayor número en febrero.

Tabla 8. Bacterias por género identificadas en los diferentes meses de muestreo.

		Abr	Jun	Ago	Oct	Dic	Feb
ACTINOBACTERIA	<i>Micrococcus</i>	2		1			
FIRMICUTES	<i>Bacillus</i>	11	13	4	2	9	19
	<i>Sporosarcina</i>					1	
	<i>Staphylococcus</i>	2	1	3	2	1	2
	<i>Terribacillus</i>			1			
PROTEOBACTERIA	α - Proteobacteria						1
	<i>Paracoccus</i>		1				
	<i>Pseudovibrio</i>	2	3				2
	<i>Halomonas</i>				1		
	<i>Psychrobacter</i>	1	1	1			1
	Unc. Marine bacterium		1				

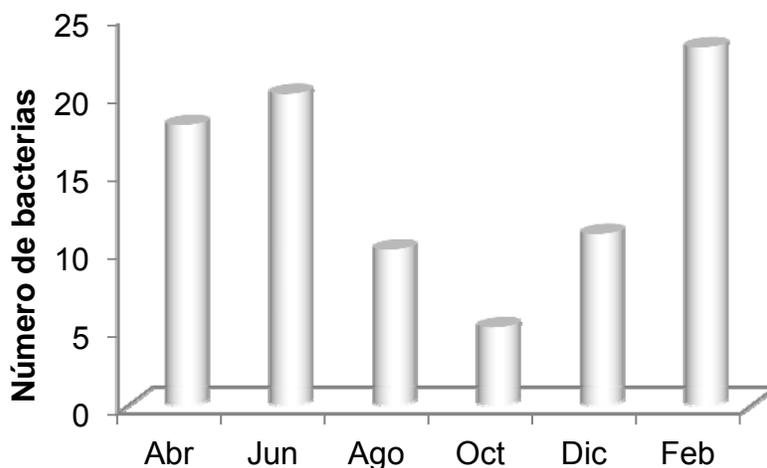


Figura 10. Variación bimensual de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni*.

Se presentan también los árboles filogenéticos obtenidos para cada mes. Las bacterias aisladas en el mes de abril se relacionaron con cinco géneros, algunas presentaron altos porcentajes de identidad entre ellas, esto debido a que se incluyeron las cepas aisladas de las esponjas recolectadas a las tres diferentes profundidades y en varias de ellas se repitieron las mismas especies (Fig. 11a). En el mes de junio las bacterias correspondieron a cinco géneros y una sin clasificar ya que se relaciona con una bacteria marina no cultivable (NCBI). Durante este mes no se aisló ningún representante de las actinobacterias (Fig. 11b).

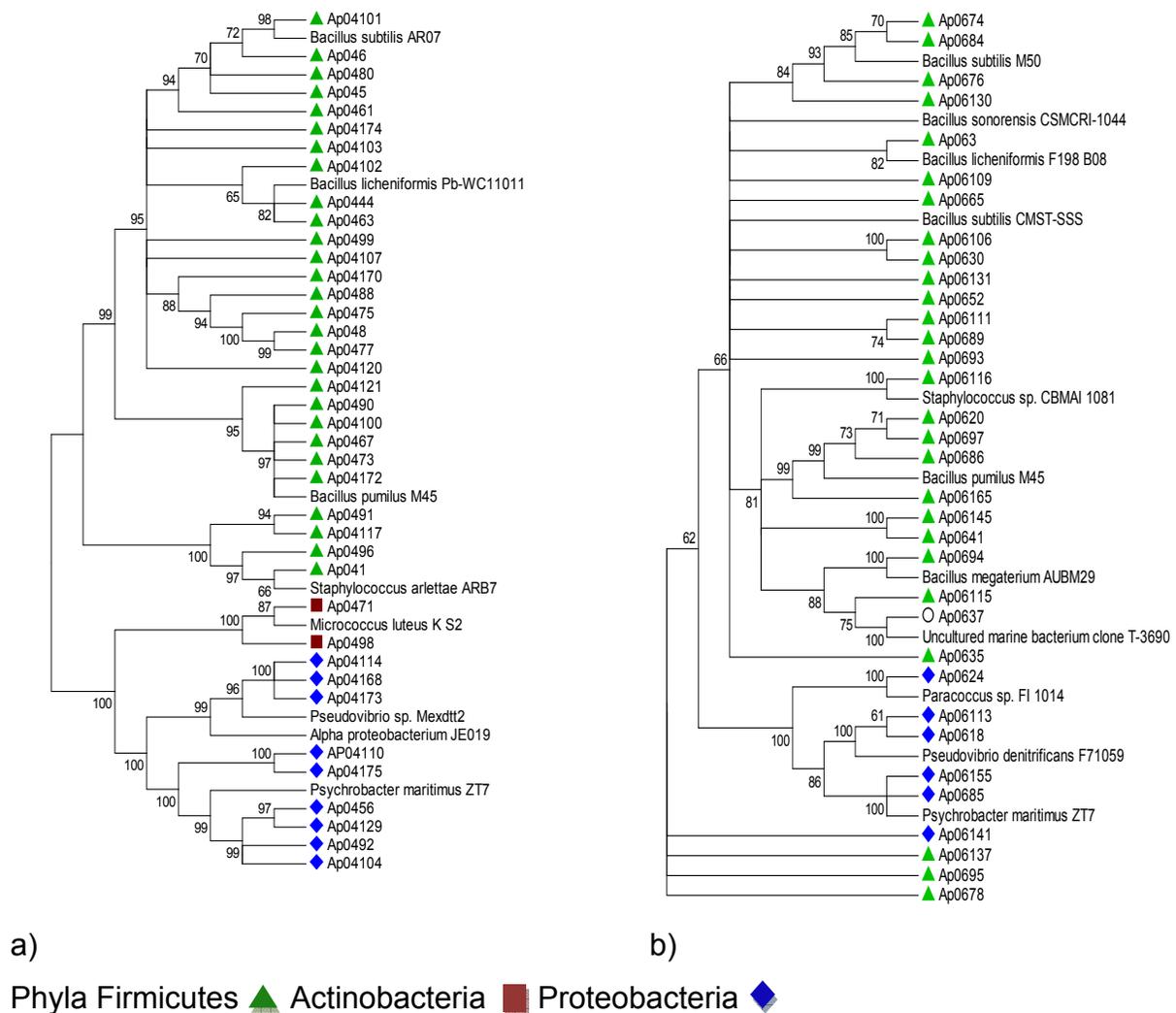


Figura 11. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* y cepas de referencia del mes de a) abril y b) junio.

En agosto las bacterias se relacionaron con cuatro géneros (Fig. 12a), y en octubre con tres (Fig. 12b), al igual que en los demás meses varias de ellas se repitieron en las diferentes profundidades por ello se observa una alta relación entre cepas. También en octubre se puede observar que a excepción de una especie, el resto pertenecen al Phyla Firmicutes.

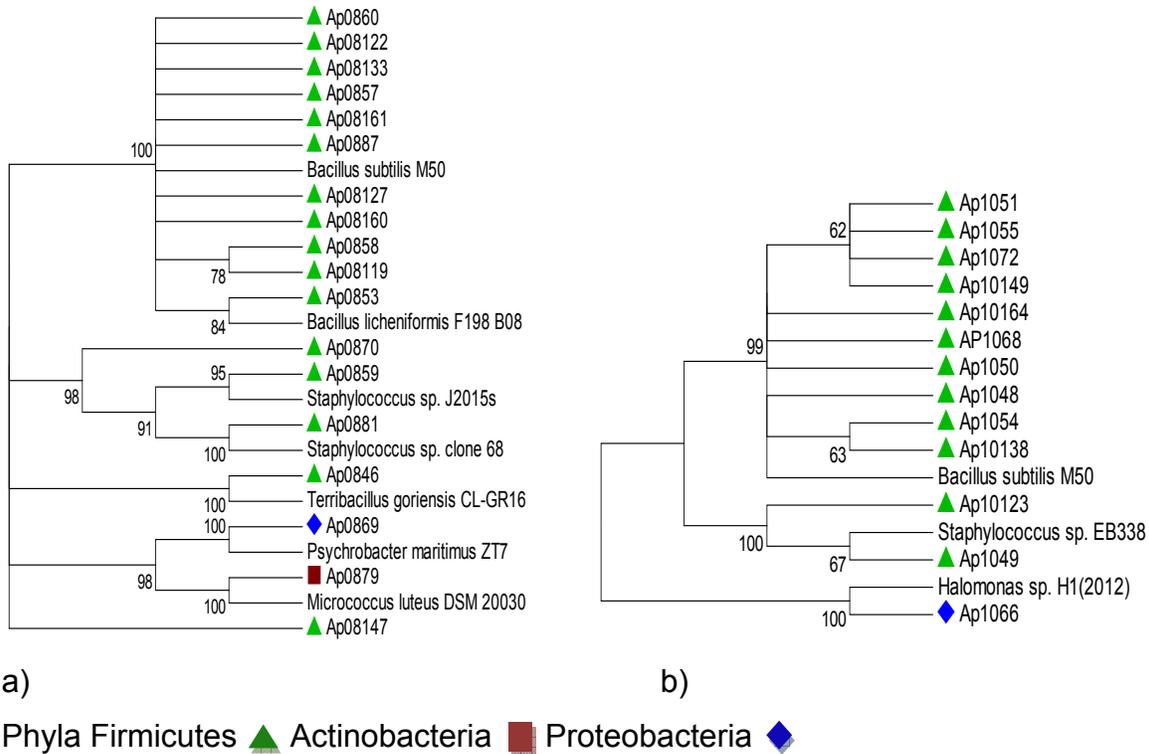
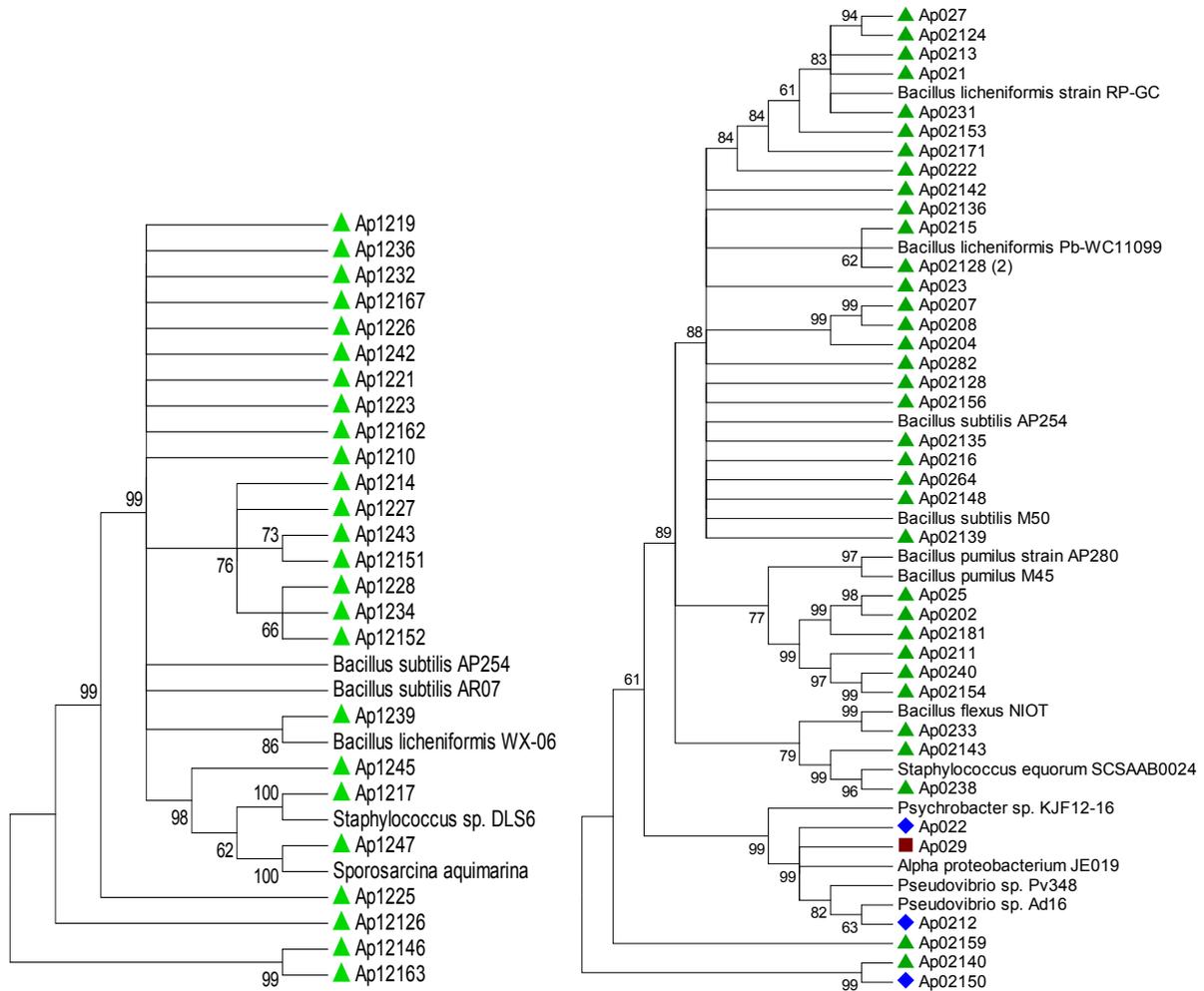


Figura 12. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* y cepas de referencia del mes de a) agosto y b) octubre.

Las bacterias aisladas de diciembre correspondieron a tres géneros, uno de ellos (*Sporosarcina*) que solo se obtuvo durante ese mes (Fig. 13a). En febrero las bacterias aisladas se relacionaron con cinco géneros, al igual que en abril fueron los meses con mayor diversidad de especies, siendo la mayoría pertenecientes al género *Bacillus* (Fig. 13b).



a)

b)

Phyla Firmicutes ▲ Actinobacteria ■ Proteobacteria ◆

Figura 13. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* y cepas de referencia del mes de a) diciembre y b) febrero.

Como se pudo observar con los resultados anteriores, existe una variación temporal en la composición de especies asociadas a la esponja. Por géneros, en forma gráfica (Fig. 14) se muestra que seis de ellos solo fueron aislados en uno de los meses de recolecta. Los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus* estuvieron representados con sus diferentes especies en todos los meses. El mayor porcentaje

de aparición de bacterias pertenecientes a *Staphylococcus* ocurrió durante agosto, mientras que para *Bacillus* el mayor porcentaje se presentó en febrero.

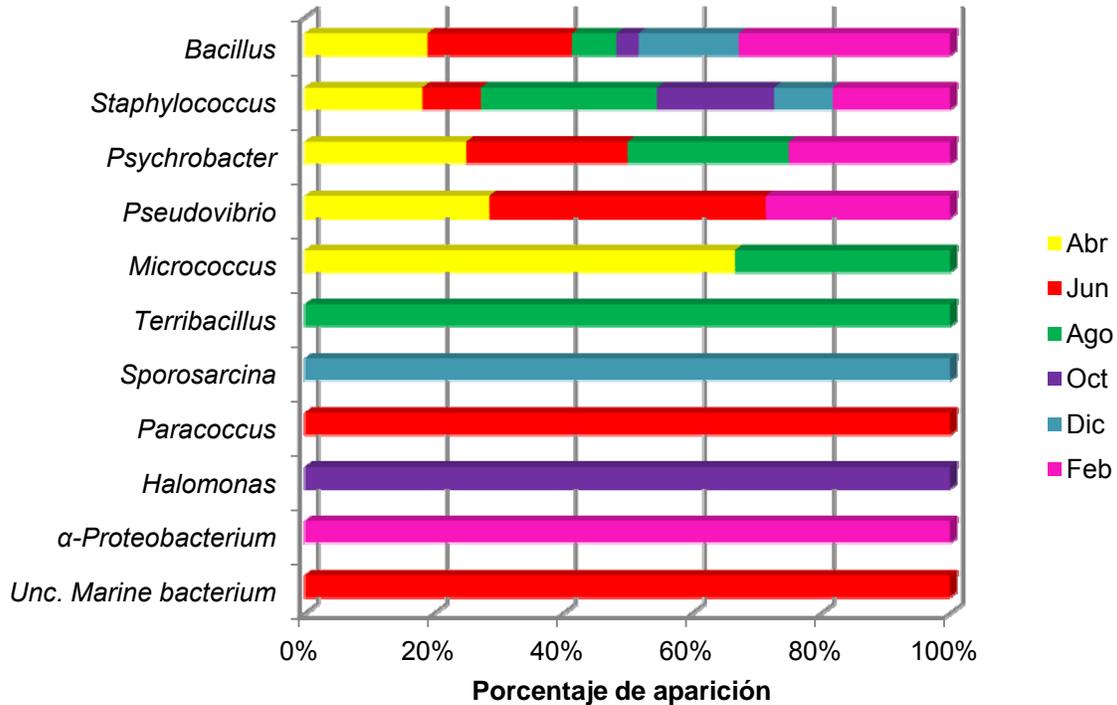


Figura 14. Porcentaje de aparición de los géneros de bacterias aisladas en los diferentes meses de muestreo.

En cuanto a la variación espacial de acuerdo a la profundidad de recolecta, no se encontró una diferencia significativa entre el número de especies aisladas en cada una de ellas ($p=0.979$) (Fig. 15).

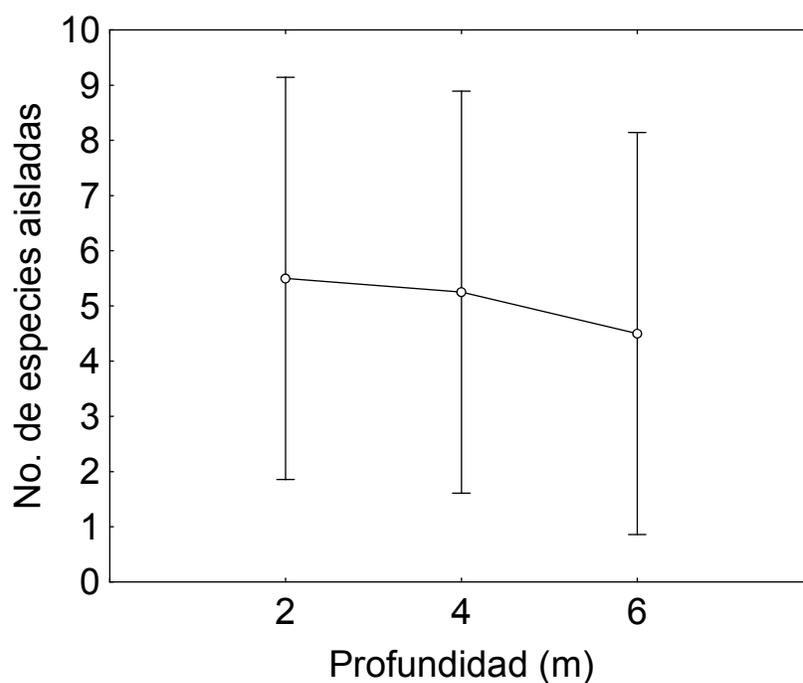


Figura 15. Número de especies aisladas de la esponja *Aplysina gerardogreeni* por profundidad.

Por géneros (Fig. 16), se puede observar que la mayor diversidad se encontró en las esponjas recolectadas a los dos metros de profundidad, cinco de los géneros estuvieron presentes en las esponjas de todas las profundidades, mientras que *Sporosarcina*, *Paracoccus* y *Pseudovibrio* solo se aislaron a los dos metros. *Halomonas* solo se encontró a los cuatro metros y *Terribacillus* solo a los seis metros. *Bacillus* fue dominante en las tres profundidades, en cuanto a número de especies aisladas.

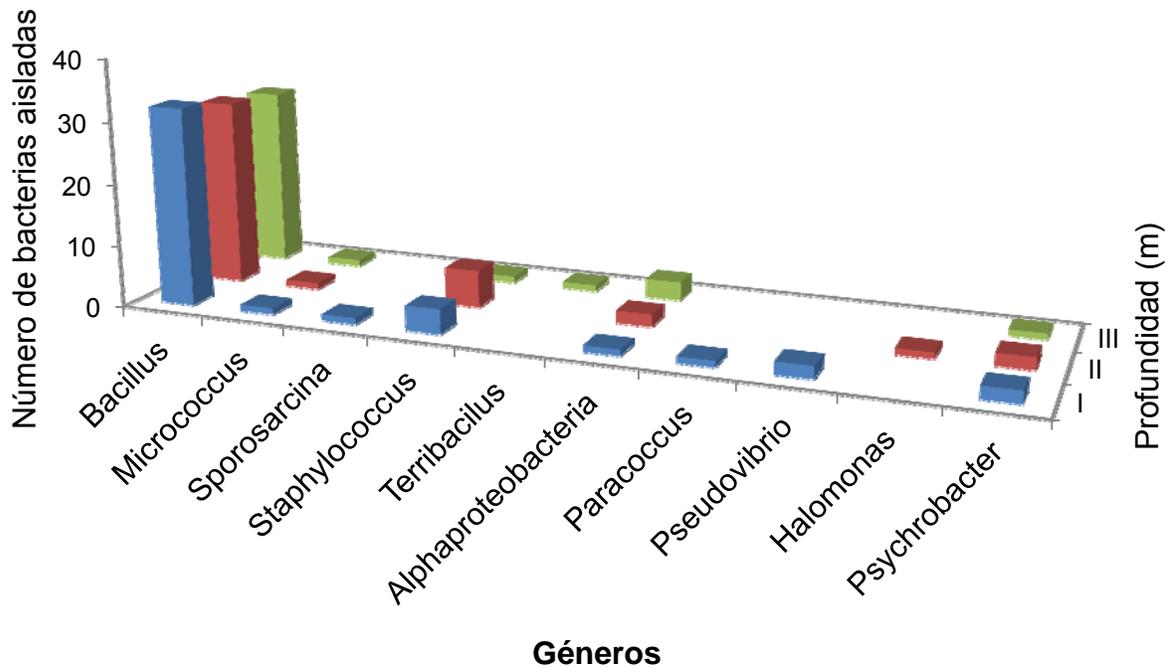


Figura 16. Número de bacterias por género aisladas de *Aplysina gerardogreeni* por género y por profundidad.

Actividad biológica de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

Actividad antimicrobiana.

Este bioensayo mostró que de las 167 cepas bacterianas aisladas, 89 fueron activas al menos frente a una de las cepas probadas. Los mejores resultados se obtuvieron frente a *Staphylococcus aureus*, donde el 58% de los morfotipos aislados fueron activos, mostrando los mayores halos de inhibición las cepas identificadas como *Bacillus licheniformis* (Ap021) y *Bacillus subtilis* (Ap0858, Ap10164) (Fig. 17a, Tabla 9). Frente a *Escherichia coli* sólo el 22% de los morfotipos fueron activos y los halos de inhibición no sobrepasaron los 15 mm, siendo *Bacillus subtilis* (Ap08127, Ap1050, Ap1051, Ap1054, Ap1221) y *Psychrobacter maritimus* (Ap04104) los que mostraron los mayores halos de inhibición, aunque menores en comparación con los del control positivo de ampicilina (32 ± 5 mm) (Fig. 17b, Tabla 9).



a)



b)

Figura 17. Halos de inhibición de crecimiento de a) *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli*.

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

ID	Especie más cercana	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ap0202	<i>Bacillus pumilus</i> M45	++	
Ap0204	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	++++	
Ap0207	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	+++	+
Ap0208	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	+++	+
Ap021	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	+++++	+
Ap02128(2)	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099	+	
Ap0213	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	+	
Ap02135	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	++	+
Ap02136	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-HK09001	+	
Ap02139	<i>Bacillus subtilis</i> M50	+	
Ap02140	<i>Bacillus</i> sp. I-SI-32	+	
Ap02143	<i>Staphylococcus</i> sp. D88	++	
Ap02148	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++	
Ap02150	<i>Psychrobacter</i> sp. KJF12-16	+	
Ap02153	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	+	
Ap0222	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	+	
Ap0231	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	++	
Ap0240	<i>Bacillus pumilus</i> M45	+	
Ap025	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	+++	
Ap027	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	+	
Ap04100	<i>Bacillus pumilus</i> M45	++	
Ap04101	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	+++	+
Ap04102	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	+++	+

ID	Especie más cercana	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ap04104	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	+++	++
Ap04117	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	+++	+
Ap04120	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	+	
Ap04168	<i>Pseudovibrio sp.</i> Mexdt2	++	
Ap04174	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+	
Ap0444	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	+	
Ap0456	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	++	
Ap0467	<i>Bacillus pumilus</i> M45	+	
Ap0477	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	+	
Ap0480	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++	
Ap0488	<i>Bacillus sp.</i> SMAKK003	+	
Ap0492	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	++	
Ap06106	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	++	
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	+++	
Ap06111	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	+	
Ap06113	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> F71059	+	
Ap06115	<i>Bacillus nealsonii</i> CB-KC-1		
Ap06116	<i>Staphylococcus sp.</i> CBMAI 1081	+++	+
Ap06130	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++	+
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i> CSMCRI 1044	++	
Ap06141	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> CBMAI1103	++	
Ap0624	<i>Paracoccus sp.</i> F11014	++++	+
Ap063	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	++	
Ap0637	Uncultured marine bacterium	+++	+
Ap0665	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	+++	+
Ap0674	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++	
Ap0676	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++++	+
Ap0686	<i>Bacillus pumilus</i> M45	++	
Ap0689	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	+	
Ap0697	<i>Bacillus pumilus</i> M45	++	
Ap08122	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++++	+
Ap08127	<i>Bacillus subtilis</i> M50	+++	++
Ap08160	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++++	+
Ap08161	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++++	
Ap0853	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	++	
Ap0858	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++++	+
Ap10164	<i>Bacillus subtilis</i> M50	+++++	+
Ap1048	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++	
Ap1049	<i>Staphylococcus sp.</i> EB338	+++	
Ap1050	<i>Bacillus subtilis</i> M50	+++	++
Ap1051	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++	++
Ap1054	<i>Bacillus subtilis</i> M50	+++	++

ID	Especie más cercana	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ap1068	<i>Bacillus subtilis</i> M50	++++	+
Ap1210	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	+
Ap12126	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	++	
Ap1214	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	++++	+
Ap12146	<i>Bacillus sp.</i> ISA-3174	+++	+
Ap12151	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	+++	+
Ap12152	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	+
Ap12162	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	
Ap12163	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10180	++	+
Ap12167	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	+
Ap1217	<i>Staphylococcus sp.</i> DLS6	++	
Ap1221	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++	++
Ap1223	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	+
Ap1225	<i>Bacillus sp.</i> RP-234	++++	
Ap1226	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++++	+
Ap1227	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	+++	+
Ap1228	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	++++	+
Ap1232	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++++	
Ap1236	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	+++	+
Ap1239	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-06	+	
Ap1242	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	++++	
Ap1243	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	++++	
Ap1245	<i>Bacillus pumilus</i> M45	++	+
Ap1247	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	+++	+

+ (5-10 mm), ++ (11-15 mm), +++ (16-20 mm), ++++ (21-25 mm), +++++ (26-30 mm)

Variación temporal de la actividad antimicrobiana.

