

**COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE BACTERIAS
EPÍFITAS DE *Ulva lactuca* Y TAMIZAJE PRELIMINAR DE SU ACTIVIDAD
FUNCIONAL**

PAULA TATIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

Tesis para optar al título de Bióloga Marina

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTÁ D.C.**

2014

**COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE BACTERIAS
EPÍFITAS DE *Ulva lactuca* Y TAMIZAJE PRELIMINAR DE SU ACTIVIDAD
FUNCIONAL**

PAULA TATIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

Tesis para optar al título de Bióloga Marina

Directora

JOHANNA SANTAMARÍA VANEGAS

Bióloga PhD

Co-directora

NATALIA BEATRIZ COMBA GONZÁLEZ

Bióloga Marina MSc.

Asesora

XIMENA CAROLINA PÉREZ MANCILLA

Microbióloga Industrial cPhD.

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTÁ D. C.**

2014

Dedico todo el esfuerzo y el conjunto de emociones que esta etapa; corta y trascendental, otorgó al camino para ser profesional:

A mi familia, cercana y lejana, gran responsable de la persona que soy y a quienes les debo todo por cumplir y dar paso a nuevos rumbos en mi vida.

A mis padres, Rosario y Juan quienes siempre están conmigo, y me apoyan incondicionalmente de maneras innumerables.

A mis abuelas, Cecilia y Belén, quienes aún me acompañan para compartir estos logros conmigo.

Y en especial, a mi tío Ricardo, espectador alado y testigo de todo este proceso, y a mi hermanita Danna.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a **Natalia Comba**: mi profesora, co-directora y amiga, quién estuvo junto a mí de principio a fin, apoyando y fortaleciendo nuestro trabajo sin importar las circunstancias. Estoy segura que sin ella este proyecto no hubiera culminado tan satisfactoriamente.

A mi directora **Johanna Santamaría**, por sus aportes y consejos fundamentales que mejoraron el enfoque del documento final,

A **Xiména Pérez**, que además de sugerencias, fue testigo y compañía del arduo trabajo que Nata y yo realizamos.

A todos los trabajadores y compañeros en el **Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional**, quienes dan por sentado que el esfuerzo es el mejor alcance de nuestros logros.

A la profesora **Dolly Montoya** por permitir que el IBUN fuera el hogar de mi trabajo y por sus recomendaciones.

A **Isabel Hernández** por su compañía y apoyo en la salida de campo.

Finalmente, a todos **mis amigos(as)** y **personas** quienes, sin tener la necesidad de estar 24/7 a mi lado o conocer detalladamente el objeto de mi trabajo, me apoyaron de corazón y concentraron su energía en mí, deseando éxitos, bendiciones y sobre todo, fuerza y ánimo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. Biología y ecología de <i>Ulva lactuca</i> y sus bacterias epífitas.....	5
3.1.1. Generalidades de las clorófitas.....	5
3.1.2. <i>Ulva lactuca</i>	6
3.1.2.1. Clasificación taxonómica.....	6
3.1.3. Interacción alga-bacteria.....	7
3.2. Estudios realizados con bacterias epífitas de macroalgas marinas.....	9
3.3. Importancia del ADN en la ecología microbiana	10
3.4. Actividad biológica de bacterias epífitas de macroalgas marinas	12
4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	15
4.1. Problema de investigación.....	15
4.2. Objetivos.....	16
4.2.1. Objetivo general.....	16
4.2.2. Objetivos específicos.....	16
5. HIPÓTESIS	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1. Área de estudio.....	18
6.2. Diseño muestral.....	19
6.2.1. Fase de campo	19
6.2.1.1. Reconocimiento de <i>U. lactuca</i>	20
6.2.2. Fase de laboratorio.....	21
6.2.2.1. Reconocimiento microscópico de <i>U. lactuca</i>	21
6.2.2.2. Obtención de una metodología selectiva para la extracción de ADN de bacterias epífitas de <i>U. lactuca</i>	21

6.2.2.3. Análisis de calidad del ADN obtenido en las metodologías evaluadas	25
6.2.2.4. Aislamiento de bacterias epífitas de <i>U. lactuca</i>	26
6.2.2.5. Tamizaje funcional (<i>Screening</i>) de lipasas, celulasas y sideróforos sintetizados por bacterias epífitas de <i>U. lactuca</i>	28
6.2.2.5.1. Tamizaje de lipasas.....	28
6.2.2.5.2. Tamizaje de celulasas.....	29
6.2.2.5.3. Tamizaje de sideróforos.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7.1. Obtención de una metodología selectiva para la extracción de ADN de bacterias epífitas de <i>U. lactuca</i>	35
7.2. Análisis de calidad del ADN contenido en las metodologías evaluadas.....	39
7.3. Aislamiento de las bacterias epífitas cultivables de <i>U. lactuca</i>	43
7.4. Tamizaje funcional de lipasas, celulasas y sideróforos en bacterias cultivables asociadas a <i>U. lactuca</i>	45
7.4.1. Tamizaje de lipasas.....	45
7.4.2. Tamizaje de celulasas.....	47
7.4.3. Tamizaje de sideróforos.....	50
8. CONCLUSIONES.....	53
9. RECOMENDACIONES.....	54
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55
11. ANEXOS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas potenciales de una asociación epibiótica para cada una de las partes (Modificado de Wahl, 2009).....	8
Tabla 2. Diferencias generales de las etapas de extracción de ADN en cada protocolo a evaluar.....	24
Tabla 3. Concentración promedio de ADN (ng/μl) obtenido para cada metodología evaluada.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ulva</i> sp. adherida al sustrato del litoral rocoso de “La Punta de la Loma”.....	6
Figura 2. Esquema de las herramientas moleculares utilizadas para caracterizar la diversidad estructural y funcional de los microorganismos en el ambiente. Modificado de Rastogi y Sani (2011).....	12
Figura 3. Ubicación geográfica del sitio de recolección de <i>Ulva lactuca</i> (La Punta de la Loma). Modificado de Google Earth® (2013).....	18
Figura 4. Tronco en sector de “Punta de la Loma” del cual se recolectaron todas las muestras de <i>U. lactuca</i>	19
Figura 5. Recolección de los talos de <i>U. lactuca</i> a) Lavado con agua marina para remover macroorganismos y partículas adheridas. b) Almacenamiento en bolsas plásticas. c) Transporte refrigerado.....	20
Figura 6. Talo de <i>U. lactuca</i> . Modificado de Pardo-Castro (2004).....	20
Figura 7. Células vistas a nivel a) basal (cr: células rizoidales) 1000X, b) medio 400X y c) apical (p: pirenoides) 1000X, de una de las muestras identificada como <i>U. lactuca</i>	21
Figura 8. a) Cultivos de APS y VNSS en incubación y agitación constante. b) Sonicador.....	26
Figura 9. a) Siembra directa del talo sobre el agar. b) Siembra proveniente del raspado con el hisopo. A y B indican dos colonias.....	27
Figura 10. a) Medios APS con turbidez. b) Medios preparados para las diluciones. c) Siembra por triplicado en medios sólidos de las suspensiones celulares de cada dilución.....	27
Figura 11. Algunas de las diferentes cepas aisladas puras, sobre medios AVNSS o AM.....	28
Figura 12. a) Prueba positiva para actividad lipolítica. b) Prueba negativa.....	29
Figura 13. a) Prueba positiva (indicador) con medio AM + CMC al 0,5% y rojo congo. b) Prueba negativa.....	30
Figura 14. Comparación de una prueba positiva (pozos rojos) y negativa del método de azúcares reductores y el DNS.....	31

Figura 15. Placa de microtitulación de 96 pozos utilizada para el método de azúcares reductores con DNS y el ensayo con el sustrato MUG-β-D-glucopiranososa. Los números indican la cepa inoculada.....	32
Figura 16. a) Ejemplo de un microorganismo productor de sideróforos tipo catecol, b) tipo hidroxamato y c) tipo carboxilato. d) Control negativo. Modificado de Pérez-Miranda <i>et al.</i> (2007).....	34
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con el ADN aislado a partir de las 5 metodologías evaluadas. 1 y 2: Kit ZR 3 y 4 Longford <i>et al.</i> (2007) 5 y 6: Meusnier <i>et al.</i> (2001) 7: Burke <i>et al.</i> (2009) 8: Liu <i>et al.</i> (2011) 9: Control negativo (agua HPLC) 10: Marcador Hyperladder III.....	37
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con el ADN extraído a partir del kit ZR modificado. 1: Lisis durante 40 s 2: Lisis durante 90 s 3: Lisis durante 3 min (2 sesiones de 90 s con descanso de 5 min en hielo). 4: Marcador Hyperladder III.....	37
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con productos de la PCR de la región ADNr 16S. 1: Hyperladder III. 2, 3 y 4: Longford <i>et al.</i> (2007). 5, 6 y 7: Kit ZR modificado. 8, 9 y 10: Meusnier <i>et al.</i> (2001). 11: Burke <i>et al.</i> (2009). 12: Liu <i>et al.</i> (2011). 13: Control negativo (agua HPLC). 14: Control positivo (<i>Klebsiella</i> sp.).....	39
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con amplímeros obtenidos en la PCR del gen ribosomal 18S. 1: Kit ZR modificado. 2: Longford <i>et al.</i> (2007). 3: Meusnier <i>et al.</i> (2001). 4: Burke <i>et al.</i> (2009). 5: Liu <i>et al.</i> (2011). 6: Control negativo (agua HPLC). 7: Vacío. 8: Hyperladder III.....	40
Figura 21. Crecimiento de las bacterias en los diferentes tratamientos. Los indicadores muestran colonias con morfologías distintas, las cuales fueron escogidas para ser aisladas a) Tratamiento con vortex. b) Siembra directa del alga en el agar. c). Raspado de la superficie con hisopos.....	43
Figura 22. Aislamientos obtenidos utilizando medios de cultivo líquidos. Tratamiento con sonicación y siembra en AM (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) (a-c)	44
Figura 23. Ejemplo de 2 cepas que presentaron actividad lipolítica, representada por un halo transparente (a) Cepa no. 1, y por la formación de cristales (b) Cepa no. 15...	46
Figura 24. Producto final del ensayo con el método de azúcares reductores y DNS. (C: control positivo).....	48