Para poder analizar la variación temporal de la actividad se hizo un comparativo del número total de bacterias aisladas y de aquellas que presentaron actividad en cada mes frente a *Staphylococcus aureus* (Fig. 18), diciembre fue el mes en el que se mostró la mayor actividad, de 25 cepas probadas 23 fueron activas, se observa también que el mayor número de bacterias con actividad pertenecen al Phyla Firmicutes y que las bacterias del Phyla Actinobacteria no presentaron actividad.

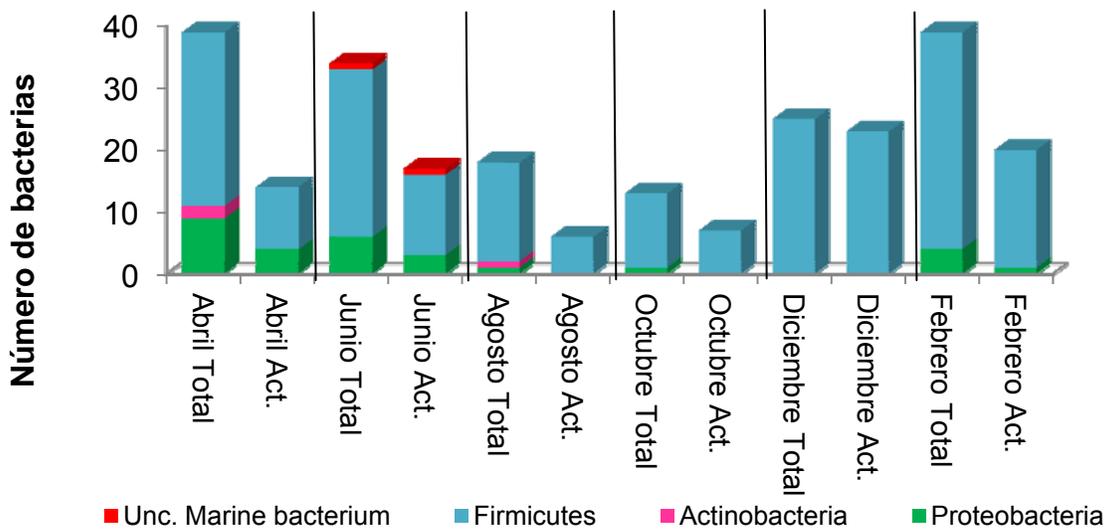


Figura 18. Número de bacterias aisladas y de aquellas que mostraron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* en los diferentes meses.

Con base en esta comparación se calculó el porcentaje de especies activas por mes. En la figura 19 se puede observar que con excepción de abril y agosto, más de la mitad de las bacterias mostraron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

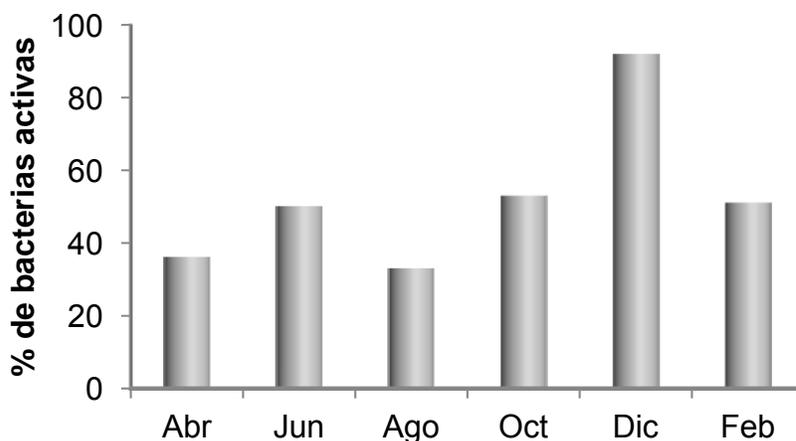


Figura 19. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de *A. gerardogreeni* con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

La actividad frente a *Escherichia coli* en general fue baja, de nuevo el mayor número de bacterias activas se presentaron en diciembre (Fig. 20).

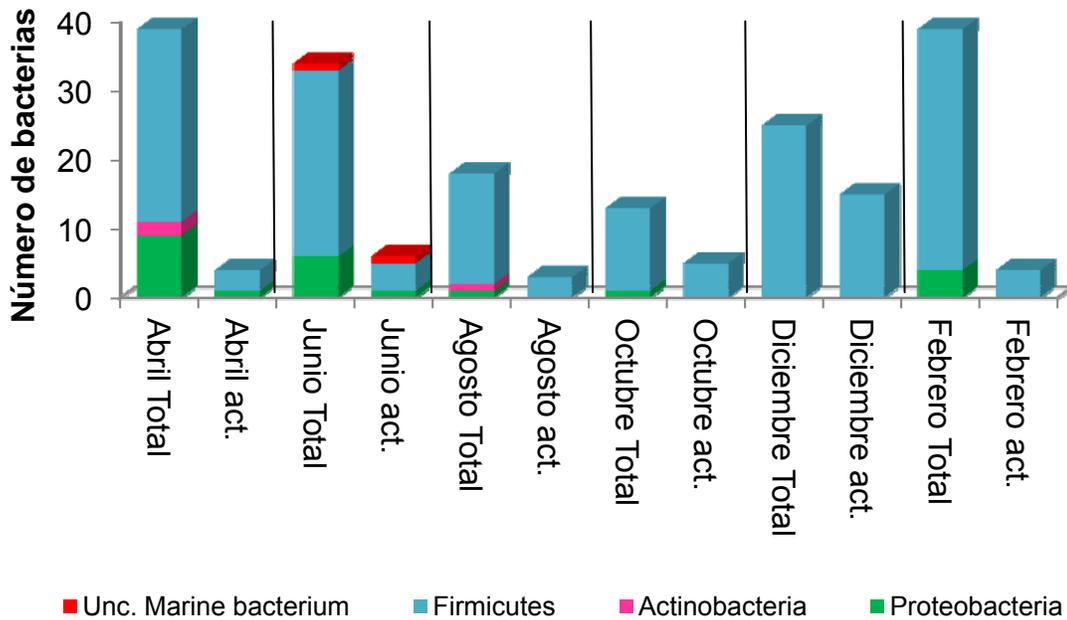


Figura 20. Número de especies de bacterias aisladas y de aquellas que mostraron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* en los diferentes meses.

A diferencia de lo ocurrido frente a *S. aureus*, con excepción de diciembre, en todos los meses el porcentaje de bacterias activas frente a *E. coli* fue menor al 50% (Fig. 21).

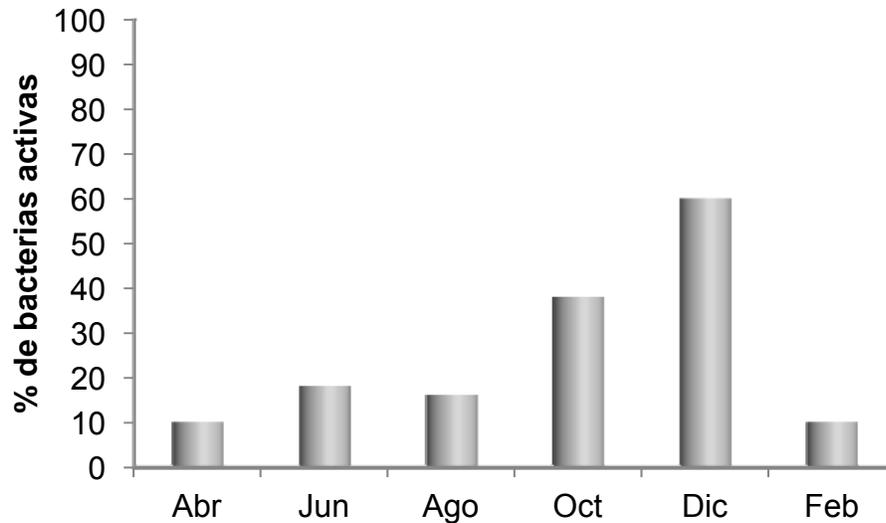


Figura 21. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de *A. gerardogreeni* con actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*.

Los mayores halos de inhibición se obtuvieron con algunas bacterias de agosto, octubre y febrero (>25 mm) frente a *Staphylococcus aureus*. En diciembre a pesar que fue el mes con más bacterias activas, los halos que presentaron fueron en su mayoría de 15 a 20 mm (Fig. 22).

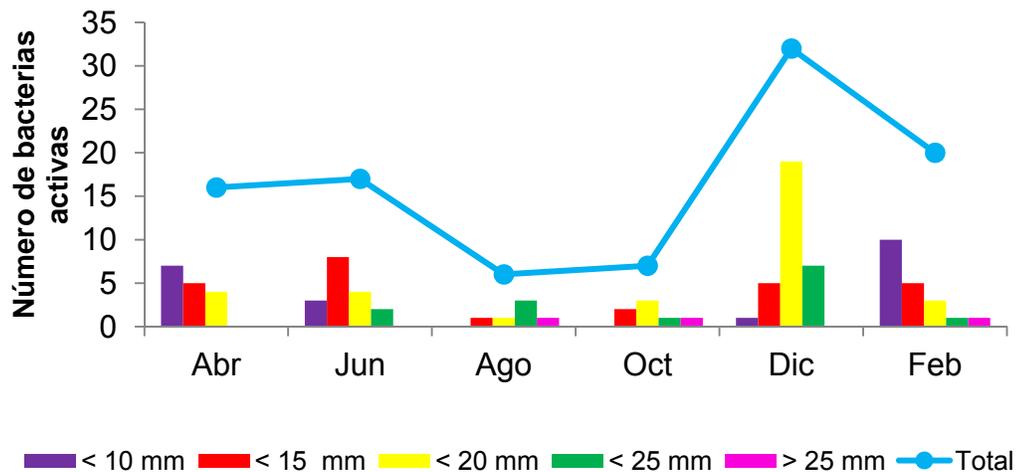


Figura 22. Número de bacterias con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, de acuerdo al tamaño del halo de inhibición.

Frente a *E. coli*, solo se observaron halos pequeños, la mayoría menores a 10 mm (Fig. 23).

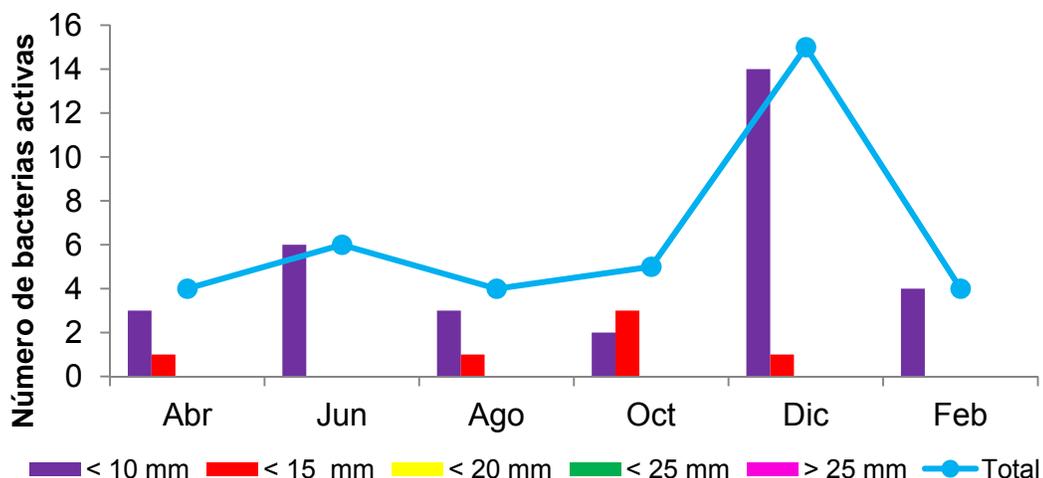


Figura 23. Número de bacterias con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, de acuerdo al tamaño del halo de inhibición.

Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de bacterias cultivadas.

De acuerdo al bioensayo anterior, se seleccionaron 68 cepas, con base en su actividad y que presentaron halos de inhibición mayores a 10 mm. Se obtuvieron extractos orgánicos de cada cepa, los cuales fueron sometidos nuevamente a las pruebas de actividad antimicrobiana. Los resultados de este bioensayo mostraron que solo 7 de los 68 extractos fueron activos frente a *S. aureus* con halos de inhibición de menor tamaño en comparación con los obtenidos en la prueba preliminar con la suspensión bacteriana (Fig. 24, Tabla 10). Frente a *E. coli* solo un extracto mostró actividad pero con un halo pequeño (Fig. 25, Tabla 10).

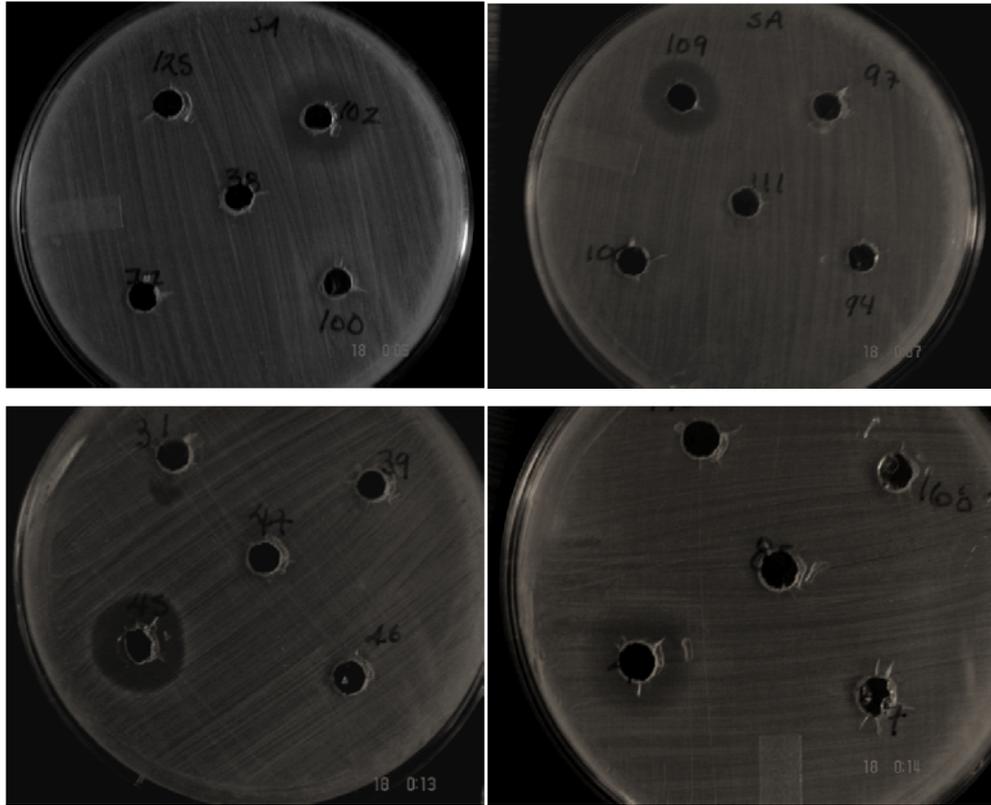


Figura 24. Halos de inhibición de los extractos orgánicos de bacterias aisladas de *Aplysia gerardogreeni* frente a *S. aureus*.

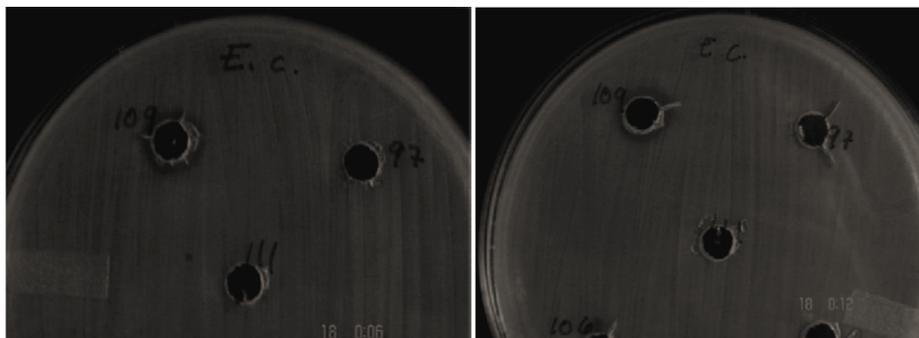


Figura 25. Halos de inhibición de los extractos orgánicos de bacterias aisladas de *Aplysia gerardogreeni* frente a *E. coli*.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos de bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

	Extracto	Mes	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm) *	<i>Escherichia coli</i> (mm)*
Ap04102	<i>Bacillus licheniformis</i>	Abril	12 ± 0.5	
Ap04117	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Abril	8 ± 1.0	
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i>	Junio	10 ± 0.0	4 ± 0.5
Ap1245	<i>Bacillus pumilus</i>	Diciembre	12 ± 1.0	
Ap12166	<i>Bacillus</i> sp.	Diciembre	10 ± 0.0	
Ap021	<i>Bacillus</i> sp.	Febrero	16 ± 0.0	
Ap024	<i>Bacillus subtilis</i>	Febrero	14 ± 0.5	

*Promedio de tres réplicas.

Variación temporal de la actividad antimicrobiana de los extractos.

Debido a la baja actividad presentada con los extractos no se pudo valorar si existe una variación estacional, en los meses de agosto y octubre ningún extracto mostró actividad frente a *S. aureus* mientras que frente a *E. coli* solo un extracto de junio presentó un pequeño halo de inhibición.

Bioensayos de actividad antiépibiótica.

- Bacterias marinas

El bioensayo mostró que el 87% de los extractos fueron activos frente a alguna de las cepas de bacterias marinas. En la tabla 11 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de los extractos activos. El extracto de la bacteria *Bacillus pumilus* (Ap02159) mostró el más amplio espectro de actividad, inhibiendo 7 de las 15 cepas de bacterias de prueba a bajas concentraciones. Por otra parte, frente a *Bacillus laterosporus*, *Shewanella putrefaciens*, *Polaribacter irgensii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Vibrio natriegens*, *V. proteolyticus* y *V. carcharie*, ninguno de los extractos fue activo.

La cepa marina más sensible fue *Bacillus subtilis*, siendo inhibida por el 69% de los extractos, la mayoría a la más baja concentración probada (MIC de 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 26).

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las bacterias que mostraron actividad antiepibiótica frente a bacterias marinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

ID	Bacteria aislada (Extracto)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Ap04100	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	-	10	-
Ap04101	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	50	-	-	-
Ap04102	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.01	1	-	-	-	-	-
Ap04110	<i>Psychrobacter maritimus</i>	-	-	0.1	-	-	-	10
Ap04117	<i>Staphylococcus arlettae</i>	0.01	-	-	-	-	-	-
Ap04120	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	50	-	-	-	-
Ap04168	<i>Pseudovibrio sp.</i>	0.01	-	1	-	-	-	-
Ap0492	<i>Psychrobacter maritimus</i>	-	-	0.1	-	0.01	-	-
Ap0488	<i>Bacillus sp.</i>	50	-	10	-	-	-	-
Ap0498	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	0.1	-	-	-	-
Ap0630	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	0.01	-	-	-	-
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i>	10	-	10	-	-	-	-
AP06111	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	-	0.01	-	-	0.1	-
Ap06116	<i>Staphylococcus sp.</i>	0.1	-	-	-	50	10	-
Ap06130	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	50	-	-	-
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i>	-	-	0.1	-	-	-	-
Ap06141	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	10	-	-	-	50	10	-
Ap06165	<i>Bacillus pumilus</i>	0.01	-	0.1	50	-	-	-
Ap0624	<i>Paracoccus sp.</i>	0.01	-	-	-	-	-	-
Ap0637	Marine bacterium	0.01	-	0.01	10	-	-	-
Ap0676	<i>Bacillus subtilis</i>	-	1	-	-	-	-	-
Ap0685	<i>Psychrobacter maritimus</i>	0.01	-	0.01	-	-	-	-
Ap0694	<i>Bacillus megaterium</i>	0.01	-	-	0.01	-	0.01	-
Ap0697	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	10	-	-	-	-
Ap08127	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	-	-	-	-	-	-
Ap08147	<i>Bacillus pumilus</i>	0.1	-	-	-	50	10	-
Ap08161	<i>Bacillus subtilis</i>	1	-	-	-	10	1	10
Ap0846	<i>Terribacillus goriensis</i>	-	0.01	10	-	-	-	-
Ap0853	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	10	-	-	-
Ap0858	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	50	-	-	-	-	-
Ap0869	<i>Psychrobacter maritimus</i>	0.01	50	50	-	50	10	-
Ap0879	<i>Micrococcus luteus</i>	50	-	-	-	10	10	-
Ap10164	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	50	-	-	-	-	-
Ap1049	<i>Staphylococcus sp.</i>	10	-	-	-	0.1	10	-
Ap1050	<i>Bacillus subtilis</i>	50	-	-	-	50	0.1	-
Ap12146	<i>Bacillus sp.</i>	10	50	-	-	-	-	-

ID	Bacteria aislada (Extracto)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Ap12151	<i>Bacillus subtilis</i>	10	-	-	-	-	-	-
Ap12163	<i>Bacillus licheniformis</i>	50	-	-	-	0.1	1	-
Ap1217	<i>Staphylococcus</i> sp.	0.1	-	-	-	-	-	-
Ap1221	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	-	50	-	-	-	-
Ap1225	<i>Bacillus</i> sp.	0.01	50	50	-	-	-	-
Ap1228	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	-	-	-	-	-	-
Ap1245	<i>Bacillus pumilus</i>	10	-	50	-	-	-	-
Ap1247	<i>Sporosarcina aquamarina</i>	10	-	-	-	-	-	-
Ap021	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.01	-	-	-	-	-	-
Ap0213	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	1	-	-	-	1
Ap2128(2)	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	50
Ap02135	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	-	1	-	0.1	1	-
Ap02136	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	0.1	-	-	-	10
Ap02140	<i>Bacillus</i> sp.	0.01	-	10	-	-	-	10
Ap0233	<i>Bacillus flexus</i>	0.01	-	0.01	-	-	-	1
Ap02148	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	10	50	-	-	1
Ap02156	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.01	50	-	50	10	10	-
Ap022	<i>Pseudovibrio</i> sp.	0.01	-	0.1	-	-	-	-
Ap0231	<i>Bacillus subtilis</i>	10	-	10	-	-	-	-
Ap0238	<i>Staphylococcus equorum</i>	-	0.1	-	-	-	-	-
Ap0204	<i>Bacillus subtilis</i>	1	-	0.1	10	-	-	-
Ap02159	<i>Bacillus pumilus</i>	0.01	0.01	0.1	0.1	-	10	0.01
Ap027	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	1	-	-	-	-

B1 *Bacillus subtilis*, **B2** *B. sphaericus*, **B3** *B. cereus*, **B4** *Vibrio aestuarianus*, **B5** *V. harveyi*, **B6** *V. parahemolyticus*, **B7** *Roseobacter litoralis*, - No actividad

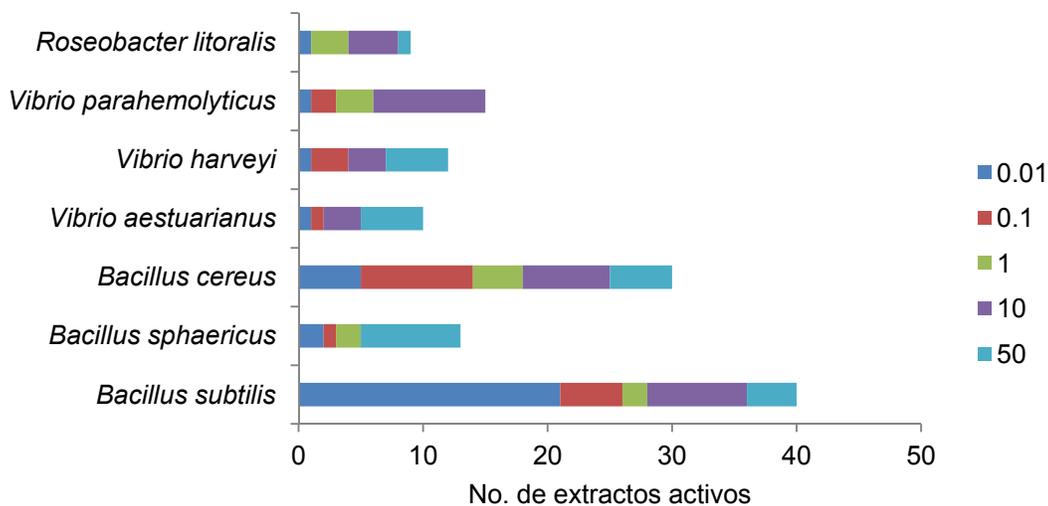


Figura 26. Número de extractos activos frente a las bacterias marinas a diferentes concentraciones (0.01 - 50 µg mL⁻¹).

El mayor número de extractos activos fueron los correspondientes a las bacterias aisladas en el mes de febrero (15), seguidas de las de junio (14), mientras que el menor número de extractos que inhibieron el crecimiento fueron los de las bacterias del mes de octubre (3) (Fig. 27). En todos los meses se observó actividad de los extractos frente a las bacterias marinas a las concentraciones más bajas ($0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$), en junio y febrero este número de extractos fue mayor (Fig. 28).