Figura 25. Producto final de la prueba para lipasas con el sustrato MUG- β -D-glucopiranososa. Los pozos enmarcados corresponden a cepas con actividad positiva (C: control negativo).....**50**

Figura 26. Ejemplo de una cepa (no. 5) con halo de color amarillo tenue, indicando la presencia de sideróforos.....**51**

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Características generales (morfología gram y de las colonias) y tratamiento empleado para aislar las 31 cepas obtenidas de la superficie de <i>U. lactuca</i>	72
ANEXO B. Procedimiento de extracción de ADN propuesto por Meusnier <i>et al.</i> (2001).....	75
ANEXO C. Procedimiento de extracción de ADN empleando el kit <i>FastDNA® Spin Kit for soil</i> (BIO 101 Systems; Q Biogene) por Longford <i>et al.</i> (2007).....	76
ANEXO D. Procedimiento de la extracción de ADN propuesto por Burke <i>et al.</i> (2009).....	78
ANEXO E. Procedimiento de extracción de ADN empleado por Liu <i>et al.</i> (2011).....	80
ANEXO F. Procedimiento de extracción de ADN empleando el <i>ZR Soil Microbe DNA Micro Prep™</i> (Zymo Research).....	82
ANEXO G. Composición de los medios agar nueve sales –VNSS– (Egan <i>et al.</i> , 2001) y del agar marino 2215 Zobell Himedia®.....	83
ANEXO H. Resultados de las cepas que con potencial actividad lipolítica, celulolítica o producción de sideróforos.....	84
ANEXO I. Fotos de las 31 cepas aisladas.....	85

RESUMEN

Con el fin de obtener una metodología selectiva para la extracción de ADN de bacterias epífitas asociadas a la superficie de *Ulva lactuca* (Chlorophyta), se compararon 6 metodologías utilizadas en estudios previos con macroalgas marinas. De acuerdo con los resultados obtenidos, el kit para muestras de suelos *ZR Soil Microbe DNA MicroPrep™*, permitió la extracción de ADN de origen bacteriano (27,90 ng/μl), lo cual lo convierte en una opción aceptable para la extracción de ADN genómico, de cantidad suficiente para la realización de estudios metagenómicos posteriores. Por otro lado en este estudio, también se evaluó la actividad biológica (evidenciada por la síntesis de celulasas, lipasas, así como por la producción de sideróforos) de bacterias epífitas aisladas de *U. lactuca*. Se aislaron 31 cepas bacterianas, de las cuales 19 (61,29%) produjeron algún tipo de las biomoléculas evaluadas. Es de destacar que la bacteria identificada con el no. 22, fue la única que presentó actividad lipolítica, celulolítica y además produjo sideróforos, siendo entonces una cepa interesante para estudios posteriores que sean propuestos por el grupo de investigación.

Palabras clave: *Ulva lactuca*; Bacterias Epífitas; *Screening*; Lipasas; Celulasas Sideróforos; ADN Genómico; PCR; gen ADNr 16S.