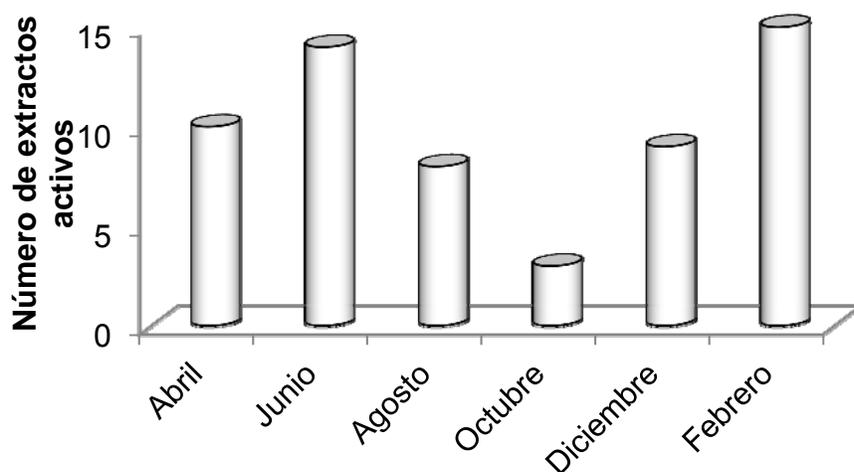


Figura 27. Número de extractos con actividad antiépibiótica frente a bacterias marinas en cada mes de muestreo.

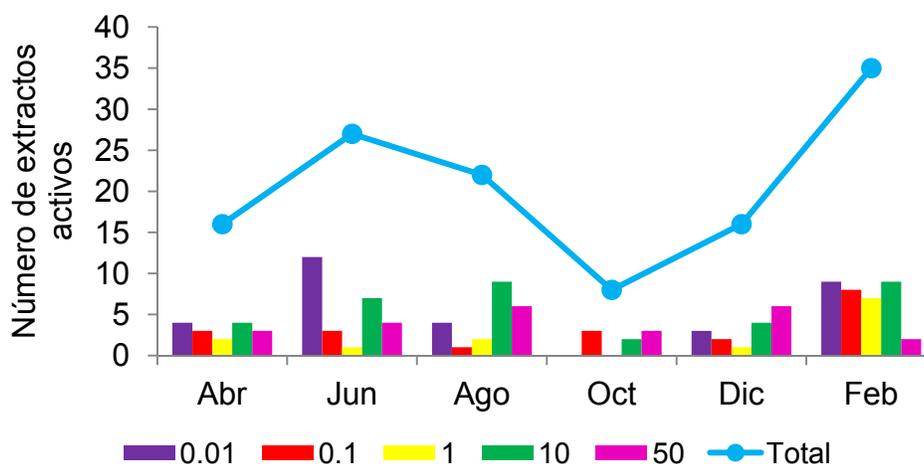


Figura 28. Número de extractos activos frente a bacterias marinas a las diferentes concentraciones probadas.

- Microalgas

El 23% de los extractos mostraron actividad frente a alguna de las cinco cepas de microalgas probadas (Tabla 12). La más sensible fue *Cylindrotheca closterium* ya que 29 extractos fueron capaces de inhibir su crecimiento a bajas concentraciones (Fig. 29). Las bacterias identificadas como *Bacillus cibi* Ap06145, *Bacillus licheniformis* Ap04102, *Bacillus pumilus* Ap0697, *Bacillus sonorensis* Ap06137, *Bacillus subtilis* Ap02139 Ap04101, Ap0676, Ap06130 y *Psychrobacter maritimus* Ap0456 presentaron actividad frente a las cinco microalgas.

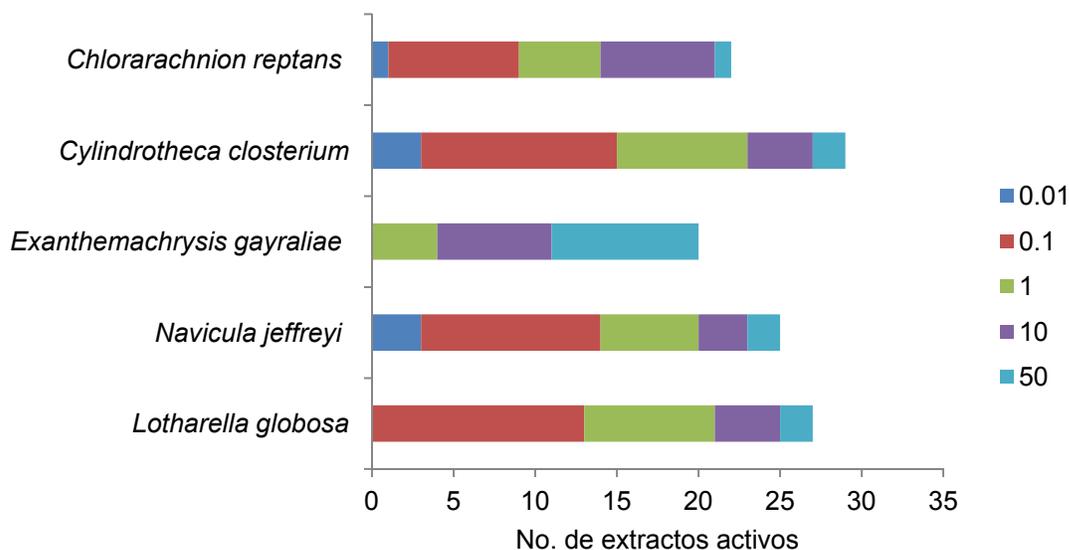


Figura 29. Número de extractos activos frente a las microalgas de prueba a diferentes concentraciones (0.01 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las bacterias que mostraron actividad antimicroalgal ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

ID	Bacteria aislada (Extracto)	M1	M2	M3	M4	M5
Ap04100	<i>Bacillus pumilus</i>	1	-	1	1	-
Ap04101	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	0.1	10	0.1	0.1
Ap04102	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	0.1	50	0.1	0.1
Ap04110	<i>Psychrobacter maritimus</i>	1	0.1	-	50	-
Ap04117	<i>Staphylococcus arlettae</i>	1	1	-	10	-
Ap04120	<i>Bacillus subtilis</i>	-	0.01	50	-	-
Ap04168	<i>Pseudovibrio</i> sp.	-	-	10	10	10
Ap0456	<i>Psychrobacter maritimus</i>	50	0.1	10	0.1	1
Ap0477	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	1	10	0.01	1
Ap0488	<i>Bacillus</i> sp.	10	0.1	-	-	-
Ap0498	<i>Micrococcus luteus</i>	0.1	0.01	-	0.1	10
Ap06106	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	0.1	-
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1	1	-	10	0.1
Ap06111	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	50	-	-	1
Ap06130	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	0.1	1	0.1	10
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i>	10	0.1	50	0.1	0.1
Ap06145	<i>Bacillus cibi</i>	0.1	50	50	0.01	10
Ap0624	<i>Paracoccus</i> sp.	10	-	50	1	0.1
Ap0637	Marine bacterium	-	-	-	1	-
Ap0676	<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	50	1	50
Ap0685	<i>Psychrobacter maritimus</i>	-	0.1	10	0.1	-
Ap0694	<i>Bacillus megaterium</i>	0.1	0.1	10	-	-
Ap0697	<i>Bacillus pumilus</i>	1	0.01	10	0.01	0.1
Ap0853	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1	1	-	1	-
Ap021	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1	-	-	0.1	10
Ap02128(2)	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	0.1	10
Ap0213	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1	0.1	-	-	-
Ap02136	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1	10	-	-	-
Ap02139	<i>Bacillus subtilis</i>	1	10	50	10	10
Ap02150	<i>Psychrobacter</i> sp.	0.1	-	1	-	0.1
Ap02140	<i>Bacillus</i> sp.	10	0.1	50	1	-
Ap022	<i>Pseudovibrio</i> sp.	-	-	1	0.1	0.1
Ap0231	<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	-	10	1	1
Ap0238	<i>Staphylococcus equorum</i>	1	1	-	50	1
Ap0204	<i>Bacillus subtilis</i>	50	-	50	0.1	0.01
Ap0240	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	0.1
Ap027	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	10	-	1	10

M1 *Chlorarachnion reptans*, **M2** *Cylindrotheca closterium*, **M3** *Exanthemachrysis gayraliae*, **M4** *Navicula jeffreyi*, **M5** *Lotharella globosa*, - No actividad

Al igual que con las bacterias marinas, el mayor número de extractos activos frente a las microalgas se obtuvieron en febrero y junio. Los extractos de octubre y diciembre no mostraron ninguna actividad frente a ninguna de las microalgas (Fig. 30). La mayoría de los extractos mostraron actividad frente a las microalgas a una concentración de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los meses de abril, junio y febrero. Muy pocos extractos fueron activos a la más baja concentración (Fig. 31).

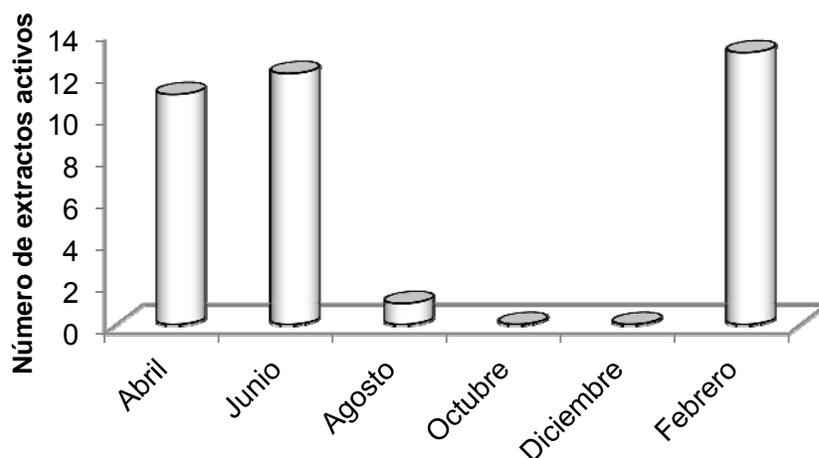


Figura 30. Número de extractos con actividad antiepibiótica frente a microalgas marinas en cada mes de muestreo.

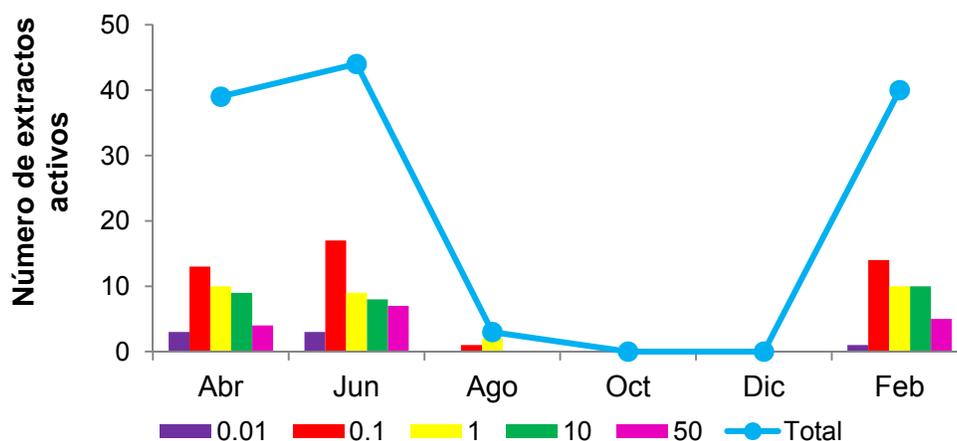


Figura 31. Número de extractos activos frente a microalgas marinas a las diferentes concentraciones probadas.

En la figura 32 se presentan los porcentajes por género de las bacterias que mostraron actividad antiepibiótica tanto frente a bacterias como a microalgas marinas. Resulta evidente que las bacterias asociadas a *A. gerardogreeni* del género *Bacillus* fueron las que presentaron la mayor actividad frente a los microorganismos formadores de biofouling.

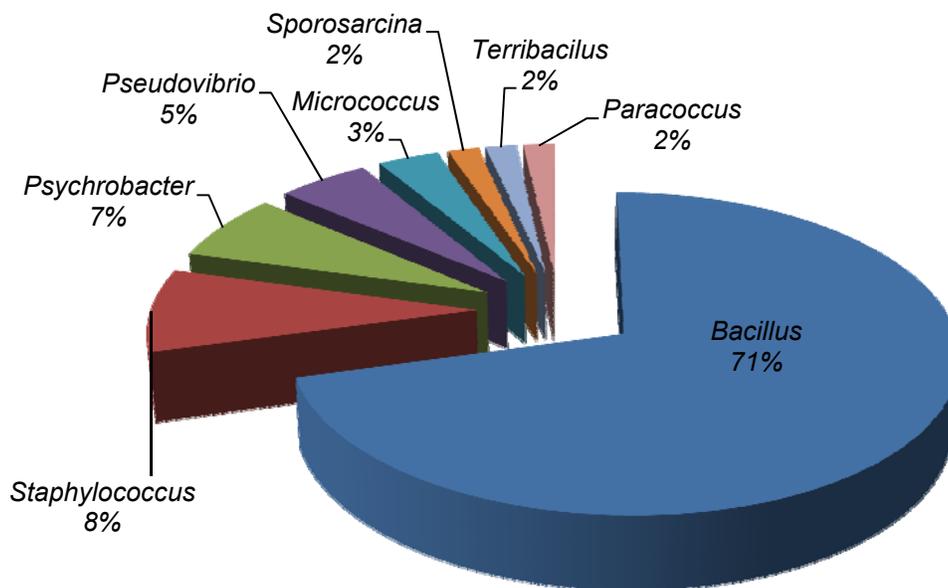


Figura 32. Porcentaje de bacterias a nivel de género que presentan actividad antiepibiótica frente a bacterias y microalgas marinas.

DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

Trabajos como el presente en los que se caracteriza a los microorganismos asociados a esponjas son de interés por diversas razones; una de ellas es debido a la producción de metabolitos secundarios de importancia industrial o farmacéutica, y por otro lado, debido a que el mesohilo de las esponjas representa un nicho ecológico especializado que podría dar lugar a la existencia de una diversidad de bacterias que hasta ahora no han sido caracterizadas (Friedrich *et al.*, 1999). Por ello, existe cada vez mas evidencia que pone de manifiesto el significativo papel de las bacterias en las asociaciones esponja-bacteria (Hentschel *et al.*, 2001; Müller, 2003). Se ha sugerido además, que es muy importante analizar estas asociaciones para conocer la función biológica de las sustancias activas que producen estas bacterias y examinar la relación bacteria-esponja en la búsqueda de nuevos productos farmacéuticos (Hentschel *et al.*, 2001). Por ello, como un primer avance en el estudio de estas asociaciones se caracterizaron e identificaron las especies de bacterias heterótrofas cultivables asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* recolectada en un arrecife rocoso de Punta Arena, B.C.S., México.

A partir de *A. gerardogreeni* se lograron aislar 167 cepas de bacterias, mientras que en *A. aerophoba* del mar Mediterráneo, Hentschel *et al.* (2001) reportaron 238 aislamientos. Es importante aclarar que en esta tesis se utilizó un solo medio de cultivo (agar soya tripticasa) mientras que con *A. aerophoba* se utilizaron medio Zobell para heterótrofas, un medio enriquecido para oligotróficas, uno específico para cianobacterias y una cámara para aislamiento de bacterias anaerobias. En estudios con otros géneros donde también se probaron varios medios, se aisló un número semejante de cepas por ejemplo 145 de *Dendrilla nigra* y 178 de *Suberites zeteki* (Nadyne, 2006; Selvin *et al.*, 2009).

Se sabe que en ambientes marinos, aproximadamente el 1% de las bacterias han logrado ser cultivadas, y en el caso de las esponjas es probable que muchos de los simbioses requieran de condiciones de cultivo altamente especializadas para replicar las condiciones fisiológicas particulares que se tienen en el tejido de la esponja (Burja & Hill, 2001). En este trabajo, el medio utilizado no presenta limitaciones en las fuentes de carbono, energía y nitrógeno por lo que fue propicio para el crecimiento de bacterias de los principales grupos encontrados en otras esponjas, permitiendo el aislamiento de bacterias heterótrofas aerobias tanto Gram positivas como Gram negativas (Friedrich *et al.*, 1999; Hentschel *et al.*, 2003).

El 90.5% de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni* fueron Gram positivas, esto dado en gran parte por la cantidad de cepas de *Bacillus* que se aislaron, las cuales fueron dominantes en los ejemplares de todos los meses estudiados. En cuanto a las morfologías colonial y microscópica, la mayoría de las cepas aisladas mostraron características del género *Bacillus*, ya que dichas colonias presentaron un anillo concéntrico en el centro y un borde irregular (Wakita *et al.*, 2001). Las primeras investigaciones realizadas para estimar la población bacteriana en el agua de mar, indicaron que las bacterias Gram negativas representaban el 95% (Zobell, 1946; Moriarty & Hayward, 1982; Jensen & Fenical, 1995), según estos mismos estudios, los microorganismos Gram positivos esporulados no abundan en la columna de agua y su importancia es mucho mayor en los sedimentos, lo cual ha sido confirmado en estudios recientes donde han encontrado, al igual que en este trabajo, una alta proporción de bacterias Gram positivas en esponjas y sedimentos (Webster *et al.*, 2001; Lugioyo *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005; Gontang *et al.*, 2007). Lo anterior, aunado a que las bacterias que habitan en las esponjas son diferentes a las presentes en el agua circundante (Wilkinson *et al.*, 1981; Santavy & Colwell, 1990; Burja & Hill, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Weisz *et al.*, 2007) parece indicar que la comunidad de bacterias asociadas al mesohilo de esponjas podrían ser huéspedes verdaderos y no solo parte del alimento que filtran. Además, se ha mencionado que los espacios internos de los organismos marinos, como esponjas, contienen más nutrientes que el agua de mar circundante por lo que constituyen microhábitats únicos a los que los microorganismos se adaptan (Hentschel *et al.*, 2003; Hill, 2004;

Hill *et al.*, 2006; Webster & Bourne, 2007) y este hecho puede ser clave para determinar la diversidad de bacterias asociadas a esponjas (Dobretsov *et al.*, 2006).

Cuantificación de bacterias por epifluorescencia.

Se ha reportado la presencia de un gran número de bacterias en varias esponjas del orden Demospongiae (Willenz & Hartmann, 1989; Müller, 2003). En este trabajo para *Aplysina gerardogreeni* se tiene un valor promedio anual de 9.7×10^8 cel g^{-1} . En *Aplysina aerophoba*, se han estimado abundancias de $6.4 \pm 4.6 \times 10^8$ bacterias g^{-1} (Friedrich *et al.*, 2001). El género *Aplysina* se ubica dentro del grupo llamado "bacterioesponjas" o de "alta abundancia microbiana" de acuerdo con Vacelet & Donadey (1977, Citado en Müller, 2003), las cuales tienen densidades entre 10^8 y 10^{10} células bacterianas por gramo (peso húmedo) de esponja, superando por dos o tres órdenes de magnitud la del agua del mar circundante, mientras que la concentración de bacterias asociadas con "esponjas de baja abundancia microbiana" es similar a la del agua de mar (Friedrich *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001). Esta diferencia en las asociaciones microbianas tiene implicaciones importantes para la biología, fisiología y ecología de la esponja. Se ha observado que esponjas con alta abundancia de microorganismos tienen un mesohilo más denso y un sistema acuífero compuesto por largos y estrechos canales, los cuales requieren de tasas de filtración más lentas de tal forma que la cantidad de bacterias esta inversamente correlacionada con el sistema de irrigación de la esponja (Vacelet & Donadey, 1977, Citado en Müller, 2003). Además estas altas densidades de microorganismos asociados a la esponja le ofrecen ventajas nutricionales por su capacidad de alimentarse de materia orgánica disuelta en el agua de mar filtrada (Wilkinson, 1983; Yahel *et al.*, 2003).

Identificación de las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni*.

Para la selección de diferentes morfotipos (167 cepas) el primer criterio se basó en las características morfológicas de las colonias aisladas, posteriormente, con el análisis de las secuencias se encontró que muchas de las cepas que presentaban diferencias morfológicas, se relacionaron con una misma especie. Esto podría deberse a que las cepas marinas pueden utilizar concentraciones muy bajas de nutrientes en el medio marino, y en ocasiones el pleomorfismo que muestran en los cultivos (formas celulares diferentes en un mismo organismo) puede deberse al uso de un medio enriquecido como es el caso del utilizado en este estudio (Wood, 1953). Debido a ello, este pleomorfismo es más marcado en especies marinas que en terrestres (Wood, 1967).

La mayoría de las bacterias aisladas e identificadas por la secuenciación parcial del gen ADNr 16S fueron filogenéticamente más cercanas a bacterias Gram positivas que a Gram negativas como ya se había observado al microscopio con las tinciones Gram. Se aislaron representantes de Proteobacteria (α y γ - Proteobacteria), Actinobacteria y Firmicutes. Dentro de las bacterias asociadas a esponjas, se han encontrado al menos 23 diferentes Phyla (Taylor *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2010), en particular en esponjas del género *Aplysina* del mar Mediterráneo, autores como Wilkinson *et al.* (1981), Friedrich *et al.* (2001) y Hill *et al.* (2006), encontraron que las α - Proteobacteria, δ - Proteobacteria y γ - Proteobacteria son dominantes. Mientras que para *A. fulva* de Brasil los grupos dominantes fueron Chloroflexi, α - Proteobacteria y γ - Proteobacteria (Hardoim *et al.*, 2009). La presencia de bacterias del Phyla Proteobacteria también ha sido documentada en varias esponjas (Friedrich *et al.*, 1999; Thakur & Anil, 2000; Burja & Hill, 2001; Webster *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001; Hentschel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Enticknap *et al.* (2006) encontraron que bacterias de este grupo son transmitidas de los padres a las larvas y mencionan que pueden tratarse de cepas específicas de la esponja que han coevolucionado junto a su hospedero, ya que muchas de ellas no se han encontrado en el agua de mar circundante por lo que han sido consideradas como simbioses

verdaderos de las esponjas. Dentro de este grupo se encuentran bacterias con un importante papel ecológico ya que degradan una amplia variedad de compuestos (mineralización) y participan en la conversión del amonio a nitrito (nitrificación) (Radax *et al.* 2012).

Se tiene evidencia de que esponjas del género *Aplysina* comparten a los grupos bacterianos de las Proteobacterias y Actinobacterias, aun cuando se encuentran en lugares diferentes (Friedrich *et al.*, 2001; Hentschel *et al.*, 2002; 2003; Thoms *et al.*, 2003). Sin embargo, es notable que en ninguno de esos estudios se encontrara como grupo dominante a los Firmicutes como ocurrió en este trabajo con *Aplysina gerardogreeni*. Cabe mencionar que los estudios realizados por los otros autores están basados en la comunidad bacteriana total, identificada mediante herramientas moleculares, en nuestro caso solo pudimos obtener información acerca de la fracción cultivable, por lo que sería difícil poder aseverar si ocurren o no cambios evidentes en la composición de las especies dominantes.

Como se mencionó en el apartado anterior, los Firmicutes fueron los dominantes con el mayor número de especies sobre todo el género *Bacillus*. Estas especies han sido encontradas, aunque no como dominantes, en otras esponjas como *Stelletta tenuis*, *Halichondria rugosa*, *Dysidea avara*, *Craniella australiensis*, *Callyspongia sp.* e *Hymeniacidon perleve*, entre otras (Li, 2009). Al igual que con *Aplysina gerardogreeni*, en otros trabajos se ha encontrado que las cepas más abundantes de este género asociadas a esponjas marinas son *B. subtilis* y *B. pumilus* (Hentschel *et al.*, 2001). Asimismo, estudios recientes mostraron que las cepas de *B. marinus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. mycoides* son habitantes frecuentes en otros invertebrados marinos (Beleneva, 2008).

Los resultados del análisis filogenético y de similitud que se realizó sin duda reflejan un nivel relativamente alto de diversidad de secuencias dentro de las regiones de ADN específicas de las cepas de *Bacillus* que se examinaron. Sin

embargo, el uso del gen 16S no permitió discernir entre las especies de este género, ya que este es muy conservado. Como una alternativa para complementar estos análisis, pudieran emplearse genes codificantes de proteína como el *rpoB*, el cual ha sido utilizado como un marcador potencial que ha permitido la identificación a nivel de especie del género *Bacillus* (Ki *et al.*, 2009).

Caracterización bioquímica.

Con las pruebas realizadas en este trabajo se caracterizó a los microorganismos, encontrando entre las bacterias aisladas sistemas metabólicos muy variados, a pesar de ello todas fueron capaces de utilizar los nutrientes del medio de cultivo empleado, aunque en ocasiones el crecimiento era más lento, con menor cantidad de biomasa o era más difícil recuperar las cepas, esto debido a que cada tipo de bacteria vive en condiciones ambientales diferentes y se adapta al medio lo mejor posible, sin embargo, se sabe que no todos los géneros utilizan los mismos sustratos como fuentes de energía, carbono o nitrógeno, existiendo también gran diversidad de rutas metabólicas para la obtención de dicha energía (Madigan *et al.*, 2000). En el caso de *Bacillus* por ejemplo, la mayoría de las especies de este género se caracterizaron por producir catalasa, enzima que es esencial en la defensa biológica contra la toxicidad del oxígeno y que está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (MacFaddin, 2003), estas especies crecen en medios de cultivo que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros, como únicas fuentes de carbono y pueden utilizar el amonio como fuente de nitrógeno durante la fase exponencial de su crecimiento (Abarca *et al.*, 1992). En su medio natural los productos finales de la fermentación reducen el piruvato a ácido láctico y en algunos casos el resto en una mezcla de CO₂ se convierten en ácido fórmico o acético (Hernández, 2003). Mediante la prueba del rojo de metilo se pudo comprobar que la mayoría de las bacterias aisladas son fermentadoras de estos ácidos. Asimismo, aquellas que dieron positivo a la prueba de Voges Proskauer

indicaron que la glucosa es fermentada con la producción de butanodiol, que es un producto que resulta de la reducción de la acetoína (MacFaddin, 2003).