ABSTRACT

In order to obtain a selective DNA extraction method from epiphytic bacteria surface-associated to *Ulva lactuca* (Chlorophyta), 6 DNA extraction protocols from previous studies targeting marine macroalgae, were compared. According to the obtained results, the *ZR Soil Microbe DNA MicroPrep™* kit allowed the selective extraction of bacterial DNA (27,90 ng/μl), making it an acceptable option for isolating high yield genomic DNA of the required quantity for subsequent metagenomic studies. Moreover, biological activity of the culturable epiphytic bacteria isolated from *U. lactuca* was also evaluated (evidenced by the lipase, cellulase and siderophore synthesis). Thirty-one bacterial strains were isolated, from which 19 (61,29%) produced some of the evaluated biomolecules. Distinguishable, the strain identified as no. 22 was the only one that showed lipolytic and cellulolytic activity, as well as siderophore production, making it an interesting bacterium for subsequent studies proposed by the research group.

Key words: *Ulva lactuca*; Epiphytic Bacteria; *Screening*; Lipases; Cellulases; Siderophores; Genomic DNA; PCR; 16S rDNA gene.

1. INTRODUCCIÓN

Las superficies vivas en ambientes acuáticos, se constituyen como un sustrato ideal para el establecimiento de microorganismos, al suministrar recursos tales como espacio para fijación y disponibilidad de nutrientes, entre otros (Cooksey y Wigglesworth-Cooksey, 1995). En este tipo de relación, el organismo que provee el sustrato y que se comporta como hospedero se denomina basibionte, mientras que los microorganismos huéspedes que se establecen y sobreviven en estas superficies se conocen como epibiontes; epizoos cuando están asociados a un animal y epífitos cuando lo están a una planta (Armstrong *et al.*, 2001; Wahl, 2009).

Dentro de los sustratos vivos disponibles para la colonización microbiana, las macroalgas marinas se destacan por presentar una superficie que permite el asentamiento de comunidades microbianas complejas (DeLong *et al.*, 1993; DeLong *et al.*, 2006; Burke, 2010). Se ha demostrado que las bacterias epífitas producen metabolitos secundarios que son utilizados por las macroalgas como mecanismo de defensa para prevenir el establecimiento de micro y macroorganismos colonizadores (Lemos *et al.*, 1985; Holmström *et al.*, 1992; Boyd *et al.*, 1998; *et al.* 1999; Egan *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2006). Las bacterias también producen vitaminas que las macroalgas son incapaces de sintetizar (Croft y Lawrence, 2005; Croft y Warren, 2006) y participan en el proceso de morfogénesis macroalgal, así como en el establecimiento de esporas de macroalgas en distintos sustratos de colonización (Nakanishi *et al.*, 1996; Matsuo *et al.*, 2005). Las bacterias por su parte, reciben del hospedero minerales y nutrientes, además de protección física y sustrato para su establecimiento y sobrevivencia (Thomas *et al.*, 2008; Burke, 2010).

Estos compuestos bioactivos producidos como resultado de la relación entre el basibionte macroalgal y las bacterias epífitas, son de gran interés biotecnológico por sus posibles aplicaciones en medicina o a nivel industrial. Es por esto que la asociación entre bacterias epífitas y macroalgas marinas ha sido estudiada mediante la implementación de diferentes metodologías (Lemos *et al.*, 1985; Boyd

et al., 1999; Meusnier *et al.*, 2001; Kanagasabhpathy *et al.*, 2006; Longford *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Persson *et al.*, 2011; Chandan-jain *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013). Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de análisis metagenómicos, es posible estudiar el conjunto de genomas que coexisten en un ambiente determinado sin necesidad de aislar y cultivar los microorganismos (Vakhlu *et al.*, 2012). Por consiguiente, con la metagenómica es posible evaluar primero, la estructura y composición de la comunidad bacteriana asociada al basibionte a través del análisis de secuencias y segundo, el potencial biotecnológico de esta asociación a través del análisis de genes que codifican para compuestos bioactivos (Kennedy *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2008; Chistoserdova, 2010; Simon y Rolf, 2011; Vakhlu *et al.*, 2012).

Un ejemplo de los análisis metagenómicos basados en secuencias, son los estudios de diversidad a partir de la amplificación y secuenciación del gen altamente conservado ADN ribosomal 16S (ADNr), los cuales permiten identificar los principales grupos de bacterias que componen una muestra ambiental (Malik *et al.*, 2008; Burke, 2010). Por otra parte, el análisis de producción de compuestos bioactivos, conocido también como análisis funcional, incluye técnicas conocidas como *screening* (tamizaje), las cuales detectan y evalúan la expresión de enzimas, así como de metabolitos sintetizados por microorganismos (Penesyan *et al.*, 2009; *et al.*, 2010). Gracias a estas metodologías ha sido posible encontrar un gran número de compuestos bioactivos de origen marino (Penesyan *et al.*, 2009).