Todos estos resultados además de ayudar a tener un mayor conocimiento de las especies que habitan en la esponja, proporcionan información para optimizar los medios de cultivo, y continuar con la búsqueda de bacterias de interés, ya que algunas especies solo muestran crecimiento en presencia de un solo tipo de carbohidrato utilizable como fuente de carbono y energía (García-Martos *et al.*, 1996). Por ello es importante conocer los requerimientos y procesos metabólicos para incrementar el éxito de un cultivo y la biomasa o también para en un futuro lograr una mayor producción de antibióticos, esto es, asegurando primero las condiciones apropiadas para un buen crecimiento y después, alterando esas condiciones en el momento adecuado para asegurar una buena producción del metabolito secundario, ya que se conoce que el metabolismo secundario comienza cuando el microorganismo detiene su crecimiento por alguna razón, por ejemplo, por falta de nutrientes, carbono, nitrógeno o fósforo principalmente (Abarca *et al.*, 1992).

Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni*.

Se observó una variación temporal en el número total de bacterias y en la cantidad de cepas aisladas de *Aplysina gerardogreeni*, disminuyendo hacia los meses cálidos del verano y otoño e incrementándose hacia los meses fríos. Esta variación temporal en número de bacterias ha sido reportada por otros autores como Bakus *et al.* (1985) (citado en Thakur & Anil, 2000), Thakur & Anil (2000) y Wichels *et al.* (2006). Estos trabajos se enfocaron en bacterias de la superficie de las esponjas y los autores mencionan que en los meses cálidos, en respuesta al incremento del número de bacterias en el agua circundante, las esponjas presentan una mayor abundancia de bacterias epibiontes para la defensa contra otros microorganismos. Varios factores han sido reportados para explicar la variación estacional en las comunidades bacterianas, como los cambios en las condiciones físicas (Vogel, 1977;

Barthel, 1988; Erpenbeck & van Soest, 2002), la temperatura del agua, la exposición a corrientes de agua, el suministro de oxígeno, salinidad, pH, nitratos y la presencia o ausencia de epibiontes, además se ha mencionado que la naturaleza y composición de los exudados del hospedero también puede influir (Barthel, 1986; Osgood & Boylen, 1990; Guppy & Bythell, 2006; Ling *et al.*, 2012). También se ha identificado que algunos metales pesados son agentes capaces de modificar la estructura de las comunidades bacterianas en el medio marino ya que estos varían con la época principalmente en zonas de descarga de agua fluvial (Riquelme *et al.*, 1997). En la zona de estudio se ha documentado la presencia de metales pesados durante la época de lluvias, los cuales son transportados desde la zona minera de San Antonio, B.C.S. (Nava-Sánchez, 1992). Por lo que alguno de estos factores o en su conjunto pudieron ser determinantes para lo ocurrido con *A. gerardogreeni*.

En relación a la variación de la composición específica, *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* se mantuvieron constantes a lo largo del año. En otros estudios en donde han analizado la estabilidad y la especificidad de los microorganismos asociados a esponjas han encontrado una asociación permanente de las especies de bacterias con las esponjas hospederas en largos periodos (Friedrich *et al.*, 2001; Thoms *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2008a; 2008b; Webster *et al.*, 2008a; 2008b; Klöppel *et al.*, 2008). Sin embargo, en este estudio varias especies fueron aisladas solo durante uno de los meses de muestreo. Aún falta mucho por conocer acerca de la estabilidad de las bacterias y las interacciones con la esponja, así como los factores que causan perturbación y la desaparición o presencia de algunas especies.

Actividad biológica de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

En este estudio se encontró que un alto porcentaje de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni* mostraron actividad tanto antimicrobiana como antiepibiótica. La actividad antimicrobiana fue mayor frente a *Staphylococcus aureus*,

mientras que frente a *Escherichia coli*, si bien se inhibió su crecimiento, hubo menor número de cepas activas y los halos de inhibición fueron de mucho menor tamaño. Las bacterias Gram negativas, como lo es *E. coli*, son generalmente menos susceptibles a antimicrobianos que las bacterias Gram positivas (*S. aureus*) debido a la presencia de una membrana externa y lipopolisacáridos que en conjunto actúan como una barrera eficaz contra las moléculas hidrofóbicas y lipofílicas.

Al realizar los bioensayos con la suspensión bacteriana de los aislamientos, se observó que un 58% de las cepas mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y un 22% frente a *Escherichia coli*, lo cual indica un alto porcentaje de actividad en comparación con bacterias aisladas de otras esponjas que han mostrado que únicamente entre el 5 y el 14.4% de ellas presentaron actividad antimicrobiana (Nair & Simidu, 1987; Chelossi *et al.*, 2004; Chelossi *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010). Sin embargo, al realizar el bioensayo con los extractos orgánicos, solo un 5% de ellos mostraron actividad frente a *S. aureus* lo que se asemeja más a los resultados reportados por otros autores. Esta diferencia en la actividad entre la suspensión bacteriana y los extractos orgánicos puede deberse a varios factores, uno de ellos podría ser que la actividad antimicrobiana se pierde fácilmente durante las resiembras periódicas realizadas para la obtención de los cultivos, lo cual ya ha sido mencionado por otros autores (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008). Otra explicación podría ser que los disolventes utilizados y/o el método de extracción no fueron los adecuados para extraer los compuestos activos, por lo que se requiere de un diseño experimental específico para determinar el mejor método de extracción.

Sin embargo, en los bioensayos de actividad antiepibiótica con los extractos se obtuvo buena actividad a bajas concentraciones, tanto frente a las bacterias marinas como a las microalgas probadas. Hasta ahora, sólo un número limitado de bacterias del medio marino han sido utilizadas para evaluar su actividad antiepibiótica, tal es el caso de las bacterias *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *P. tunicata* y *P. aurantia* aisladas de esponjas y algas que inhibieron el crecimiento de

otras bacterias en el medio marino (Holmström *et al.*, 2002). *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *Pseudomonas* sp. aisladas de algas y de un nudibranquio, al igual que en el presente trabajo inhibieron la adhesión bacteriana (Burgess *et al.*, 2003). También Satheesh *et al.* (2012) encontraron que dos especies de *Bacillus* mostraron actividad inhibitoria de bacterias y microalgas formadoras de biopelícula. Dado que sólo una pequeña proporción de microorganismos han sido estudiados para la producción de compuestos antiepibióticos, se requiere mucha más investigación con el fin de aislar y cultivar estos microorganismos para aprovechar al máximo su potencial.

Los bacilos Gram positivos fueron los que presentaron mayor actividad antimicrobiana y antiepibiótica frente a los microorganismos estudiados. En el medio terrestre y marino, las bacterias Gram positivas son bien conocidas como productoras de metabolitos secundarios biológicamente activos. Estudios de su genoma han revelado que más del 3% de éste contiene genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos, tales como policétido sintetasas y péptido sintetasa no ribosomal requeridos para la biosíntesis de compuestos activos (Donadio *et al.*, 2007). De ellas, en este estudio, el género *Bacillus* fue el que presentó mayor espectro de actividad frente a las cepas probadas. Este género constituye uno de los grupos de microorganismos de alto potencial biomédico (Fenical & Jensen, 1993; Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008), han sido aislados con regularidad de varios invertebrados y ampliamente estudiados por diversos autores por la producción de metabolitos con propiedades antimicrobianas, antiadherentes, algicidas y de interés en farmacología (Ivanova *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2003; Lugioyo, 2003; Pabel *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). En diversos estudios se ha encontrado que las bacterias que pertenecen a este género son más activas llegando a inhibir el crecimiento del 60% de las bacterias patógenas (Baam *et al.*, 1966; Thakur & Anil, 2000; Anand *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010). Ha sido reportado que *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, y *B. subtilis* aislados de diferentes sustratos producen metabolitos

secundarios con propiedades antagonistas y han sido exitosos como agentes bio-controladores (Wulff *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2012).

En los bioensayos de actividad antiepibiótica se encontraron buenos resultados con los extractos obtenidos de las especies de *Bacillus*, aisladas de *Aplysina gerardogreeni* frente a las cepas marinas del mismo género. Wiese *et al.* (2009) indican que los miembros de este género producen alrededor de 800 metabolitos incluidos agentes antimicrobianos (péptidos de bajo peso molecular), entre ellos los más importantes son las bacteriocinas, que son péptidos sintetizados en el ribosoma, como la subtilina (Jansen & Hirschmann, 1944) y subtilosina (Zheng & Slavik, 1999) comúnmente letales para las bacterias estrechamente relacionadas con las que las producen (de la Fuente-Salcido *et al.*, 2008), como en este caso (*Bacillus* vs. *Bacillus*) y que tienen gran potencial de aplicación en alimentos, agricultura y en la industria farmacéutica para prevenir o controlar el crecimiento de los microorganismos (Riley & Wertz, 2002) ya que se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en Gram positivas (Cleveland *et al.*, 2001).

Bacillus licheniformis fue una de las especies que mostró mayor actividad tanto antimicrobiana como antiepibiótica. Se ha mencionado que debido a que esta especie es muy frecuente, su amplio espectro de actividad podría ayudarle dándole una ventaja competitiva en el medio marino para constituirse como uno de los principales miembros de la comunidad asociada (Sayem *et al.*, 2011). Entre los compuestos antibióticos producidos por esta especie se encuentra la bacitracina, también producida por *B. subtilis* la cual es actualmente utilizada como un tópico para infecciones oculares o de la piel. Asimismo, hallazgos recientes sugieren que polisacáridos producidos por *Bacillus* poseen también la capacidad de regular e inhibir la formación de biopelículas (Valle *et al.*, 2006; Sayem *et al.*, 2011).

Las bacterias identificadas como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Psychrobacter* y *Pseudovibrio* aisladas de *Aplysina gerardogreeni* también mostraron buena

actividad antimicrobiana y antiepibiótica. Estas especies han sido aisladas de otras esponjas y han presentado actividad antimicrobiana, en algunos casos con tasas de inhibición del 50% frente a diferentes cepas (Ivanova *et al.*, 1999; Hentschel *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003; Ortega-Morales *et al.*, 2008; Berrue *et al.*, 2009; Desriac *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Musthafa *et al.*, 2011). Por otro lado, en la actualidad muchos de los estudios orientados a la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad se están enfocando en las Actinobacterias, este grupo es uno de los mayores productores de compuestos activos (Bull & Stach, 2007; Kennedy *et al.*, 2009), en el presente estudio la única especie que logramos aislar fue *Micrococcus luteus*. Esta fue una de las bacterias más difícil de cultivar, debido a su lento crecimiento y requerimientos nutricionales, pese a ello se obtuvo actividad antiepibiótica frente a tres bacterias y una microalga, por lo que resulta de interés darle seguimiento a las bacterias de este grupo, las cuales tienen un buen potencial.

Variación temporal de los extractos con actividad biológica.

La actividad antimicrobiana que presentaron las bacterias (suspensión) tuvo una variación temporal, presentando los mayores halos de inhibición en los meses del otoño e invierno. Estos resultados coinciden con lo obtenido en los extractos crudos de esta esponja de la misma localidad, donde se encontró una mayor actividad en otoño (Montes-Plascencia *et al.*, 2010). Se ha reportado que las esponjas producen los compuestos bioactivos cuando grandes poblaciones de bacterias están asociadas a ellas, lo que indicaría que estos compuestos son sintetizados para su defensa contra depredadores o invasores (Richelle-Maurer *et al.*, 2003). Con los resultados de este trabajo se pudo comprobar que no siempre la abundancia de bacterias está relacionada con una mayor actividad producida por la esponja, ya que en agosto y octubre (otoño) se encontró la menor abundancia de bacterias asociadas, aunque estas pocas presentaron buena actividad. Esto pudiera estar relacionado con las interacciones competitivas entre las bacterias, existiendo un predominio de bacterias capaces de producir compuestos bioactivos que puede

inhibir y hasta causar la muerte a otras bacterias que compiten por la misma fuente de nutrientes (Chelossi *et al.*, 2007).

En los bioensayos de antiepibiosis, al igual que con la actividad antimicrobiana, se presentó una variación bimensual del número de extractos activos. Estos resultados coinciden con lo señalado en otros estudios en los que demuestran que la actividad antiepibiótica varía en el tiempo (Hellio *et al.*, 2004). Bernbom *et al.* (2011) observaron una diferencia significativa en el número de bacterias con actividad antiepibiótica en diferentes meses, con el mayor número en agosto y noviembre. Marèchal *et al.* (2004) mencionan que la actividad antiepibiótica es mayor durante primavera y verano, cuando la presión de la epibiosis es más intensa y los valores de temperatura del agua y la intensidad de la luz son altos. En nuestro caso, junio y agosto fueron los meses con mayor temperatura del agua, los extractos de estos meses presentaron actividad a la menor concentración probada ($0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$), aunque esto no explicaría lo ocurrido con los extractos de febrero que también mostraron muy buena actividad. Lo mismo se encontró con las microalgas, aunque en este caso durante agosto solo un extracto presentó actividad.

Al analizar si las bacterias con actividad antimicrobiana y antiepibiótica se asociaban con temporadas específicas, se pudo comprobar que en ambos casos las bacterias que presentaron una actividad constante a lo largo del tiempo fueron las pertenecientes al género *Bacillus* y *Staphylococcus*. Las bacterias Gram positivas representan una fuente potencial de sustancias antibióticas como se puede constatar en esta y otras investigaciones, que pudieran resultar incluso nuevas con relación a las producidas por las bacterias terrestres, por estar expuestas a otras condiciones ambientales (Fenical & Jensen, 1993). El aislamiento e identificación de bacterias marinas productoras de sustancias activas ha dado gran importancia al fenómeno de antagonismo microbiano en el medio marino. Este hecho pudiera indicar que las bacterias marinas juegan un papel determinante en el carácter autodepurador que se le atribuye al mar, como ya han sugerido y comprobado otros investigadores (Pushkar, 1979; Burgess *et al.*, 2003). Los metabolitos secundarios producidos por

ellas, entre los que se encuentran los antibióticos, tienen una función protectora en el medio ambiente. Las bacterias como mecanismo de defensa producen sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos por lo que juegan un papel ecológico importante en el ecosistema marino. Algunos autores proponen la interacción bacteriana antagónica como posible mecanismo de regulación del crecimiento poblacional y de esta forma del desarrollo de etapas subsecuentes de la macroepibiosis (Mora-Cristancho *et al.*, 2009).

Consideraciones finales

En este trabajo se pudo constatar que las bacterias asociadas a *Aplysina gerardogreeni* que se lograron aislar en el medio soya tripticasa (TSA), son una buena fuente de compuestos activos principalmente como agentes antiepibióticos. Hay una serie de beneficios asociados con el uso de microorganismos como fuente de compuestos. La primera ventaja es el subsanar los problemas relacionados con el suministro ya que las bacterias pueden ser cultivadas fácilmente. Otra ventaja de usar microorganismos como fuente de compuestos bioactivos es que pueden producirlos en corto tiempo y en grandes cantidades en comparación con los invertebrados y algas. Además, las cepas de bacterias de una misma especie pueden producir diferentes compuestos bioactivos bajo diferentes condiciones de cultivo, y por lo tanto aumentar el potencial número de ellos (Armstrong *et al.*, 2000). Por otro lado, las bacterias de origen marino constituyen un recurso potencial de nuevas sustancias bioactivas debido entre otras causas, a que las formas de vida marina se cree han evolucionado por estar expuestas a condiciones ambientales diferentes a sus contrapartes terrestres, por lo que se han descubierto moléculas nuevas o con mayor actividad (Nair & Simidu, 1987; Barbier & Prieur, 1991).

CONCLUSIONES

Al igual que en otras esponjas del género *Aplysina* reportadas en la literatura se encontró un gran número de bacterias asociadas a los ejemplares de *A. gerardogreeni* con un promedio anual de 9.7×10^8 cél g⁻¹ esponja, lo que la ubica entre las esponjas con alta abundancia microbiana. Asimismo se lograron aislar 167 morfotipos diferentes, el 90.5% de los cuales son bacterias Gram positivas, en forma de bacilos.

La identificación de las bacterias mediante ADN reveló la presencia de 83 especies con secuencias diferentes, pertenecientes a tres Phyla, nueve géneros y dos sin clasificar, entre ellas, las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron las mejor representadas, ya que constituyen el 62% del total de las bacterias aisladas.

La mayor cantidad de bacterias se aislaron en febrero, lo cual coincide con el mes en el que la esponja presenta la mayor abundancia de bacterias en su tejido. *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* fueron consistentes a lo largo de los meses, mientras que otras bacterias solo se encontraron en uno de ellos.

Una gran proporción de las bacterias cultivadas (58%) fueron activas frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que frente a *Escherichia coli* el porcentaje fue más bajo (22%) aunque mayor que lo reportado en otros estudios similares.

Los extractos crudos de las bacterias no mostraron tan buena actividad antimicrobiana como en los bioensayos con la suspensión bacteriana, probablemente debido al método de extracción utilizado. Sin embargo, en los bioensayos de actividad antiepibiótica, el 87% de los extractos fueron activos frente a las bacterias colonizadoras y el 69% frente a microalgas epibióticas.

La actividad antimicrobiana y antiepibiótica tuvo una variación temporal, los mayores halos de inhibición frente a las cepas patógenas se obtuvieron con las

bacterias aisladas en otoño e invierno, mientras que las mejores MIC frente a bacterias marinas y microalgas se obtuvieron con los extractos de junio.

Con estos resultados se logró confirmar la hipótesis planteada, ya que tanto la diversidad, la cantidad de bacterias y la actividad presentaron variaciones temporales.

LITERATURA CITADA

- Abarca, C., A. Martínez, M. Caro & R. Quintero. 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. *aisawai*. *Univ.: Ciencia y Tecnología*, 2(3): 51-56.
- Acosta, A. L. & A. D. Rodríguez. 1992. 11-Oxo-aerothionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55: 1007-1012.
- Althoff, K., C. Scütht, R. Steffen, R. Batel & W.E.G Müller. 1998. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.*, 130: 529-536.
- Amsterdam, D. 1996. Suceptibility testing of antimicrobials in liquid media, 52-111. *En: Lorian, V. (Ed.) Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Anand, T. P., A. W. Bhat, Y. S. Shouche, U. Roy, J. Siddharth & S. P. Sarma. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol. Res.*, 161(3): 252-62.
- Armstrong, E., K. G. Boyd & J. G. Burgess. 2000. Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechn. Ann. Rev.*, 6: 221-241.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A. 1512 p.
- Azevedo, L. G, A. L. Muccillo-Baisch, D. M. V. B Figueira, R. T. Boyle, D. F. Ramos, A. D. Soares, C. Lerner, P. A. Silva & G. S. Trindade. 2008. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissaramarine* sponge crude extracts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 147: 36-42.
- Baam, B. R., N. M. Gandhi & Y. M. Freitas. 1966. Antibiotic activity of marine microorganisms. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, 13: 181-185.

- Barbier G. D. & D. Prieur. 1991. Une nouvelle filifare: Les microorganismes marins. *Biofutur.*, 106: 41-46.
- Barrow, G. I. & R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan & Steel's manual for the identification of Medical Bacteria*. 3rd Edición. Cambridge University Press, 331 p.
- Barsby, T., M. T. Kelly, S. Gagné & R. Andersen. 2001. Bogorol A produced in culture by a marine *Bacillus* sp. reveals a novel template for cationic peptide antibiotics. *Org. Lett.*, 3(3): 437-440.
- Barthel, D. 1986. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. I. Substrate specificity, growth and reproduction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 32: 291-298.
- Barthel, D. 1988. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panacea* in Kiel Bight. II. Biomass, production, energy budget and integration in environmental processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43: 87-93.
- Becerro, M. A., X. Turon & M. J. Uriz. 1997. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J. Chem. Ecol.*, 23: 1527-1547.
- Belarbi, E. H., A. C. Gomez, Y. Chisti, F. G. Camacho & E. M. Grima. 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol. Adv.*, 21: 585-598.
- Beleneva, I. A. 2008. Distribution and characteristics of *Bacillus* bacteria associated with hydrobionts and the waters of the Peter the Great Bay Sea of Japan. *Microbiology*, 77(4): 497-503.
- Bernbom N., Y. Y. Ng, S. Kjelleberg, T. Harder & L. Gram. 2011. Marine bacteria from Danish coastal waters show antifouling activity against the marine fouling bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91 and zoospores of the green alga *Ulva australis* independent of bacteriocidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(24): 8557-8567.
- Berrue, F., A. Ibrahim, P. Boland & R. G. Kerr. 2009. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents *Pure Appl. Chem.*, 81(6): 1027-1031.
- Bewley, C. A., N. D. Holland & D. J. Faulkner. 1996. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 52: 716-722.

- Bhalla, T. C., M. Sharma & N. N. Sharma. 2008. Microbial production of flavours and fragrances; fats and oils; dyes; bioplastics (PHAS); polysaccharides; pharmacologically active substances from marine microbes; anticancer agents and microbial transformation, 1-34. *En: Satyanarayana, T. & S. Chand (Eds.) Applied Microbiology*. National Science Digital Library NISCAIR: New Delhi, India.
- Blunt, J. W., B. R.Copp, W. P. Hu., M. H. G.Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 31-86.
- Blunt, J. W., B. R.Copp, W. P. Hu., M. H. G.Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26: 170-244.
- Briand, J. F. 2009. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling*, 25(4): 297-311.
- Brümmer, F. & M. Nickel. 2003. Sustainable use of marine resources: Cultivation of sponges, 143-162. *En: Müller, W.E.G. (Ed.). Sponges (Porifera), Progress in molecular and submolecular Biology - Marine Molecular Biotechnology*. 258 p.
- Bull, A. T. & J. E. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, 15: 491-499.
- Bultel-Ponce, V. C., J. P. Debitus, G. P. Berge & M. Guyot. 1998. Metabolites from the marine sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotech.*, 6: 233-236.
- Burja A. M., R. T. Hill. 2001. Microbial symbionts of the Australian Great Barrier Reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia*, 461: 41-47.
- Burgess, J. G., K. G. Boyd, E. Armstrong, Z. Jiang, L. Yan, M. Berggren, U. May, T. Piscane, A. Granmo & D. R. Admas. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19: 197-205.
- Bustos-Martínez, J., A. Hamdan-Partida & M. Gutiérrez-Cárdenas. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.*, 17: 287-305.
- Caron, D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(2): 491-498.

- Cetina, A., A. Matos, G. Garma, H. Barba, R. Vázquez, A. Z. Rodríguez, D. Jay, V. Monteón & R. López. 2010. Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Rev. Peru. Biol.*, 17(2): 231-236.
- Chelossi, E., M. Milanese, A. Milano, R. Pronzato & G. Riccardi. 2004. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis*. *J. Exp. Mar. Biol. & Ecol.*, 309(1): 21-33.
- Chelossi, E., R. Pantile, R. Pronzato, M. Milanese & U. Hentschel. 2007. Bacteria with antimicrobial properties isolated from the Mediterranean sponges *Chondrilla nucula* and *Petrosia ficiformis*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 49: 157-163.
- Cifuentes, J. L., M. P. Torres & M. Frías. 1999. *El océano y sus recursos, XI. Acuicultura*. Ciencia para todos. Vol. 90. Fondo de Cultura Económica. México. 160 p.
- Clare, A. S. 1998. Towards non-toxic antifouling. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 3-6.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes & M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20.
- Compagnone, R. S., R. Avila, A. Suárez, O. V. Abrams, H. R. Rangel, F. Arvelo, I. C. Piña & E. J. Merentes. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *Nat. Prod.*, 62(10): 1443-1444.
- Cordiés, J. L., L. A. Machado & M. L. Hamilton. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica*, 8(1): 13-27.
- Da Gama, B. A. P., C. R. Pereira, A. R. Soares, V. L. Teixeira & Y. Yoneshigue-Valentin. 2003. Is the mussel test a good Indicator of antifouling activity?. A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling*, 19(1): 161-169.
- Daza, R. M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3): 57-67.
- De la Fuente-Salcido, N., M. G. Alanis-Guzman, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernandez, M. Bautista-Justo & J.E. Barboza-Corona. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch. Microbiol.*, 190: 633-640.

- De Nys, R., P. D. Steinberg, P. Willemsen, S. A. Dworjanyn, C. L. Gabelish & R. J. King. 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, 8: 259-271.
- De Oliveira, M. F., J. H. de Oliveira, F. Galetti, A. O. De Souza, C. Lopes Silva, E. Hajdu, S. Peixinho & R. Berlinck. 2006. Antimycobacterial brominated metabolites from two species of marine sponges. *Nat. Prod. Chem.*, 72(5): 437-441.
- Debitus, C., G. Guella, I. Mancini, J. Waikedre, J. P. Guemas, J. L. Nicolas & F. Pietra. 1998. Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 136-141.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier & Y. Fleury. 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs*, 8(4): 1153-1177.
- Devi, P., S. Wahidullah, C. Rodrigues & L. D. Souza. 2010. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: A source of antimicrobial compounds. *Mar. Drugs*, 8(4): 1203-1212.
- Dobretsov, S. & P. Y Qian. 2004. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299: 35-50.
- Dobretsov, S., H. U. Dahms & P. Y. Qian. 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling*, 22: 43-54.
- Donadio, S., P. Monciardini & M. Sosio. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 1073-1109.
- Donia, M. & Hamann, M. T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis.*, 3: 338-348.
- Duckworth, A. R. & C. N. Battershill. 2003. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, 217: 139-156.
- Dworjanyn, S. A., R. De Nys & P. D. Steinberg. 2006. Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 318: 153-163.

- Egan, S., T. Thomas, C. Holmströ & S. Kjelleberg. 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ. Microbiol.*, 2: 343-347.
- Elyakov, G. B., T. Kuznetsova, V. V. Mikhailov, I. I. Maltsev, V. G. Voinov & S. A. Fedoreyev. 1991. Brominated diphenyl ethers form a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia*, 47: 632-633.
- Encarnación-Dimayuga, R., M. R. Ramirez & J. Luna-Herrera. 2003. Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongiae). *Pharm. Biol.*, 41: 384-387.
- Enticknap, J. J., M. Kelly, O. Peraud & R. T. Hill. 2006. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3724-3732.
- Erpenbeck, D. & R. W. M. van Soest. 2002. Family Halichondriidae, 787-816. *En: Hooper, J. N. A & R. W. M. van Soest (Eds.) System Porifera- A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Faulkner, D. J. 1997. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 14: 259-302.
- Faulkner, D. J., M. K. Harper, C. E. Salomon, E. W. Schmidt. 1999. Localization of bioactive metabolites in marine sponges. *Mem. Qd. Mus.*, 44: 167-173.
- Faulkner, D. J. 2000. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.*, 17: 1-6.
- Faulkner, D. J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 1-48.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.*, 93: 1673-1683.
- Fenical, W. & P. R. Jensen. 1993. Marine microorganisms: a new bio-medical resource, 419-457. *En: Attaway, D. H. & O. R. Zabrosky (Eds.) Marine biotechnology: pharmaceutical and bioactive natural products*. Plenum Press, New York.
- Fieseler, L., M. Horn, M. Wagner & U. Hentschel. 2004. Discovery of the novel candidate Phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3724-3732.

- Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch & U. Hentschel. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.*, 134: 461-470.
- Friedrich, A. B., I. Fischer, P. Proksch, J. Hacker & U. Hentschel. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38: 105-113.
- Fusetani, N. 2004. Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 94-104.
- Galbis-Perez, J. A. 2004. *Panorama actual de la química farmacéutica*. Serie Farmacia. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 2ª. Edición. Universidad de Sevilla. 374 p.
- García-Martos, P., M. T. Fernández del Barrio & F. Paredes-Salido. *Microbiología clínica aplicada*. 1996. Ed. Díaz de Santos, Madrid, España. 509 p.
- Gontang, E. A., W. Fenical & P. R. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-Positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Env. Microb.*, 73(10): 3272-3282.
- Guillard, R. R. L. & J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacear* Cleve. *Can. J. Microb.*, 8: 229-239.
- Guppy, R. & J. C. Bythell. 2006. Environmental effects on bacterial diversity in the surface mucus layer of the reef coral *Montastraea faveolata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 328: 133-142.
- Gustafson, K. R., N. Oku & D. J. Milanowski. 2004. Antiviral Marine Natural Products. *Curr. Med. Chem.*, 3: 233-249.
- Hardoim, C. C., R. Costa, F. Araujo, E. Hadju, R. Peixoto, E. Miranda, U. Lins, A. S. Rosado & J. D. Van Elsas. 2009. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 331-3343.
- Hellio, C., J. P. Marechal, B. Veron, G. Bremer, A. S. Clare & Y. Le Gal. 2004. Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from Brittany Coast (France). *Mar. Biotechnol.*, 6: 67-82.

- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert & J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35(3): 305-312.
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wegner, J. Hacker & B. S. Moore. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4331-4440.
- Hentschel, U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker & M. Horn. 2003. Microbial diversity of sponges, 59-88. *En: W.E.G. Müller (Ed.) Marine Molecular Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hentschel, U., K. Usher & M. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 55(2): 167-177.
- Hernández, A. 2003. *Microbiología industrial*, EUNED. Costa Rica. 296 p.
- Hernández-Guerrero, C. J, E. Zubía, M. J. Ortega & J. L. Carballo. 2007. Cytotoxic dibromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysina gerardogreeni*. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 5275-5282.
- Hill, R. T. 2004. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery, 177-190. *En: Bull A.T. (Ed.) Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington.
- Hill, M., A. Hill, N. Lopez, O. Harriott. 2006. Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Mar. Biol.*, 148: 1221-1230.
- Hoffmann, F., H. T. Rapp & J. Reitner. 2006. Monitoring microbial community composition by fluorescence *in situ* hybridization during cultivation of the marine cold-water sponge *Geodia barretti*. *Mar. Biotechnol.*, 8: 373-379.
- Holben, W. E. & D. Harris. 1995. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.*, 4: 627-631.
- Holmström, C., S. Egan, A. Franks, S. McCloy & S. Kjelleberg. 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 41: 47-58.

- Hooper, J. N. A., J. A. Kennedy & R. J. Quinn. 2002. Biodiversity 'hotspots,' patterns of richness and endemism, and taxonomic affinities of tropical Australian Sponges (Porifera). *Biodiv. Cons.*, 11: 851-885.
- Hutchinson, N., S. Nagarkar, J. Atchison & G. Williams. 2006. Microspatial variation in marine biofilm abundance on intertidal rocks surfaces. *Aquat. Microb. Ecol.*, 42: 187-197.
- Imhoff, J. F. & R. Stöhr. 2003. Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. 35-57. *En: Müller, W.E.G. (Ed.) Sponges (Porifera)*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Ivanova, E. P., M. V. Vysotskii, V. I. Svetashev, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, V. V. Mijhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi & S. Yoshikawa. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internatl. Microbiol.*, 2: 267-271.
- Jansen, E. F. & D. J. Hirschmann. 1944. Subtilin-an antibacterial product of *Bacillus subtilis*: culturing conditions and properties. *Arch. Biochem.*, 4: 297-309.
- Jensen, P. R. & W. Fenical. 1995. The relative abundance and seawater requirements of Gram-positive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microb. Ecol.*, 29(3): 249-257.
- Jensen, P. R., T. J. Mincer, P. G. Williams & W. Fenical. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Anton. Leeuw.*, 87: 43-48.
- Jeong, S. Y., K. Ishida, Y. Ito, S. Okada & M. Murakami. 2003. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* *Tetrahedron Lett.*, 44(43): 8005-8007.
- Jiang, S., W. Sun, M. Chen, S. Dai, L. Zhang, Y. Liu, K. J Lee & X. Li. 2007. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Anton. Leeuw.*, 92: 405-416.
- Jiménez, J.C., M. Marfil, A. Francesch, C. Cuevas, M. Alvarez & F. Albericio. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia*, 75-83.
- Kanagasabhapahty, M., H. Sasaki, K. Nakajima, K. Nagata & S. Nagata. 2005. Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microb. Environ.*, 20, 178-185.

- Karpushova, A., F. Brummer, S. Barth, S. Langes & R. D. Schmid. 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 4132-4135.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porífera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 189-200.
- Kennedy, J., P. Baker, C. Piper, P. D. Cotter, M. Walsh, M. J. Mooij, M. B. Bourke, M. C. Rea, P. M. O'Connor, R. P. Ross, C. Hill, F. O'Gara, J. R. Marchesi & A. D. Dobson. 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Mar. Biotechnol.*, 11: 384-396.
- Ki, J. S, W. Zhang, P. Y. Qian. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *J Microbiol Methods*, 77: 48-57
- Kirchman, D., J. Sigda, R. Kapuscinski & R. Mitchell. 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Appl. Env. Microb.*, 44(2): 376-382.
- Klöppel, A., M. Pfannkuchen, A. Putz, P. Proksch & F. Brümmer. 2008. *Ex situ* cultivation of *Aplysina aerophoba* close to in situ conditions: ecological, biochemical and histological aspects. *Mar. Ecol.*, 29: 1-14.
- Kobayashi, J. & M. Ishibashi. 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.*, 93: 1753-1769.
- Kobayashi, N. & H. Okamura. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 748-751.
- Kon-Ya, K., N. Shimidzu, N. Otaki, A. Yokoyama, K. Adachi & W. Miki. 1995. Inhibitory effect of bacterial ubiquinones on the settling of barnacle, *Balanus amphitrite*. *Experientia*, 51: 153-155.
- Koopmans, M., D. Martens & R. H. Wijffels. 2009. Towards commercial production of sponge medicines. *Mar. Drugs*, 7(4): 787-802.
- Kreuter, M. H., R. E. Leake, F. Rinaldi, W. Mullerklieser, A. Maidhof, W. E. G. Muller & H. C. Schroder. 1990. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase-activity of

- Egf-receptor kinase complex from human breast-cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeropylsinin-1. *Compar. Biochem. Physiol. B. Biochem.*, 97(1): 151-158.
- Lee, O. O., Lau, S. C. K. & P. Qian. 2001. Consistent bacterial community structure associated with the surface of the sponge *Mycale adhaerens* Bowerbank. *Microb. Ecol.*, 52: 693-707.
- Levi, C., & P. Levi. 1965. Populations bacteriennes dans les eponges. *J. Microsc.*, 4:60
- Li, Z. 2009. Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. *Mar. Drugs*, 7: 113-129.
- Li, Z. Y., L. M. He, J. Wu & Q. Jiang. 2006. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 329: 75-85.
- Ling, J., J. D. Dong, Y. S. Wang, Y. Y. Zhang, C. Deng, L. Lin, M. L. Wu & F. L. Sun. 2012. Spatial variation of bacterial community structure of Northern South China Sea in relation to water chemistry. *Ecotoxicology*, 21(6): 1669-1679.
- Lugioyo, G. 2003. *Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente. Instituto de Oceanología, La Habana, Cuba. 127 p.
- Lugioyo, G., D. Cabrera, M. Miravet, R. Núñez, Y. Delgado, H. Cabrera & J. Martí. 2003. Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la Zona Exclusiva Económica al sur de Cuba. *Serie Oceanológica*, 1: 59-67.
- MacFaddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Médica Panamericana. 3ª Edición. Madrid, España. 851 p.
- Madigan, M. J. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid. España. 1011 p.
- Madigan, M., J. Martinko & J. Parker. 2005. *Brock, Biology of microorganisms*. Prentice Hall, New York. 1088 p.

- Manz, W., G. Arp, G. Schumann-Kindel, U. Szewzyk & J. Reitner. 2000. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Meth.*, 40(2): 125-134.
- Marèchal, J. P., G. Culioli, C. Hellio, H. Thomas-Guyon, M. E. Callow, A. S. Clare & A. Ortalo-Magne. 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 313: 47-62.
- Margot, H., C. Acebal & E. Torill. 2002. Consistent association of *Crenarchaeal archaea* with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.*, 140: 739-745.
- Maximilien, R., R. De Nys, C. Holmström, L. Gram, M. Givskov, K. Crass, S. Kjelleberg & P. D. Steinberg. 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 15: 233-246.
- Mayer, A. M. S. & K. R. Gustafson. 2006. Marine pharmacology in 2003–2004: anti-tumour and cytotoxic compounds. *Eur. J. Cancer*, 42: 2241-2270.
- Miranda-Navales, M. G. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 68(4): 262-270.
- Mohamed, N. M., J. J. Enticknap, J. E. Lohr, S. M. McIntosh & R. T. Hill. 2008a. Changes in bacterial communities of the marine sponge *Mycale laxissima* on transfer into aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1209-1222.
- Mohamed, N. M., V. Rao, M. T. Hamann, M. Kelly & R. T. Hill. 2008b. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4133-4143.
- Montalvo, N. F. & R. T. Hill. 2011. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(20): 77207-7216.
- Montes-Plasencia, C. I., C. J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta & R. N. Aguila-Ramírez. 2010. Seasonal variation of antibacterial activity of *Aplysina gerardogreeni* from the Gulf of California. *CICIMAR-Océanides*, 25(1): 79-81.

- Mora-Cristancho, J., S. Zea, & D. L. Gil-Agudelo. 2009. Actividad antagónica entre bacterias epibióticas aisladas de esponjas marinas del caribe colombiano y su relación con la macroepibiosis. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 38(1): 25-38.
- Moriarty, D. J. W. & A. C. Hayward. 1982. Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram-negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecol.*, 8: 1-14.
- Müller, W. E. G. 2003. *Sponges (Porifera)*. Series: Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 37. Springer, Berlin, Alemania, 258 p.
- Muscholl-Silberhorn, A., V. Thiel & J. Imhoff. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.*, 55: 94-106.
- Musthafa, K. S., V. Saroja, S. K. Pandian & A. V. Ravi. 2011. Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *J. Biosci.*, 36(1): 55-67.
- Nadyne, A. L. 2006. Identification, phylogenetic characterization, and preliminary bioactivity screening of bacteria isolated from *Suberites zeteki*, a Hawaiian sponge, *J. Young Inv.*, 15:(7) <http://www.jyi.org/research/re.php?id=869>.
- Nair, S. & U. Simidu. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (12): 2957-2962.
- Nair, A. V., K. K. Vijayan, K. Chakraborty & M. A. Leo. 2012. Diversity and characterization of antagonistic bacteria from tropical estuarine habitats of Cochin, India for fish health management. *World J. Microb. Biotech.*, 28(7): 2581-2592.
- Nava Sánchez, E. H., 1992. *Sedimentología de la Cuenca San Juan de los Planes, Baja California Sur, México*. Tesis de Maestría en Ciencias, CICIMAR-IPN, 178 p.
- NCCLS (National committee for clinical laboratory standards). 1993. Performance standards of antimicrobial susceptibility test, 6th edition, approved standard, M2-A5 villanora, EUA.

- Newman, D. J. & G. M. Cragg. 2004a. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.*, 67: 1216-1238.
- Newman, D. J. & G. M. Cragg. 2004b. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr. Med. Chem.*, 11: 1689-1709.
- Nylund, G. M., P. E. Gribben, R. de Nys, P. D. Steinberg & H. Pavia. 2007. Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 329: 73-84.
- Oclarit, J. M., H. Okada, S. Ohta, K. Kaminura, Y. Yamaoka, T. Iizuka, S. Miyashiro & S. Ikegami. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios*, 78: 7-16.
- Olson, J. B. & C. A. Kellogg. 2010. Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73(1): 17-30.
- Olson, J. B., D. K. Harmody & P. J. McCarthy. 2002. Alpha-proteobacteria cultivated from marine sponges display branching rod morphology. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211: 169-173.
- Ortega-Morales, B. O., M. J. Chan-Bacab, E. Miranda-Tello, M. L. Fardeau, J. C. Carrero & T. Stein. 2008. *J. Ind. Microbiol. & Biotech.*, 35(1): 9-15.
- Osgood, M. P. & C. W. Boylen. 1990. Seasonal variations in bacterial communities in Adirondack streams exhibiting pH gradients. *Microbial Ecol.*, 20: 211-230.
- Osinga, R., E. Armstrong, J. G. Burgess, F. Hofmann, J. Reitner & G. Schumann-Kindel. 2001. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 461: 55-62.
- Pabel, C. T., J. Vater, C. Wilde, P. Franke, J. Hofemeister, B. Adler, G. Bringmann, J. Hacker & U. Hentschel. 2003. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Mol. Biotechnol.*, 5(5): 424-34.
- Pawlik, J. R., G. McFall & S. Zea. 2002. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? *J. Chem. Ecol.*, 28: 1103-1115.

- Peraud, O. 2006. Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Tesis doctoral. Universidad de Maryland, E.U.A. 231 p.
- Perovic, S., A. Wichels, C. Schuett, G. Gerdt, S. Pahler, R. Steven & W. E. G. Müller. 1998. Neuromodulatory compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halicondria panicea* of the glutamate channel. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 6: 125-133.
- Pile, A. J., M. R. Patterson & J. D. Witman. 1996. *In situ* grazing on plankton <10µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar. Ecol. Prog. Series*, 141: 95-102.
- Porter, J. W. & N. M. Targett. 1988. Allelochemical interactions between sponges and corals. *Biol. Bull.*, 175: 230-239.
- Pushkar, N. K. 1979. Potential biomedical de la mer. *Impact.*, 29(2): 127-140.
- Qian, P. Y., S. Dobretsov, H. U. Dahms & J. Pawlik. 2006. Antifouling activity and microbial diversity of two congeneric sponges *Callyspongia* spp. from Hong Kong and the Bahamas. *Mar. Ecol. Prog. Series*, 324: 151-165.
- Qian, P. Y., S. C. Lau, H. U. Dahms, S. Dobretsov & T. Harder. 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol.*, 9: 399-410.
- Radax, R., F. Hoffmann, H. T. Rapp, S. Leininger & C. Schleper. 2012. Ammonia-oxidizing archaea as main drivers of nitrification in cold-water sponges. *Env. Microbiol.*, 14(4): 909-923.
- Ramm, W., W. Schatton, I. Wagner-Dobler, V. Wray, M. Nimtz, H. Tokuda, F. Enjyo, H. Nishino, W. Beil, R. Heckmann, V. Lurtz & S. Lang. 2004. Diglycosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 497-504.
- Ribes, M., R. Coma & J. M. Gili. 1999. Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. Inter-research *Mar. Eco. Prog. Series.*, 176: 179-190.

- Richelle-Maurer, E., R. Gomez, J. C. Braekman, G. van de Vyver, R. W. van Soest, C. Devijver. 2003. Primary cultures from the marine sponge *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida). *J. Biotechnol.*, 100: 169-76.
- Riley, M. A. & J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137.
- Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita & M. Candia. 1997. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 154: 17-26.
- Rittschof, D. 2001. Natural product antifoulants and coatings development. 543-566. *En: McClintock, J. B. & B. J. Baker (Eds.) Marine chemical ecology. CRC Marine Science Series.*
- Rodríguez, A. & I. Piña. 1993. The structures of Aplysinamisines I, II and III: new bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.*, 56(6): 907-914.
- Rodríguez-Nieto, S., M. Gonzalez-Iriarte, R. Carmona, R. Munoz-Chapuli, M. A. Medina, A. R. Quesada. 2002. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J.*, 16: 261-263.
- Rosenfeld, D. W. & C. E. Zobell. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *J. Bacteriol.*, 54: 393-398.
- Sakai, R., T. Higa, C. W. Jefford & G. Bernardinelli. 1986. Manzamine A; an antitumor alkaloid from a sponge. *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 6404-6405.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 2344 p.
- Santavy, D. L. & R. R. Colwell. 1990. Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 67: 73-82
- Santos, O. C., P. V. Pontes, J. F. Santos, G. Muricy & M. Giambiagi-deMarval. 2010. Isolation, characterization and phylogeny of sponge associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Res. Microbiol.*, 161: 604-612.

- Satheesh, S., A. R. Soniamby, C. V. Sunjaiy Shankar & S. M. Punitha. 2012. Antifouling activities of marine bacteria associated with sponge (*Sigmatocia* sp.). *J. Ocean. Univ. China*, 11(3): 354-360.
- Sayem, S. M., E. Manzo, L. Ciavatta, A. Tramice, A. Cordone, A. Zanfardino, M. De Felice & M. Varcamonti. 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb. Cell Fact.*, 10(74): 1-12.
- Scheuermayer, M., T. Gulder, G. Bringmann & U. Hentschel. 2006. *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the Phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 2119-2124.
- Schmidt, E. W., A. Y. Obraztsova, S. K. Davidson, D. J. Faulkner & M. G. Haygood. 2000. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, "Candidatus *Entotheonella palauensis*". *Mar. Biol.*, 136: 969-977.
- Selvin, J. R. Gandhimathi, G. Seghal Kiran, S. Shanmugha Priya, T.R. Ravji & T.A. Hema. 2009. Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: Isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgol. Mar. Res.*, 63: 239-247.
- Sherr, E. B., D. A. Caron & B. F. Sherr. 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. 213-228. *En: P. Kemp, B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (Eds.) Current Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publ., N. Y.
- Shigemori, H., M. A. Bae, K. Yazawa, T. Sasaki & J. Kobayashi. 1992. Alteramide: a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.*, 57: 4317-4320.
- Simmons, T. L., E. Andrianasolo, K. McPhail, P. Flatt & W. H. Gerwick. 2005. Marine Natural Products as Anticancer Drugs. *Molec. Cancer Therapeutics*, 4: 333-342.
- Stierle, A. C., J. H. Cardellina, F. L. Singleton. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44(11-12): 1021.
- Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *P. Nat. Ac. Sci.*, 101: 11030-11035.

- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731-2739.
- Taylor, M. W., P. J. Schupp, R. de Nys, S. Kjelleberg & P. D. Steinberg. 2005. Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.*, 7: 419-433.
- Taylor, M. W., R. Radax, D. Steger & M. Wagner. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 295-347.
- Tebbe, C. C., A. Schmalenberger, S. Peters & F. Schwieger. 2001. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis, 161-175. *En: Rochelle, P. A. (Ed.). Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Teeyapant, R. & P. Proksch. 1993. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*-evidence for an induced chemical defense?. *Naturwissenschaften*, 80: 369-370.
- Thakur, N. L. & A. C. Anil. 2000. Antibacterial activity of the sponge, *Ircinia ramose*: importance of its surface-associated bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 26: 57-71.
- Thiel, V. & J. F. Imhoff. 2003. Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomol. Eng.*, 20: 421-423.
- Thoms, C., M. Horn, M. Wagner, U. Hentschel & P. Proksch. 2003. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.*, 142: 685-692.
- Thoms, C. & P. Schupp. 2005. Biotechnological potential of marine sponges and their associated bacteria as producers of new pharmaceuticals (Part I). *J. Intern. Biotech. Law.*, 2(5): 217-220.
- Tibayrenc, M. 2007. *Encyclopedia of infectious diseases: modern methodologies*. John Wiley & Sons. 747 p.

- Turon, X., M. A. Becerro & M. J. Uriz. 2000. Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Research*, 301: 311-322.
- Unson, M. D. & D. J. Faulkner. 1993. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea*. *Experientia*, 49: 349-353.
- Unson, M. D., N. D. Holland & D. J. Faulkner. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.*, 119: 1-11.
- Uriz, M. J., X. Turon, M. A. Becerro & J. Galera. 1996. Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 205: 187-204.
- Usama, R. A. 2010. *Antimicrobial activities from plant cell cultures and marine sponge-associated actinomycetes*. Tesis de Doctorado. Universidad Julius-Maximilian Würzburg, Alemania. 172 p.
- Usher, K. M., S. Toze, J. Fromont, J. Kuo & D. C. Sutton. 2004. A new species of cyanobacterial symbiont from the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Symbiosis* 36: 183-192.
- Valencia-Agami S. S. 2010. *Actividad antimicrobiana de extracto y fracciones semipurificadas de la esponja Aplysina gerardogreeni*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur. 44 p
- Valle, J., S. D. Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour- Lambert & J. M. Ghigo. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *PNAS*, 103: 12558-12563.
- Vogel, S. 1977. Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 2069-2071.
- Wakita, J., H. Shimada, H. Itoh, T. Matsuyama & M. Matsushita 2001. Periodic colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *J. Phy. Soc. Japan*, 70: 911-919.
- Wang, G., S. Yoon & E. Lefait. 2008. Microbial communities associated with the invasive Hawaiian sponge *Mycale armata*. *ISME J.*, 8: 1-4.

- Webster, N. S. & D. Bourne. 2007. Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59: 81-94.
- Webster, N. S. & R. T. Hill. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an alpha-Proteobacterium. *Marine Biol.*, 138: 843-851.
- Webster, N. S., K. J. Wilson, L. L. Blackall & R. T. Hill. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 434-444.
- Webster, N. S., R. E. Cobb & A. P. Negri. 2008a. Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J.*, 2: 830-842.
- Webster, N. S., J. R. Xavier, M. Freckelton, C. A. Motti & R. Cobb. 2008b. Shifts in microbial and chemical patterns within the marine sponge *Aplysina aerophoba* during a disease outbreak. *Environ. Microbiol.*, 10: 3366-3376.
- Webster, N. S., M. W. Taylor, F. Behnam, S. Lücker, T. Rattei & S. Whalan. 2010. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environ Microb.*, 12: 2070-2082.
- Wehrl, M., M. Steinert & U. Hentschel. 2007. Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb. Ecol.*, 53(2): 355-365.
- Weiss, B., R. Ebel, M. Elbraechter, M. Kirchner & P. Proksch. 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 24: 1-12.
- Weisz, J. B., U. Hentschel, N. Lindquist, and C. S. Martens. 2007. Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Mar. Biol.*, 152: 475-483.
- Wichels, A., S. Wurtz, H. Dopke, C. Schutt & G. Gerdts. 2006. Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56: 102-118.
- Wiese, J., V. Thiel, K. Nagel, T. Staufenberger & J.F. Imhoff. 2009. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.*, 11: 287-300.

- Wilkinson, C. R. 1978. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.*, 49: 161-167.
- Wilkinson, C. R. 1980. Cyanobacteria symbiotic in marine sponges, 553-563. *En: Schenk, H. & W. Schwemmler (Eds.) Endocytobiology: Endosymbiosis and Cell Biology: a synthesis of recent research.* Proceedings of the International Colloquium on Endosymbiosis and Cell Research. Walter de Gruyter.
- Wilkinson, C. R., M. Nowak, B. Austin & R. Colwell. 1981. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier reef sponges. *Microb. Ecol.*, 7: 13-21.
- Willenz, Ph. & W. D. Hartman. 1989. Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges. I. *Ceratoporella nicholsonia* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae: Porifera). *Mar. Biol.*, 103: 387-401.
- Williams, P. G. 2009. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.*, 27: 45-52.
- Wood, E. J. F. 1953. Heterotrophic bacteria in marine environments of eastern Australia. *Aust. J. Mar. Fresh. Res.*, 4: 160-200.
- Wood, E.J.F. 1967. *Microbiology of oceans and estuaries.* Elsevier Publishing Co. 333 p.
- Wulff, E. G., C. M. Mguni, K. Mansfeld-Giese, J. Fels, M. Lubeck & J. Hockenhull. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Zanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.*, 51: 574-584.
- Yahel, G., J. H. Sharp, D. Marie, C. Hase & A. Genin. 2003. *In situ* feeding and element removal in the symbiont-bearing sponge *Theonella swinhoei*: bulk DOC is the major source for carbon. *Limnol. Oceanogr.* 48(1): 141-149.
- Yeber, D., S. Kiil & K. Dam-Johansen. 2004. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.*, 50: 75-104.
- Zhang, H. L., H. M. Hua, Y. H. Pei & X. S. Yao. 2004. Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 1029-1030.

- Zheng, G. & M. F. Slavik. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28(5): 363-367.
- Zheng, L., X. T. Han, H. M. Chen, W. Lin & X. J. Yan. 2005. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. *Ann. Microbiol.*, 55: 119-124.
- Zobell, C. E. 1946. *Marine microbiology. A monograph on hydrobacteriology.* Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 240 p.

ANEXO I. Características morfológicas de las cepas aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

Etiqueta	Mes	Prof.	Forma	Margen	Elevación	Color	Morfología	Gram
Ap041	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	BLANCO OPACO	COCOS	POSITIVO
Ap04101	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04102	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04104	4	1	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO OPACO	COCOS	NEGATIVO
Ap04110	4	1	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	COCOS	NEGATIVO
Ap04117	4	1	CIRCULAR	ONDULADO	CONVEXO	BLANCO HIALINO	COCOS	POSITIVO
Ap04120	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04172	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	NEGATIVO
Ap04174	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04175	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	COCOS	NEGATIVO
Ap0444	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0467	4	1	CIRCULAR	LOBULADO	PULVINADO	CENTRO OBSCURO	BACILOS	POSITIVO
Ap0475	4	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0480	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0490	4	1	CIRCULAR	LOBULADO	PULVINADO	CENTRO OBSCURO	BACILOS	POSITIVO
Ap0496	4	1	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	HIALINO	COCOS	POSITIVO
Ap0498	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	AMARILLO	COCOS	POSITIVO
Ap0499	4	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04103	4	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap04107	4	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap04170	4	2	IRREGULAR	ONDULADO	PULVINADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04173	4	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0456	4	2	IRREGULAR	LOBULADO	ELEVADO	ROSA	COCOS	NEGATIVO
Ap0461	4	2	CIRCULAR	LOBULADO	ELEVADO	CENTRO OBSCURO	BACILOS	POSITIVO
Ap0463	4	2	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0473	4	2	CIRCULAR	LOBULADO	PULVINADO	CENTRO OBSCURO	BACILOS	POSITIVO
Ap0477	4	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0405	4	3	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0406	4	3	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0408	4	3	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap04100	4	3	CIRCULAR	LOBULADO	PULVINADO	CENTRO OBSCURO	BACILOS	POSITIVO
Ap04114	4	3	IRREGULAR	LOBULADO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	NEGATIVO
Ap04121	4	3	IRREGULAR	ONDULADO	PULVINADO	BLANCO HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap04129	4	3	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	AMARILLO CLARO	COCOS	NEGATIVO
Ap04168	4	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0471	4	3	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	AMARILLO CLARO	COCOS	POSITIVO
Ap0488	4	3	CIRCULAR	LOBULADO	ELEVADO	BLANCO OPACO	BACILOS	POSITIVO

Etiqueta	Mes	Prof.	Forma	Margen	Elevación	Color	Morfología	Gram
Ap0491	4	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO OPACO	COCOS	POSITIVO
Ap0492	4	3	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	AMARILLO	COCOS	NEGATIVO
Ap06116	6	1	CIRCULAR	ONDULADO	PLANO	BLANCO	COCOS	POSITIVO
Ap06141	6	1	CIRCULAR	ONDULADO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06145	6	1	CIRCULAR	ONDULADO	PULVINADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap06165	6	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0618	6	1	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	NEGATIVO
Ap0620	6	1	CIRCULAR	ONDULADO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0624	6	1	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	NARANJA	COCOS	NEGATIVO
Ap0641	6	1	CIRCULAR	ONDULADO	PULVINADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0676	6	1	IRREGULAR	FILAMENTOSO	PLANO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap0684	6	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0693	6	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0603	6	2	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap06109	6	2	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06113	6	2	SEDIMENTOS	LOBULADO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap06130	6	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06131	6	2	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap06155	6	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	HIALINO	COCOS	NEGATIVO
Ap0630	6	2	IRREGULAR	ONDULADO	PULVINADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0635	6	2	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0652	6	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0665	6	2	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0674	6	2	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0678	6	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	AMARILLO	BACILOS	POSITIVO
Ap0685	6	2	IRREGULAR	LOBULADO	ELEVADO	NARANJA	COCOS	NEGATIVO
Ap0689	6	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0694	6	2	IRREGULAR	ONDULADO	PLANO	BLANCO OPACO	BACILOS	POSITIVO
Ap0695	6	2	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06106	6	3	IRREGULAR	LOBULADO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06111	6	3	SEDIMENTOS	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06115	6	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap06137	6	3	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0637	6	3	CIRCULAR	ENTERO	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0686	6	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0697	6	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap08119	8	1	CIRCULAR	IRREGULAR	UMBONADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap08147	8	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap08161	8	1	CIRCULAR	ONDULADO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0853	8	1	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0869	8	1	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	NARANJA	COCOS	NEGATIVO
Ap08127	8	2	CIRCULAR	ENTERO	UMBONADO	BLANCO OPACO	BACILOS	POSITIVO

Etiqueta	Mes	Prof.	Forma	Margen	Elevación	Color	Morfología	Gram
Ap08133	8	2	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap08160	8	2	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0859	8	2	CIRCULAR	LOBULADO	PLANO	BLANCO	COCOS	POSITIVO
Ap0860	8	2	CIRCULAR	ENTERO	UMBONADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0870	8	2	CIRCULAR	LOBULADO	UMBONADO	BLANCO OPACO	COCOS	POSITIVO
Ap0879	8	2	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	AMARILLO CLARO	COCOS	POSITIVO
Ap0881	8	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO	COCOS	POSITIVO
Ap08122	8	3	CIRCULAR	ENTERO	UMBONADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0846	8	3	IRREGULAR	IRREGULAR	UMBONADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0857	8	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0858	8	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0887	8	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap10149	10	1	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1051	10	1	IRREGULAR	ONDULADO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1054	10	1	SEDIMENTOS	IRREGULAR	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap10123	10	2	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	CAFÉ	COCOS	POSITIVO
Ap10164	10	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap1048	10	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1049	10	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	COCOS	POSITIVO
Ap1066	10	2	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	AMARILLO	BACILOS	NEGATIVO
Ap1068	10	2	IRREGULAR	ONDULADO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap10138	10	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap1050	10	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1055	10	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1072	10	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap12126	12	1	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap12146	12	1	CIRCULAR	ENTERO	PULVINADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap12151	12	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap12163	12	1	CIRCULAR	ONDULADO	ELEVADO	AMARILLO CLARO	BACILOS	POSITIVO
Ap1217	12	1	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	AMARILLO	COCOS	POSITIVO
Ap1221	12	1	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1226	12	1	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1228	12	1	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1243	12	1	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1247	12	1	CIRCULAR	ENTERO	UMBONADO	HIALINO	COCOS	POSITIVO
Ap1210	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap12162	12	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap12167	12	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap1219	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1223	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap1227	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap1232	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO

Etiqueta	Mes	Prof.	Forma	Margen	Elevación	Color	Morfología	Gram
Ap1234	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap1242	12	2	CIRCULAR	IRREGULAR	ELEVADO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap1245	12	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap1214	12	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap12152	12	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap1225	12	3	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BORDE HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap1236	12	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap1239	12	3	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0201	2	1	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0211	2	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0212	2	1	IRREGULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	NEGATIVO
Ap02124	2	1	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02128	2	1	IRREGULAR	LOBULADO	UMBONADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0213	2	1	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0215	2	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02151	2	1	IRREGULAR	LOBULADO	UMBONADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0216	2	1	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	BEIGE	BACILOS	POSITIVO
Ap02164	2	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap02171	2	1	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap022	2	1	IRREGULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	NEGATIVO
Ap0231	2	1	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0240	2	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap027	2	1	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0209	2	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	NEGATIVO
Ap02125	2	2	IRREGULAR	IRREGULAR	VISCOSO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap02135	2	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02143	2	2	IRREGULAR	LOBULADO	PLANO	BLANCO	COCOS	POSITIVO
Ap02148	2	2	IRREGULAR	LOBULADO	UMBONADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02150	2	2	IRREGULAR	IRREGULAR	CONVEXO	BLANCO	COCOS	NEGATIVO
Ap02153	2	2	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap02162	2	2	IRREGULAR	LOBULADO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0238	2	2	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	COCOS	POSITIVO
Ap0264	2	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0282	2	2	CIRCULAR	ENTERO	ELEVADO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0202	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0203	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0204	2	3	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0205	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0206	2	3	CIRCULAR	LOBULADO	CONVEXO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0207	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap0208	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	CAFÉ	BACILOS	POSITIVO
Ap02139	2	3	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO

Etiqueta	Mes	Prof.	Forma	Margen	Elevación	Color	Morfología	Gram
Ap02156	2	3	CIRCULAR	ENTERO	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02158	2	3	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02159	2	3	IRREGULAR	LOBULADO	ELEVADO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap02172	2	3	CIRCULAR	ENTERO	CONVEXO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO
Ap0222	2	3	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	HIALINO	BACILOS	POSITIVO
Ap0233	2	3	IRREGULAR	IRREGULAR	PLANO	BLANCO	BACILOS	POSITIVO

ANEXO II. Comparación de grupos taxonómicos de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* con secuencias reportadas en el NCBI.

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap041	<i>Staphylococcus arlettae</i> An 116	FJ386956.1	100
Ap045	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap046	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap048	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	85
Ap0444	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	100
Ap0456	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	99
Ap0461	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	99
Ap0463	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	99
Ap0467	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	100
Ap0471	<i>Micrococcus luteus</i> KS2	JQ581526.1	100
Ap0473	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap0475	<i>Bacillus</i> sp. HPB-25	AY433825.1	71
Ap0477	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	90
Ap0480	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap0488	<i>Bacillus</i> sp. SMAKK003	JN007072.1	92
Ap0490	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	97
Ap0491	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JX215561.1	98
Ap0492	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	98
Ap0496	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JX215561.1	99
Ap0498	<i>Micrococcus luteus</i> ADR52	FN667800.1	97
Ap0499	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	97
Ap04100	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap04101	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap04102	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	99
Ap04103	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	98
Ap04104	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	97
Ap04107	<i>Bacillus licheniformis</i> CMST-SSS	HM101154.1	98
Ap04110	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	92
Ap04114	<i>Pseudovibrio</i> sp. JM38	DQ097255	99
Ap04117	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JQ342697.1	99
Ap04120	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	JX215561.1	98
Ap04121	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX120507.1	96
Ap04129	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	97
Ap04168	<i>Pseudovibrio</i> sp. Mexdtt2	JX436425.1	99
Ap04170	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11011	JX164088.1	97
Ao04172	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap04173	<i>Pseudovibrio</i> sp. Mexdtt2	JX436425.1	98

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap04174	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	97
Ap04175	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	95
Ap063	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	99
Ap0618	<i>Pseudovibrio</i> sp. Mexdtt2	JX436425.1	99
Ap0620	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap0624	<i>Paracoccus</i> sp. F11014	JQ691539.1	99
Ap0630	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	96
Ap0635	<i>Bacillus subtilis</i> F198_B09	DQ234853.1	100
Ap0637	<i>Uncultured marine bacterium</i> T3690	A4950194.1	99
Ap0641	<i>Bacillus cibi</i> 102	FJ607434.1	99
Ap0652	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	97
Ap0665	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	92
Ap0674	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	100
Ap0676	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap0678	<i>Bacillus licheniformis</i> APS2	HQ634792.1	95
Ap0684	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap0685	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	99
Ap0686	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap0689	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	98
Ap0693	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	95
Ap0694	<i>Bacillus megaterium</i> AUBM29	JN990602.1	99
Ap0695	<i>Bacillus</i> sp. TCPS1	JN710379	89
Ap0697	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap06106	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	96
Ap06109	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	92
Ap06111	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	98
Ap06113	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> F71059	HQ908691.1	99
Ap06115	<i>Bacillus nealsonii</i> CB-KC-1	JN400828.1	99
Ap06116	<i>Staphylococcus</i> sp. CBMAI 1081	JN615429.1	99
Ap06130	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	98
Ap06131	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	98
Ap06137	<i>Bacillus sonorensis</i> CSMCRI 1044	JQ665284.1	99
Ap06141	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> CBMAI1103	JN615429.1	97
Ap06145	<i>Bacillus cibi</i> 102	FJ607434.1	99
Ap06155	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	96
Ap06165	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	98
Ap0846	<i>Terribacillus goriensis</i> CL-CR16	NR_043895.1	100
Ap0853	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	98
Ap0857	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap0858	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	96
Ap0859	<i>Staphylococcus</i> sp. J2015s	JF820801.1	99

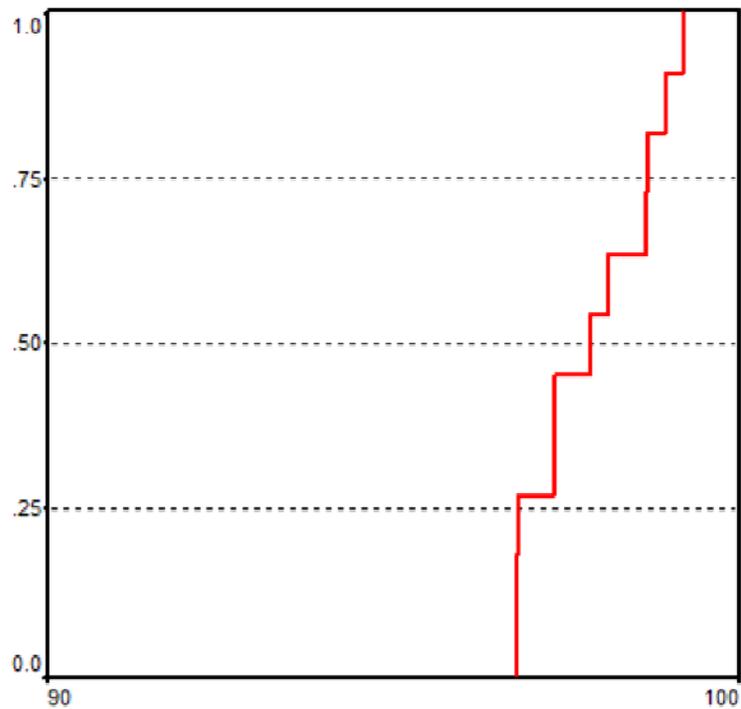
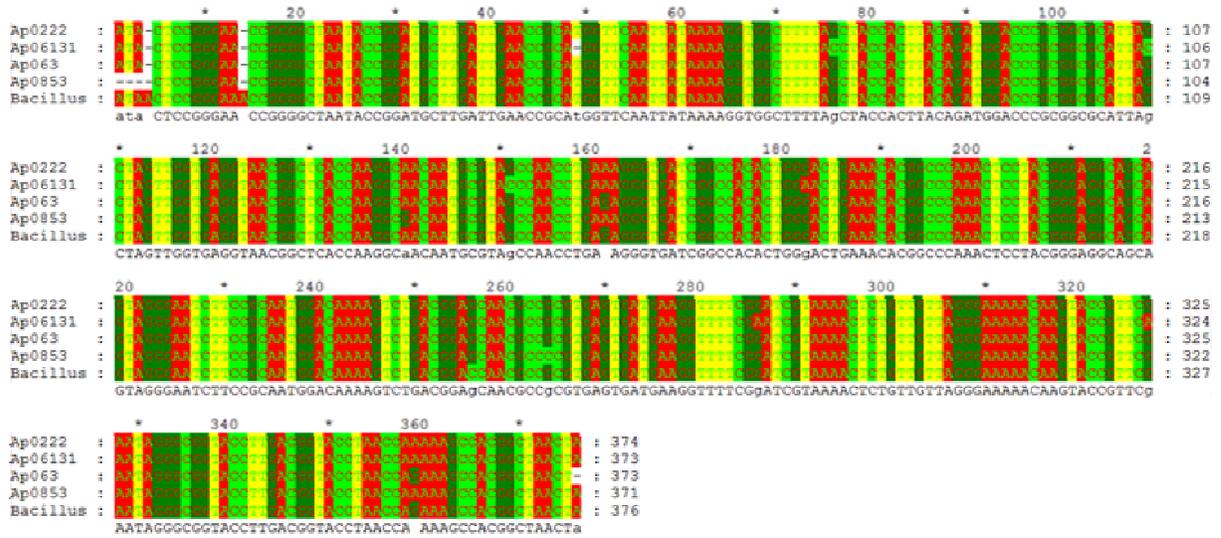
ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap0860	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	100
Ap0869	<i>Psychrobacter maritimus</i> ZT7	HQ538762.1	100
Ap0870	<i>Staphylococcus arlettae</i> ARB7	JX215561.1	95
Ap0879	<i>Micrococcus luteus</i> DSM20030	NR_037113.1	99
Ap0881	<i>Staphylococcus</i> sp. clone 68	AB695118.1	100
Ap0887	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	100
Ap08119	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.2	97
Ap08122	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.3	99
Ap08127	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.4	98
Ap08133	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.5	100
Ap08147	<i>Bacillus pumilus</i> PD3	JQ809230.1	92
Ap08160	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.7	99
Ap08161	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.8	100
Ap1048	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1049	<i>Staphylococcus</i> sp. EB338	FJ785516.1	100
Ap1050	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1051	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1054	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	97
Ap1055	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1066	<i>Halomonas</i> sp. H1(2012)	JQ044787.1	97
Ap1068	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1072	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap10123	<i>Staphylococcus</i> sp. CBMAI 1081	JN615429.1	99
Ap10138	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	97
Ap10149	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap10164	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1210	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
AP1214	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	99
Ap1217	<i>Staphylococcus</i> sp. DLS6	JN029533.1	99
Ap1219	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497.1	99
Ap1221	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	99
Ap1223	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap1225	<i>Bacillus</i> sp. RP-234	GU592214.1	92
Ap1226	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap1227	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap1228	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap1232	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
AP1234	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap1236	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap1239	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-06	FJ824666.1	99
Ap1242	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap1243	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap1245	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
AP1247	<i>Sporosarcina auimarina</i>	EU308120.1	92
Ap12126	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480.1	97
Ap12146	<i>Bacillus</i> sp. ISA-3174	A4936960.1	92
Ap12151	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap12152	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	99
Ap12162	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap12163	<i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10180	AY859478.1	90
Ap12167	<i>Bacillus subtilis</i> AR07	JF501099.1	100
Ap021	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	92
Ap022	<i>Pseudovibrio</i> sp. Ad16	HQ647043.1	97
Ap023	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099	JX164084.1	99
Ap025	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX094286.1	100
Ap027	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	95
Ap029	<i>Alpha proteobacterium</i> JE019	DQ097255.1	100
Ap0202	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	99
Ap0204	<i>Bacillus subtilis</i> BacCA4	JX120507.1	99
Ap0207	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap0208	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap0211	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX094286.1	100
Ap0212	<i>Pseudovibrio</i> sp. Pv348	HE818384.1	99
Ap0213	<i>Bacillus licheniformis</i> RP-GC	GU723480	95
Ap0215	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099	JX164088	99
Ap0216	<i>Bacillus subtilis</i> LLS-M3-11	HM744709.1	100
Ap0222	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_B08	DQ234853.1	99
Ap0231	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM101154.1	95
Ap0233	<i>Bacillus flexus</i> NIOT	JQ818414.1	99
Ap0238	<i>Staphylococcus equorum</i> SCSAAB0024	JQ647888.1	100
Ap0240	<i>Bacillus pumilus</i> M45	JX102495.1	100
Ap0264	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497	99
Ap0282	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497	99
Ap02128	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497	99
Ap02128(2)	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11099	JX164084.1	99
Ap02135	<i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX094283.1	100
Ap02124	<i>Bacillus subtilis</i> K4	JQ8633651.1	85
Ap02136	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-HK09001	HM006897.1	100
Ap02139	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497	99
Ap02140	<i>Bacillus</i> sp. I-SI-32	EU787009.1	92
Ap02142	<i>Bacillus licheniformis</i> OIV 710	GU117643.1	97
Ap02143	<i>Staphylococcus</i> sp. D88	JX094494.1	99

ID	Especie más cercana	Número de acceso NCBI	% identidad
Ap02148	<i>Bacillus subtilis</i> M50	JX102497	99
Ap02150	<i>Psychrobacter</i> sp. KJF12-16	JQ800211.1	78
Ap02153	<i>Bacillus subtilis</i> CMST-SSS	HM01154.1	97
Ap02154	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX094286.1	98
Ap02156	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC11225	JX164089.1	97
Ap02159	<i>Bacillus pumilus</i> B10	JX1112644.1	83
Ap02171	<i>Bacillus subtilis</i> F198_A06	DQ234839.1	97
Ap02181	<i>Bacillus pumilus</i> AP280	JX094286.1	99

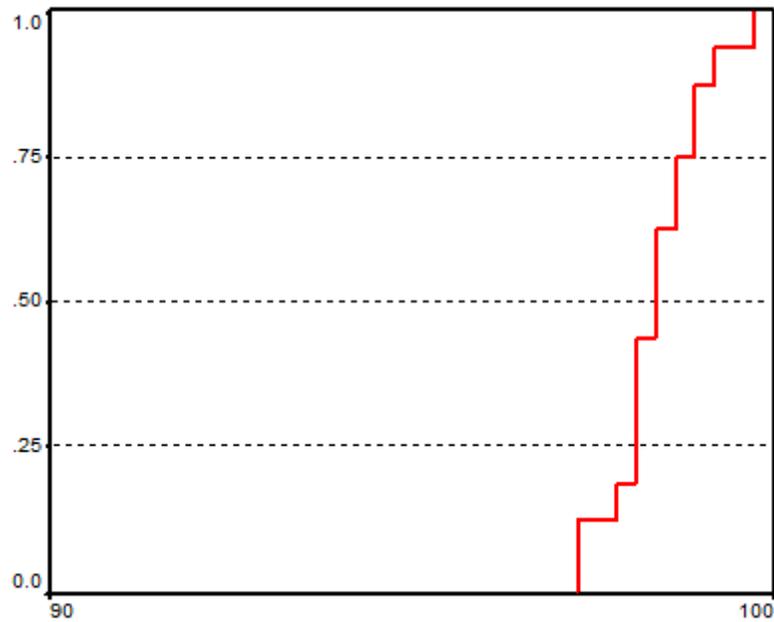
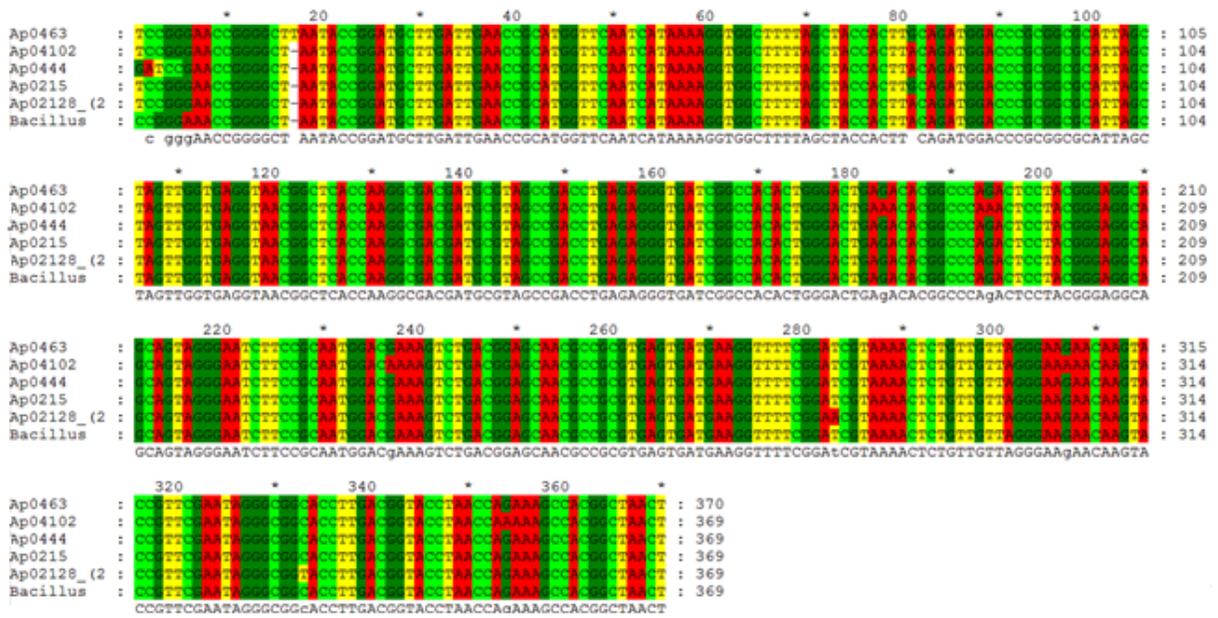
ANEXO III. Análisis de homología de las secuencias de las especies.

***Bacillus licheniformis* F198_B08**



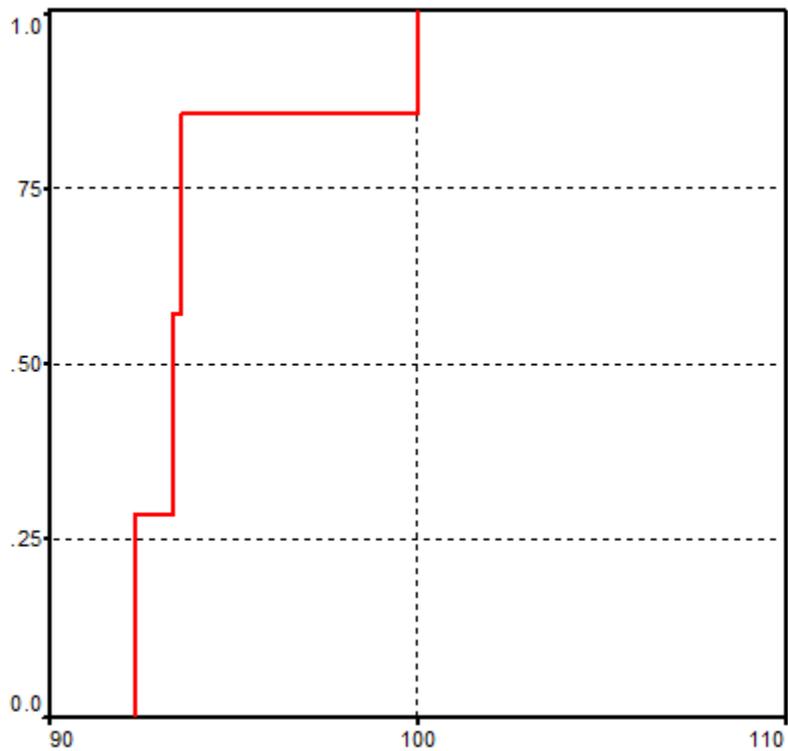
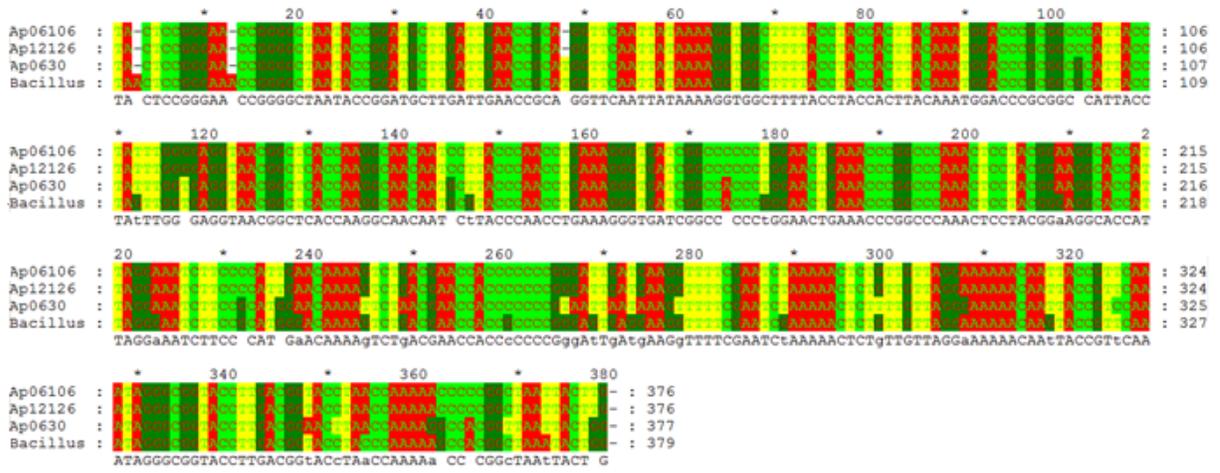
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus licheniformis* F198_B08

Bacillus licheniformis PC-WC11011



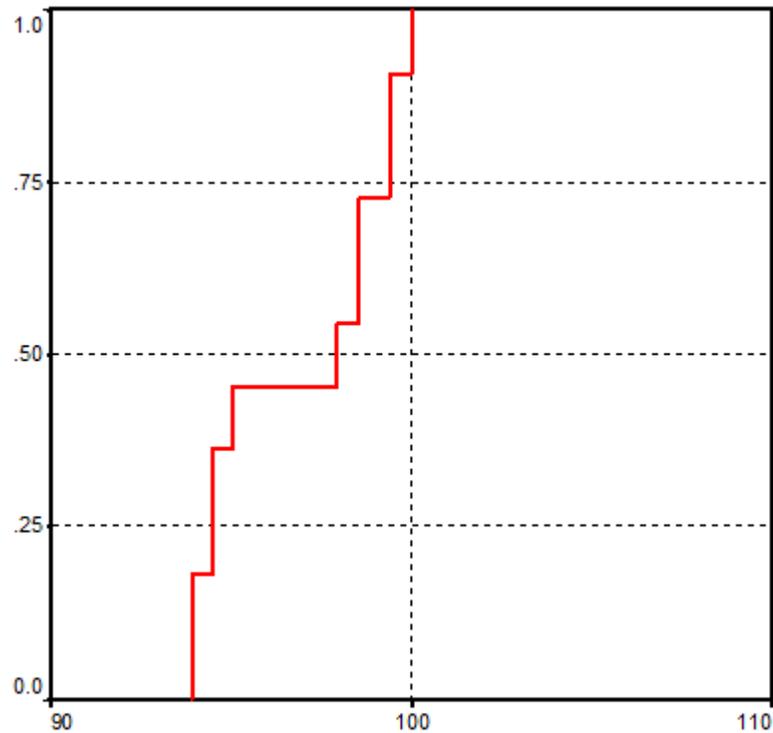
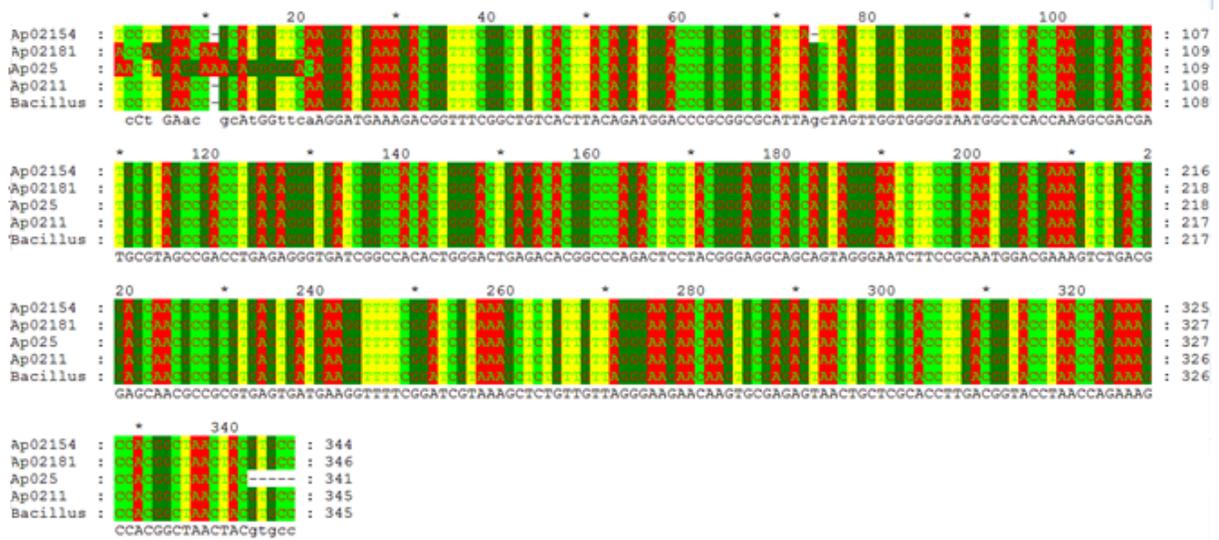
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus licheniformis* PC-WC11011

Bacillus licheniformis RP-GC



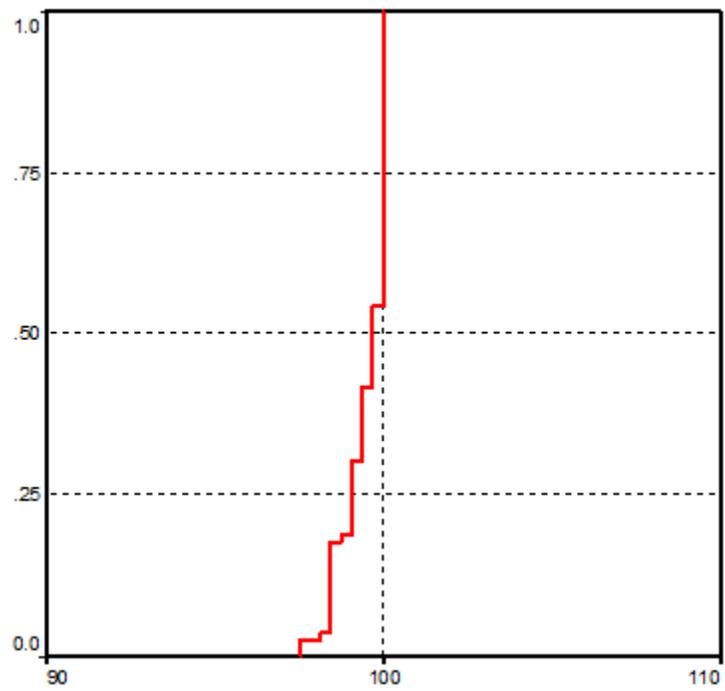
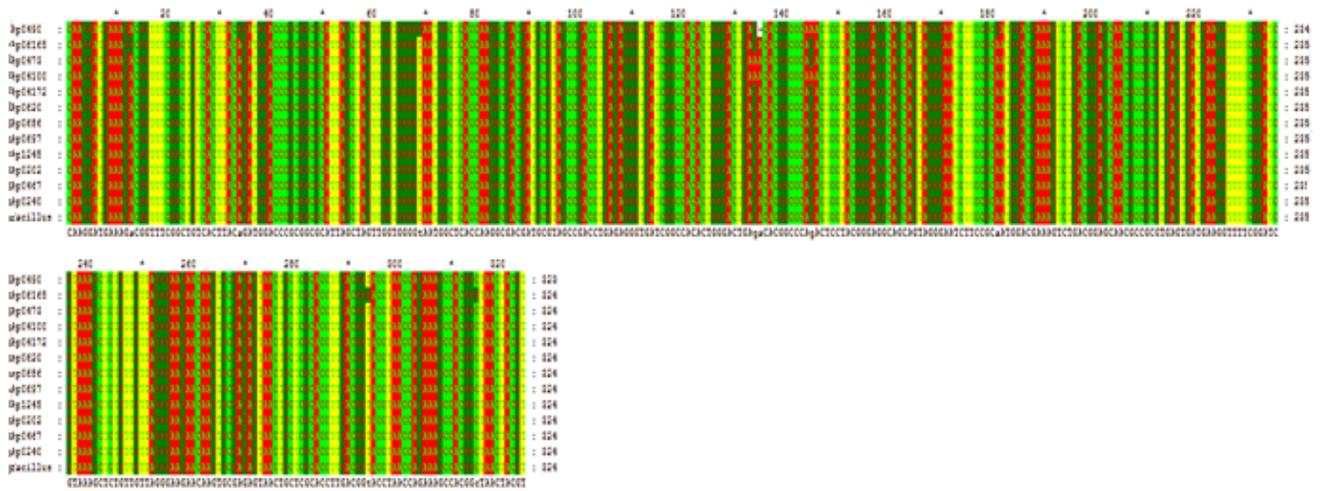
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus licheniformis* RP-GC

Bacillus pumilus AP280



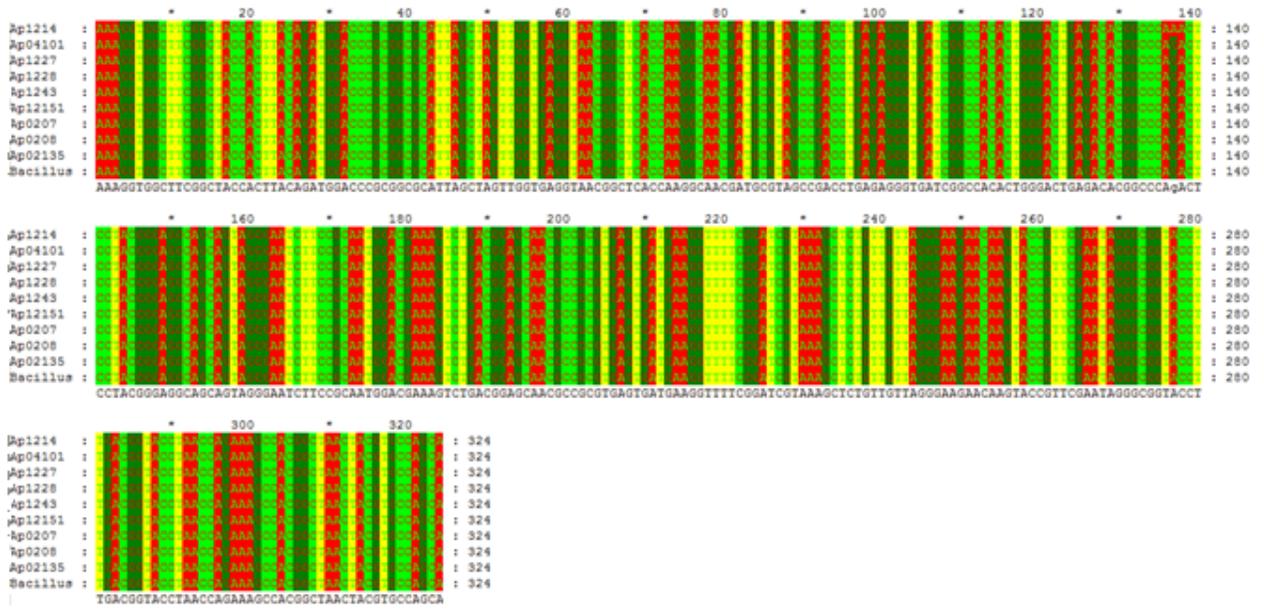
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus pumilus* AP280

Bacillus pumilus M45



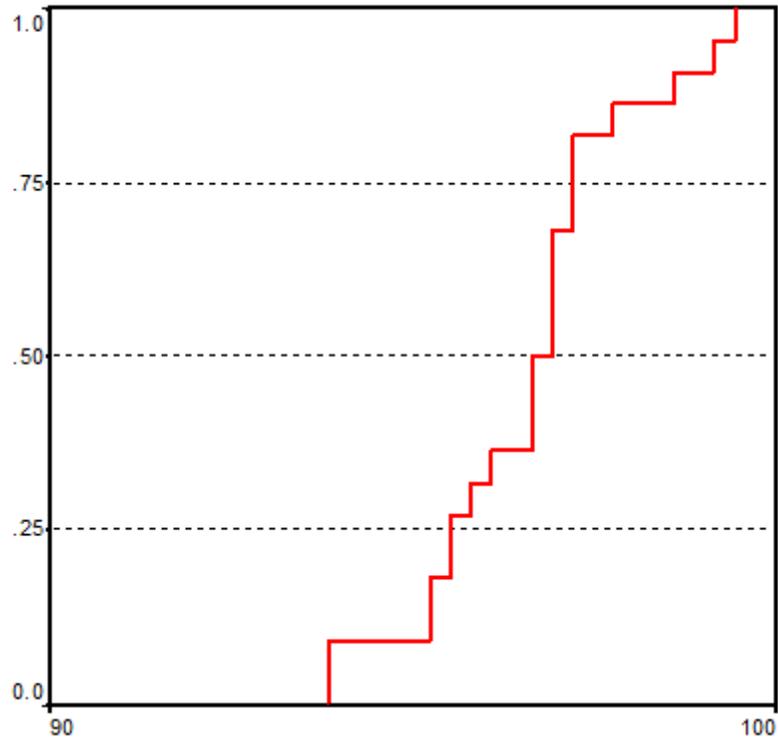
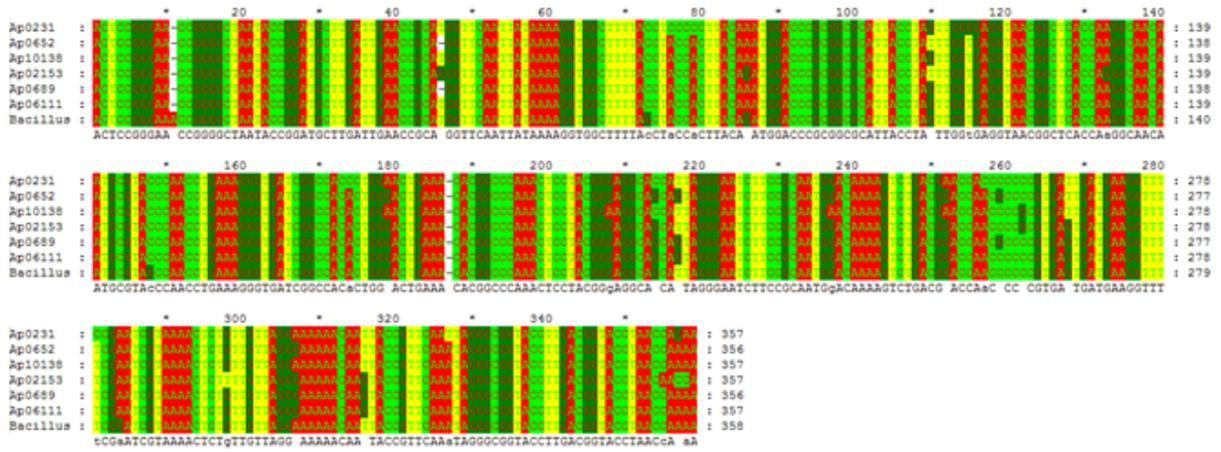
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus pumilus* M45

Bacillus subtilis AP254



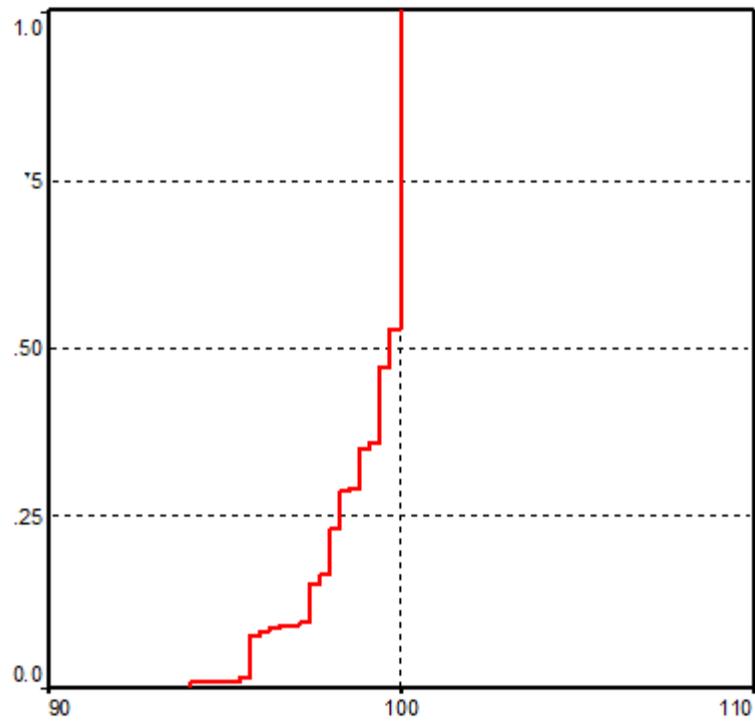
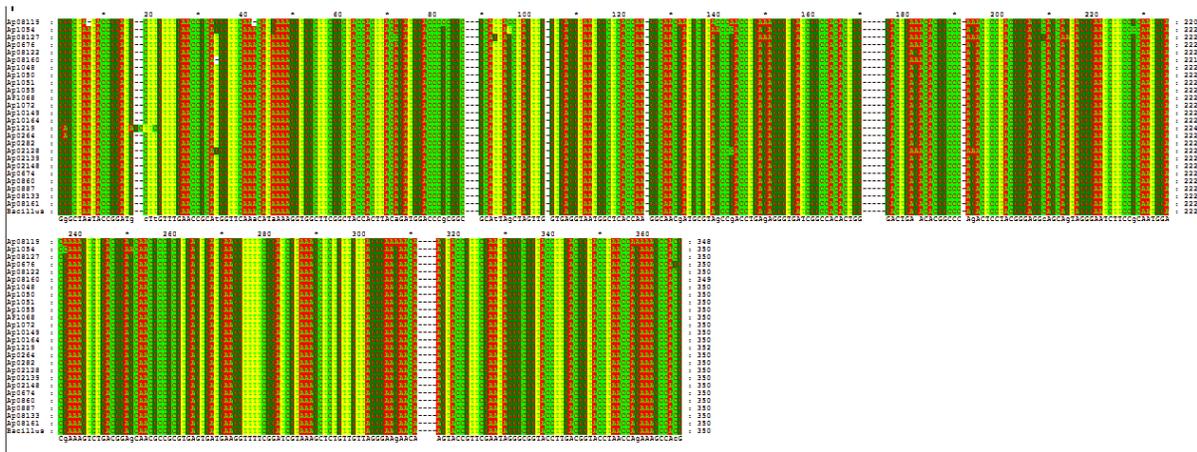
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus subtilis* AP254

Bacillus subtilis CMST-SSS



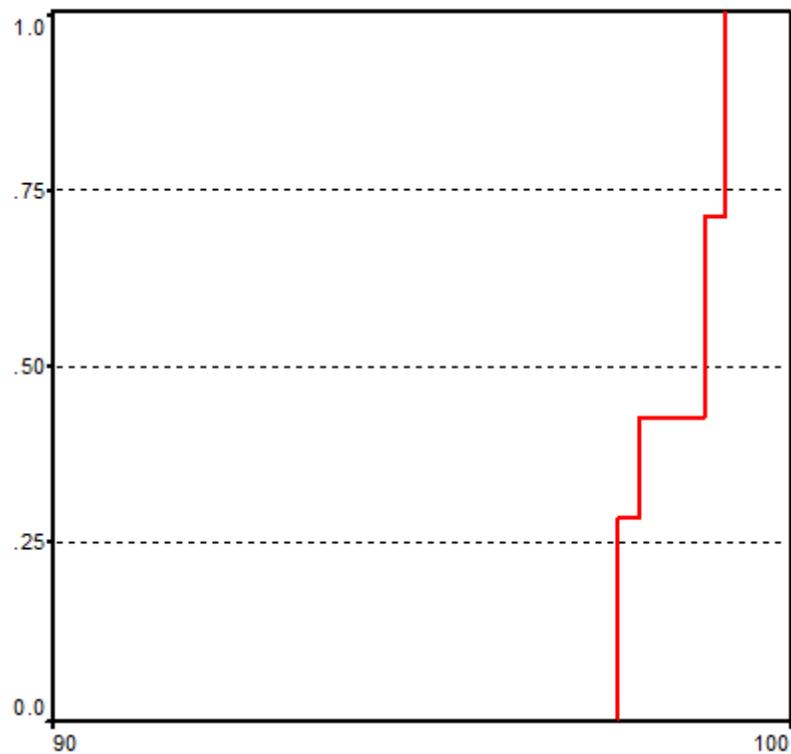
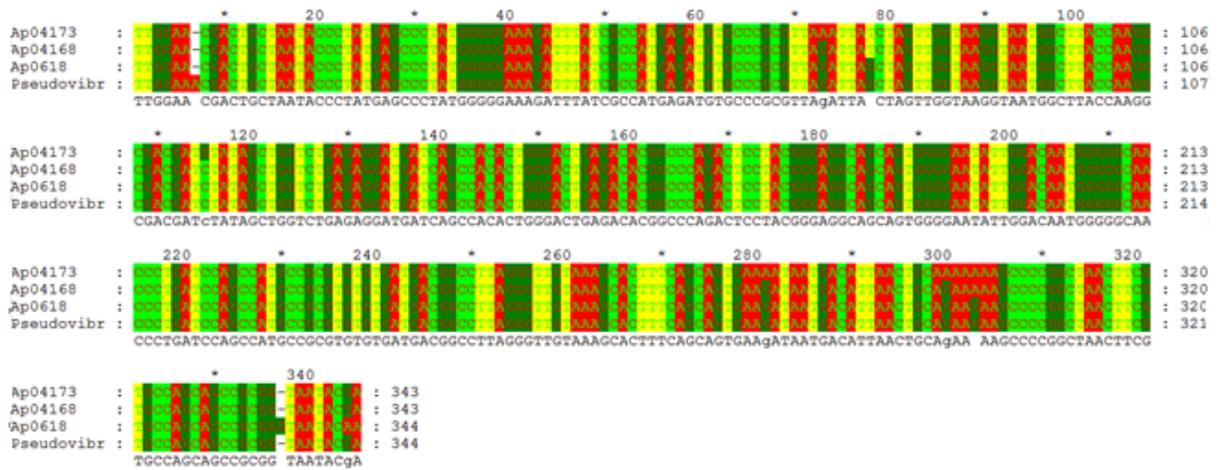
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus subtilis* CMST-SSS

Bacillus subtilis M50



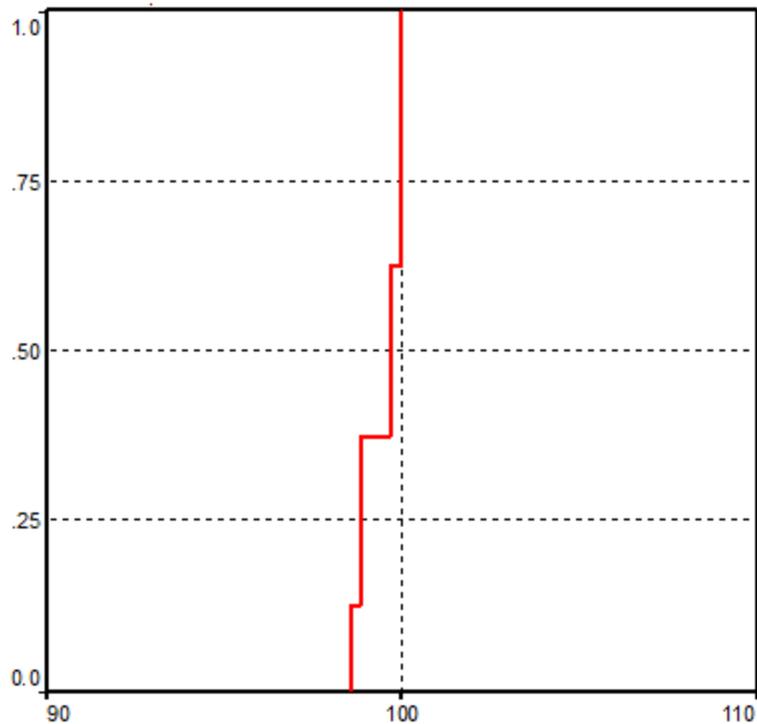
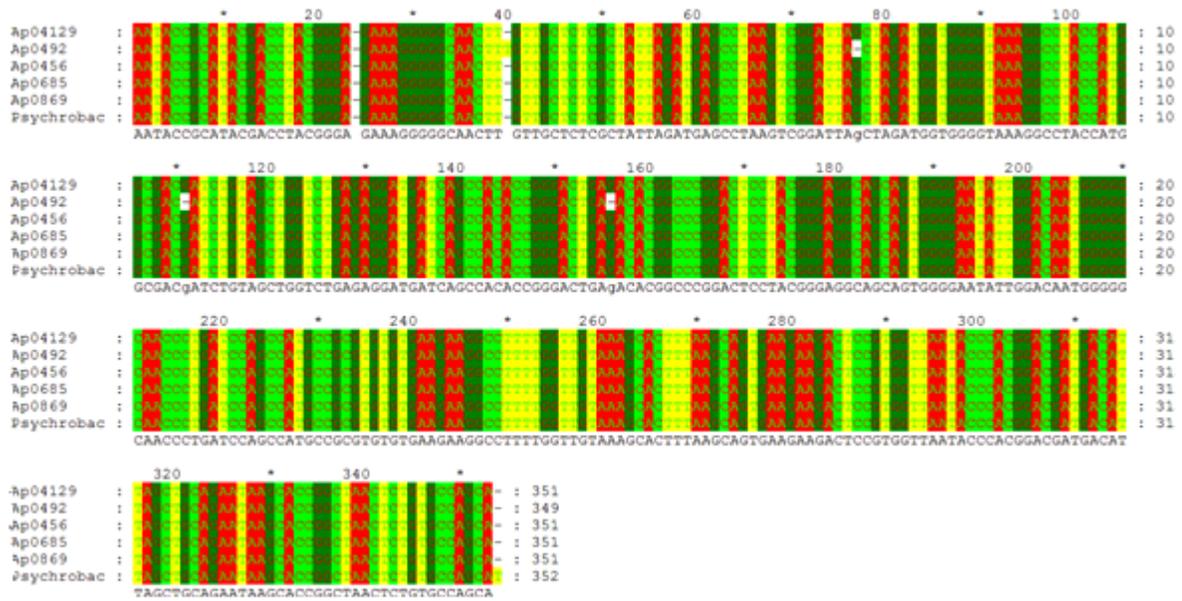
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Bacillus subtilis* M50

Pseudovibrio sp. Mexdtt2



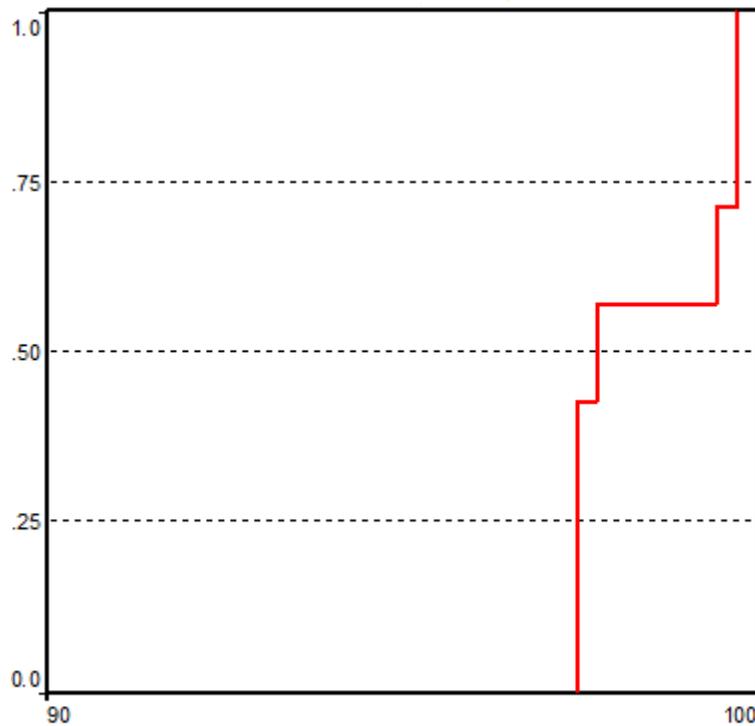
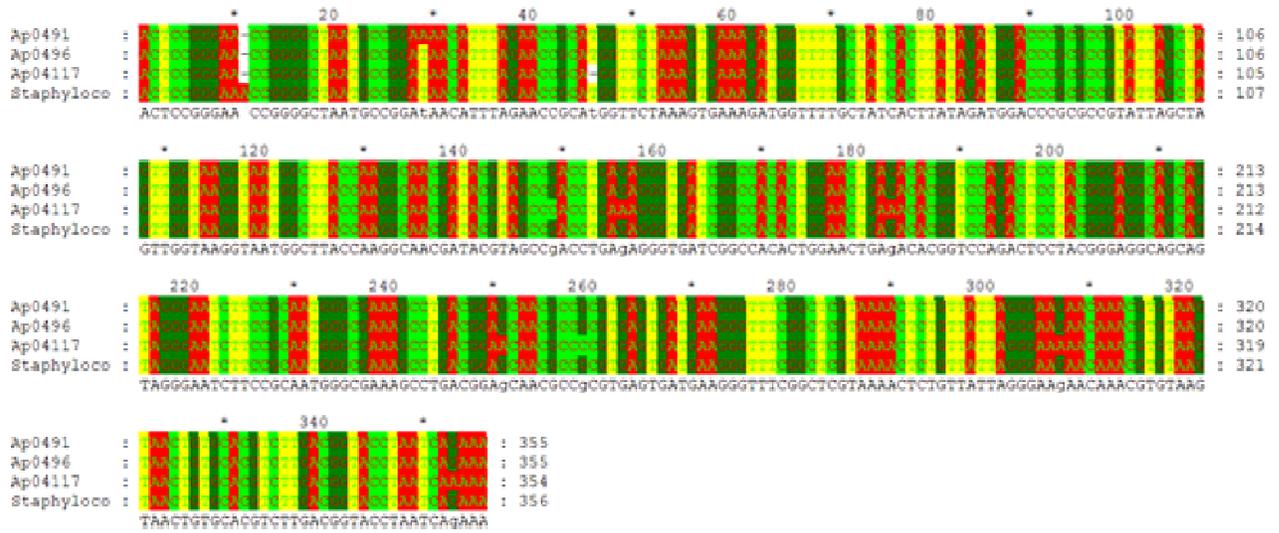
Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Pseudovibrio* sp. Mexdtt2

Psychrobacter maritimus ZT7



Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Psychrobacter maritimus* ZT7

Staphylococcus arlettae ARB7



Porcentaje de homología entre secuencias relacionadas con *Staphylococcus arlettae* ARB7

ANEXO IV. Secuencias de las bacterias aisladas de *Aplysina gerardogreeni*.

Secuencia: Ap041

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus arlettae* An 116

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TCCACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTT
ATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACCTCT
GTTATTAGGGAAGAACAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGG
```

Secuencia: Ap0444

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-WC11011

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GATCCGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTA
CCACTTACAGATGGACCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap0471

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Micrococcus luteus* KS2

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CTGGGAAGCCTGGGAAGTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTT
ATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTA
GCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGGGGTAATACGACTCCGTG
```

Secuencia: Ap0496

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus arlettae* ARB7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GACTCCGGGAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTAGAACC GCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGC
TATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATACGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGGTTTTCGGCTCGTA
AAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACGTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap0498

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Micrococcus luteus* ADR52

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CCTGGGAAGTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTT
GGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCT
GAAAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCT
TTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGG
GGTAGCGTGCCAGCAGCCGGAATA
```

Secuencia: Ap0499

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* AR07

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TGGGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGATTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTTCCACTTACAGATGGACCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGGCACC
ATGCGTAGCCACCTGAAAGGGTGATCGGCCACCCTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGC
AACAGTAGGGAATCTTCCCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACCCCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGG
ATCGTAAACTCTGTTGTTTGGGAAAAACAAGTACCCGTTCAATTGGGCGGGCCCTTGACGGGACCCAACCA
AAAAGCCCCGGGTAATACCG
```

Secuencia: Ap04103

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* AR07

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TGGGAACCTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCT
TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCG
GATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGGACCGGTGCAATTGGGCGGTCCCTTGACGGTTCCTAACCC
AAAAAGCCCCGGCTAACTACCTC
```

Secuencia: Ap04104

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Psychrobacter maritimus* ZT7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GATAGCTTCGGGGAACCTCGATTAATACCGCAAACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAACTTGTGCTCTCGCT
ATTATATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTACATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACAATCTGTAGCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGCCGCACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACCGGAGGCATCAGTGGGGAA
TATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCAC
TTTAAGCACTGAATAATACTCCGTGATTAATACCCACGGACGATGACCTTATCTGCACAATAACCACCGGCTAA
CTCTGTGCCAGCACCGGGCG
```

Secuencia: Ap04107

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* CMST-SSS

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCAGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTT
TACCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTACCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACAAT
GCGTACCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGACCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGAAT
CGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAAACAATTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAAA
AGCCACGGCTAACTACGGCC
```

Secuencia: Ap04114

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio* sp. JM38

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCG  
CGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA  
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGG  
GCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCAGTGAAGA  
TAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAAAATAACGGCT  
AACTCCGTGCCAATATCGCTGGCCCCACGCCGTTTA
```

Secuencia: Ap04120

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* BacCA4

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TGCTGGGTAACCTCCGGGAACCTCGGGGTCTATATACCGGATCGCATTCTGTTTGAACCGCAGGGTTCAAACATA  
AAAGGTGGCTTCTGCTACCACTTACATATGGACCCCGGCGCATTAGCTAATTGGTGAGGTAATGGCTCACC  
AAGGCCTGGATGCGTAGCCTACCTGACAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCTATTGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAACAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTTCGGAAGAACAAGTACCGTTCCAATAGGGCGGTACCTTGACGGT  
ACCTAACCAAAAAGCCACGGC
```

Secuencia: Ap04121

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus pumilus* AP280

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GTTACTCCGGGACCGGAGCTATTACCGGATAGTTCCTTGAACCGCAGGGTTCAAGGATGAGCTACGTTTCT  
GCTGTCACCTTACATATGGACCCCGGCGGTTAGCTAATTGGTGGGGTAATGGCTCACCTGGGCCACGATGC  
GTAGCCTAACTGACAGGGTGATCAGCCACACTGGGACTGAAACCCGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTACT  
GTACGGAATCTCCACCATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGATTGATGAAGTTTTTCGGATCG  
TAAAGCTCTGTTGATTCGGAAGAACAATGCGAGAATAATTGCTCTCACCTTAAAAGTACCTAACCTAAATCC  
CCGGCTAACTCCGCGCCAA
```

Secuencia: Ap04170

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-WC11011

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGAAACTCCGGGACTCGGGTTATATACCGGATGCTTGATTGAGCCGCAGGGTTCAATCTGATGATGTGGC
TTTTAGCTGACCCTTACTCATGGACCCTCGATGCTGTAGTTAATGGGTGAGGTGACGGCTATCCAAGGCTACA
ATGCGTAGCCGACCTGACAGGGTGATCGTCCACCCTGGGACTGACACCCGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
ATTGGTAGGTGATCTTCCCCATGGACAAAAGTGTGACGGACCAACGCCGCGTGATTGATGAAGTTTTCT
ATCATAAACTCTGTTATTCGGGAAAAACAACCTCCCGTTCGATTAGGTTGGCTGCTTAATAGTCCCTAACCAA
ACTCCGCGGCTAACTACG
```

Secuencia: Ap04175

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Psychrobacter maritimus* ZT7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TGGAAACTCGGGAATCGGGTTTATTACGGGACGCTTGATTGAAACACAGGGTTCACCTGTTGCTGTGGCTTTT
AGATGACCCTAAGTCGGATTACCTAGATGGTGGGGTAAATGGCTACCATGGCGACTATCTGTGGCTGGTCTG
AGAGGATGATCTGCCAGGCCGGGACTGAAACCCGGCCCGGACTCCTACCCGAGACTCCAGTGGGGAATATT
GGACGGTGGTCTTACCCCTGATCCAACCATGCGACGTGTGTAAGAAGGCCTTTTTGGTTGGTTTCACTTTAAG
CAGTGTCTATGACTCCGTGAAAATACCCACGGACGATGACGTTGGCTGCTGAATAAGCCCCGGCTAAATCT
GTGCCAGCAGTGGGGGGCA
```

Secuencia: Ap0618

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio* sp. Mexdtt2

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GACACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCC
GCGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG
GGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAAG
ATAATGACATTAAGTGCAGAAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGGTAATACAACGTAACCA
GACGCCCCCGTACAACACTG
```

Secuencia: Ap0624

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Paracoccus* sp. F11014

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CGGATAGCCCGGAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTTGGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGG
CCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAAT
GGGGGCAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGG
GAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAGAACCTA
ACCAAAAAGCCACGGCTATCTACT
```

Secuencia: Ap0630

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* RP-GC

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTT
TTACCTACCACTTACAAATGGACCCGCGGCGCATTACCTATTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACAAT
GCTTACCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACCCTGAACTGAAACCCGGCCAAACTCCTACGGAAGGCAC
CATTAGGAAATCTTCCGCATGGAACAAAATTCTAACGAACCACCCCGTAATTAATAAAGTTTTTCGAATCT
AAAAACTCTTTTGTAGGGAAAAACAATTACCGTCCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGACTTAACCAAAAGG
CCACGGTTAATTACTGG
```

Secuencia: Ap0635

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* F198_B09

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CTCCGGAACCAAGTGCCTATTACCGGATGCTTGATTGACCACAGGGTATCACCTTGAAGGGGGCTTCCGTTAC
CTCTTACAGATGGACCCGCGGCGGATTACCTAGGTGATGAGGTAATGGTGCACCGAGGCGATGATGCGTAA
CCCAGCTGATGGGGCGATCGGCCACCCTGGGCCTGAGGCACGGCCGAGACTCCTACGGGAGGGGGCACTA
CGGAATCTTCCCATGGGACGAAAGTCTGACGGACCAAGAAAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGAGGATTGGCCAGGATTTGGAAAAGACTTTACGTTCTCCTATCAATTAACGAAAAACTGTTTCTTTTACG
GGACCAGCAGCCGCGGTATAG
```

Secuencia: Ap0637

Gen: 16S

Especie mas cercana: Uncultured marine bacterium Clone T3690

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGACTTCGGACGGCTAATACCGGATAATCCTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGACGGTTTTCGGCTGT  
CACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG  
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTA  
AAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCC  
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
```

Secuencia: Ap0641

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus cibi* 102

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TCCCGGACTAATACCGGATACTATGTCAAACCGCATGGTTTGACATTCAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTAC  
AGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT  
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAACTCTG  
TTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAACTGCCGGCGCCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA
```

Secuencia: Ap0678

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* APS2

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GTGTGGTTACTGCAGAGGAACCGGCCTATTCACAACGGTGCTTGTCTTCCCTAACGGAGAGTTTTACAATCC  
GAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGAAAGATTCCCTACTGCTGCC  
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGT  
CGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGGAAGTGGTAGCTAAAATC  
CACTTTTTATAATTGAACCGTGGGGTTAAATCAAGCATCGGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGGAGTTATCCAAG  
TCTAACGGGCCGTTACC
```

Secuencia: Ap0684

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* M50

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GTTTGTTTCCCACATCGGAGCAATTAATTCGGTGCTTCATCATTTAACTGGCTGCGGCGGCTTTTTCTTTGG  
CAAGAAATGGCTCCGCTCCTGAGTAGTATCTGGTCGTGTCTGATCCCAAGTGGCCGATGACATCTCCGTCAG  
CTCCGCATGGGTGCATTGGAGAGCATTTTCTCACCACAAATAAATCCCGAGGGTCCCTCTGTGAGTGGT  
GGCCGAAGCCCCCTTTAAGGTTGAGCCGTGGGGTTGAACAACCTCCGGTATAAGCCCCGGTTTTGAAAT  
TCCCAACTCAAACGGCAGGTTACCCCGTGATGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAGGTTGT  
TGAACCGGTTCAAAGGA
```

Secuencia: Ap0693

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* CMST-SSS

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGAATACTTCGGGAACGGAACTATACCGGATAATTTTTTTTACTCATGTAAAAGCTAAAGCTGGTCTTACTAT  
ATCACAACCGGTTGCGGCGCATTACCTATTTGGTAGGTACCGGCTCCCAAGGCACCGATGCGTATTAACCTG  
AAAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTAAAACACGGCTTAAACCTTACGGGAGGCACCATAGGGAATCTTT  
TCCATTGGACAAAATCCTGACGGACACCCCCCGTGATTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAATTCTGTTGT  
TAGGGAAAAACAATTACCGTTCAATAGGGCGGTACTTTGACGGTACTTAACCAAAAAGCCACGGCTAATTAC  
TTGCCCCCGGAAAAA
```

Secuencia: Ap0694

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus megaterium* AUBM29

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ATTCGACGAAGCTAATACCGGATAGGACTTCTCCTTCATGGGAGAGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTT  
ACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGAC  
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAATC  
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
```

Secuencia: Ap06111

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* CMST-SSS

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CTGGGAAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGG
CTTTTACCTACCACTTACAAATGGACCCGCGGCGCATTACCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA
CAATGCGTACCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAAACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGACCAACCCCCCGTGAGTGATGAAGTTTTTC
GAATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAAACAAGTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC
AAAAAGCCACGGCTAACTAC
```

Secuencia: Ap06113

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio denitrificans* F71059

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGTAGGGACACAGTTGGACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGAT
GTGCCCCGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC
AATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCA
GTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAACCA
AACCTAAAGCCCCCGCTATT
```

Secuencia: Ap06115

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus nealsonii* CB-KC-1

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCT
GTCACCTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap06116

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. CBMAI 1081

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCT
GTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap06141

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio denitrificans* CBMAI1103

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
AAATAGTACTCTAGCGGAACCCGAGGCTATTATACCGATAGGGTTAGTTTGAAGCACCGGGTGGATATGAAAA
AGGGATTCGTTGCTCTCTTTCAAAGGGCCCCCGCCGCATTCTTTTTGGTAAGGAAAGGGGTCTTAGGGC
AGCATGGCGTACCAACCCAGAGGGTGGATGGGCCCCCGGGTACAAATAGGGCCCCAAACCCCTCCTACGGGA
GGCATTAGGATTTCTCGTCATTGATGGAAATTCTGATGGAGCAGCCCCCTCATTGATGGTTTTTTTCGATTG
GTACATTTTTGTGTTTGGGGAAAAAAAAAACCCTTCAAAGTGGGGGTGCACTTGTTGGTACCAACCCAAAAG
CCCACGGCTAACTACTTG
```

Secuencia: Ap06145

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus cibi* 102

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACTCCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATACTATGTCAAACCGCATGGTTTGACATTCAAAGACGGTTTTCGGC
TGTCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATC
GTAAACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAACTGCCGGCGCCTTGACGGTACCTGACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCACAG
```

Secuencia: Ap06155

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Psychrobacter maritimus* ZT7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
AAGCTCGGGGAACCTCGAATTAATACCGCATACGACCTACGGGAGAAGGGGGCAACTTGTGGTCTCGCTATT
ATATGATCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGACTG
ACAGGATGATACCCACACCGGGACTGAAACCCGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCACCAGTGGGGAATATT
GGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTA
AACAGTGAAGAAAACCTCCGTGGTTAATACCCACGGACGATGACATTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTC
TGTGCCAGCAGCCCGATACG
```

Secuencia: Ap0846

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Terribacillus goriensis* CL-CR16

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TCGGAACGGACTAATACCGGATAGTATTTCTTTCTCCTGATTGGAAATGGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACT
TACAGATGGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGA
CCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCCGC
```

Secuencia: Ap0858

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* AR07

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGGTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCCCGGCGCATTAACTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGGAACGATGCGT
AGCCAACCTGAAAGGGGGATCGGCCACCCTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACCCCCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAACAAAGTACCGTTGCAATAGGGGGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAAAAGCC
ACGGCTAAATACGTGCCAAC
```

Secuencia: Ap0859

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. J2015s

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ATACTTCGGGAACCGGAGCTAATGCCGGATAACATATAGAACCGCATGGTTCTATAGTGAAAGATGGTTTTGC
TATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGCGTAAGTAACTGTGCGCATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGC
```

Secuencia: Ap0869

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Psychrobacter maritimus* ZT7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGGGAAGCTCGGGAACCTCGAATTAATACCGCATACGACCTACGGGAGAAAGGGGGCAACTTGTTGCTCTC
GCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGGGCAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAG
CACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCCGTGGTTAATACCCACGGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCG
GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC
```

Secuencia: Ap0870

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus arlettae* ARB7

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ATAGAAGAACTCAGGGGNCGGGGCTAATGCCGGATAATTTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGG
TTTTGCTATGACTTATATTTGGACCCGCGCCGTATTACATTATTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGAT
ACGTAGCCGACCTGACAGGGTGATCGGACCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCAACCGGAGGCAG
CAGTACGGAATCTTCCCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTTCGGC
TCGTAAAACCTCTGTTTTTGTGGAAAAGCAAAAATGAAAATCACTGTGCACGGGTTGACCCTTGAAATCACCTAG
CCACAAATACCTACGTGC
```

Secuencia: Ap0879

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Micrococcus luteus* DSM20030

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTT
GGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGCGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
```

Secuencia: Ap0881

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. clone 68

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TGACTTCGGCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTTTGCTGTC
ACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAA
ACTCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCAGC
GCTAACTACGTGCCAGCAGCC
```

Secuencia: Ap08161

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* M50

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap1049

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. EB338

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CGGAGCTAATACCGGATAATATTTTCGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGAT
GGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATT
AGGGAAGAACATACGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATA
```

Secuencia: Ap1066

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Halomonas* sp. H1 (2012)

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGAACCTGGGGAACCCAGGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC
GCTATCGGATGAGCCTATGTCCGATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAG
CACTTTTCAGCGGGGAAGAAGCCTGGCGGCCAATACCCGCCAGGAGGGACATCACCCGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGG
```

Secuencia: Ap10123

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. CBMAI 1081

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGATACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTT
GCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC
GTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCG
```

Secuencia: Ap1217

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. DLS6

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGATACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTT
TGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATAC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATC
GTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCA
```

Secuencia: Ap1239

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* WX-06

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGAATCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTT
AGCTACCACTTGACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGG
ATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
```

Secuencia: Ap1247

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Sporosarcina aquimarina*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TACTCCGGGAACCGGAGCTAATACCGAATAATCGGTTCTTCCGCATGGAAGAACTCTGAAAGACGGTTTTCGG
CTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGC
GTAGCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA
TTAGGGAATCTTCCACAAGGGACAAAAGTCTGATGGACCACCCCGTGAGCGAAAAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAAAACAATTACGAAAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTCTTTAAAAAGCC
CCGGTTAATTACTTGCCACC
```

Secuencia: Ap12167

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* AR07

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap022

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio* sp. Ad16

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACAAAGTCGGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGCAAAGATTTATCGCCATGAAATGTGCC
GCGTTACATTATCTAGTTGGTACCGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGG
GCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAAGA
TAATGACATTAAGTGCAGAAGAAACCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAACCTAACAAAA
CCCCGCGACTAACTACGT
```

Secuencia: Ap023

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-WC11099

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GCTGTGGATTGGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGGGCCAAATACGAACAATT
```

Secuencia: Ap027

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-WC11099

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACTGGGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTG
GCTTTTACCTCCCATTTACAAAAGGGCCCCCGGCGCATTACCTATTTGGGGAGGTAACGGTTCACCAAGGCA
ACAATGCTTACCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACCCGGAACTGAAACCCGGCCAAACCCCTACGGAA
GGCACCATTAGGAAATCTTCCCATGGAACAAAAGTCTGACGAACCACCCCCCGGGATTGATAAAGGTTTTTC
GAATCGAAAAATTCTGTTGTTAGGAAAAACAATTCCCGTTCAAATAGGGGGGTACCTTGACGGTCCCTAACCC
AAAAAGCCACGGTTAATTAGAGATGATG
```

Secuencia: Ap029

Gen: 16S

Especie mas cercana: Alpha proteobacterium JE019

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGACACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGC
CCGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCAGTGA
AGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAAAATAACG
GCTAACTCCGTGCCAATATCG
```

Secuencia: Ap0204

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* BacCA4

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TTCAAATCATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGG
TACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGTGGGGAATTAATACGACTTTTCG
GGTTTTTTTCTCTCTTGTGGT
```

Secuencia: Ap0211

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus pumilus* AP280

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CCGCCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACT
TACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
```

Secuencia: Ap0212

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Pseudovibrio* sp. Pv348

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GTTGGAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCGTTA
GATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAAC
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAAAATAATG
ACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGACCTTCCATTAGAAAG
CTGGGTAATTTTATTTGCTAA
```

Secuencia: Ap0213

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* RP-GC

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TTACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTTT
ACCAACCCCTTACAGAGGGACCCGCGGGCATTAGTTAGTGGGGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACAAT
GCGTAGCCAACCTGAAAGGGGGATCGGCCACCCTGGGCCTGAAACCCGGCCAAACTCCTACGGGAGGCA
CCAGTAGGGAATCTTCCCACATGGGACAAAATTCTGACGGACCACCGCCCCGTGATTGATGAAGGTTTTCGAA
TCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAAAACAAGTACCGTTCAAATAGGGGGGACCCTTAACGGACCCTAACCAA
AAGCCCCGGTTAACTACTTGC
```

Secuencia: Ap0216

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* LLS-M3-11

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
TGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
```

Secuencia: Ap0222

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* F198_B08

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCT
TTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACA
ATGCGTAGCCAACCTGAAAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGG
ATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA AAAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAA
AAAGCCACGGCTAACTACGC
```

Secuencia: Ap0233

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus flexus* NIOT

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTATC
ACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAA
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCC
```

Secuencia: Ap0238

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus equorum* SCSAAB0024

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
CGGAGCTAATGCCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTAAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGAT
GGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACGACCGTCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTATT
AGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATA
```

Secuencia: Ap0240

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus pumilus* M45

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGGATACTCCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTT
TCGGCTGCTACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGAGC
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
```

Secuencia: Ap02135

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* AP254

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ATCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap02136

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-HK09001

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GGATCCGGACGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAAGGTGGCTTTTAGCT
ACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
```

Secuencia: Ap02142

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* OIV 710

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
AAAACCTCCGGGAACGGGGCTATACCGGATGTTGATTGAACCGCAGGTTTATTATAAAAAGGTGGCTTTACTACCC
TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTACTAGTTGGTGAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTACCCACC
TGAGAGGGTGATTGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTTTGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTG
TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCACGGGGG
```

Secuencia: Ap02143

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Staphylococcus* sp. D88

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
ACTTCGGGAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTG
TCACTTATAGATGGATCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAA
AACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAG
```

Secuencia: Ap02156

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus licheniformis* Pb-WC11225

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
TAGATGGGATACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGG
TGGCTTCGGCTGCCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAACTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGATGCCTAACCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAACAACGCCCCGTGAGTGATGAAGGTTT
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAAGGAAAAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA
CCAAAAAGCCCCGGCTAACT
```

Secuencia: Ap02171

Gen: 16S

Especie mas cercana: *Bacillus subtilis* F198_A06

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Junio, 2008.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 380

```
GAAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCAGGTTCAATTATAAAAAGGTGGCTTTTA
TCTACCACTTACAAATGGACCCGCGGCGCATTACCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACAATGC
GTACCCAACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACAAAATTCTGACGGACCAACCCCCGTGATTGATGAAGGTTTTTGAATCGT
AAAATCTGTTGTTAGGGAAAAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCC
```