Es importante tener en cuenta que, para llevar a cabo un estudio metagenómico de la comunidad de bacterias epífitas asociadas al basibionte algal, es necesario aislar ADN bacteriano de alta calidad (Burke *et al.*, 2009); lo que depende principalmente tanto del método extractivo, como del estado de la muestra fuente del material genético. La obtención de ADN óptimo para los análisis moleculares se dificulta en la medida en que las poblaciones de bacterias son parte de comunidades complejas que incluyen organismos eucariotas (*e. g.* larvas de invertebrados, hongos) y que están embebidas en una biopelícula o *biofilm* de exopolímeros sobre la superficie macroalgal. Esto implica que al extraer ADN bacteriano también se co-extrae el material genético del basibionte y de los

otros grupos que componen la comunidad, lo cual puede ser un problema especialmente para el análisis funcional. Por lo tanto, es importante asegurar que el material genético aislado provenga únicamente de bacterias epífitas, mediante procesos de remoción y lisis de las células bacterianas físicos y/o químicos, lo que permitirá explorar y reconocer los principales grupos procariotas, así como la capacidad potencial que estos tengan.

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios basados en la extracción del ADN, necesitan rigurosidad frente a la calidad, la cantidad y la procedencia de este material. Por lo tanto, es importante la aplicación de algún método que asegure que el material genético extraído se encuentre libre de contaminantes ambientales, más cuando proviene de una muestra directa del hábitat. También es fundamental que la cantidad de ADN aislado sea suficiente con el fin de ser utilizado en estudios de diversidad a través del gen altamente conservado ADNr 16S o en estudios con aplicación biotecnológica. Adicionalmente, es elemental que la metodología certifique que el ADN extraído provenga de los organismos de interés, más cuando se trata de bacterias que residen en una biopelícula sobre la superficie de una macroalga, lo que dificulta la remoción directa de las bacterias del hospedero eucariota (Priour *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2009). Por ende, la mayoría de técnicas de aislamiento resultan en la co-extracción del ADN del hospedero (*e. g.* secuencias provenientes del cloroplasto o mitocondrias) y de la comunidad bacteriana, dificultando el análisis en estudios metagenómicos posteriores (Burke *et al.*, 2009). Los microorganismos marinos, por otra parte, son productores reconocidos de una variedad de metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo de compuestos de interés en diversas industrias, cuyo estudio preliminar es aceptable a partir de la fracción cultivable a partir de métodos de tamizaje. Por las razones expuestas anteriormente, un trabajo que intente valorar la eficacia de diferentes métodos de extracción de ADN, complementado con técnicas como el tamizaje preliminar que permitan determinar la actividad de miembros del ensamblaje microbiano a estudiar, es una puerta que puede dar a conocer nuevos recursos a explorar, los cuales no solo permitan estudios más detallados sobre la composición, función y ecología de estos microorganismos, sino también hagan parte de la diversidad de productos naturales que se aprovechan actualmente gracias al enfoque biotecnológico.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. Biología y ecología de *Ulva lactuca* y sus bacterias epífitas

3.1.1. Generalidades de las clorófitas

Las algas verdes (Chlorophyta), son uno de los grupos más numerosos en las zonas templadas y tropicales (Littler *et al.*, 1989; Littler y Littler, 2000). Se reportan al menos 600 géneros con 10.000 especies aproximadamente, de las cuales el 90% son dulceacuícolas (Dawes, 1991; Pröschold y Leliaert, 2007), el 10% restante son especies marinas predominantemente tropicales, que se encuentran frecuentemente fijadas al sustrato en litorales rocosos, arenosos y fangosos (Littler y Littler, 2000) o flotando libremente (Hayden y Waaland, 2002). Se consideran como las antecesoras de las plantas vasculares (terrestres) ya que comparten los mismos pigmentos (*e. g.* clorofila *a*, *b* y carotenoides), algunos componentes de la pared celular (*e. g.* celulosa y pectina), así como el compuesto de reserva, el cual es principalmente almidón. Así mismo, de las características estructurales más relevantes, se destaca la presencia de cloroplastos de doble membrana con arreglo tilacoidal en forma de grana (Dawes, 1991; Lewis y McCourt, 2004; Pröschold y Leliaert, 2007).

En el grupo de las algas verdes se encuentra el género *Ulva*, el cual se caracteriza por ser cosmopolita y estar asociado frecuentemente a la zona intermareal, específicamente sobre un sustrato rocoso (Figura 1). Este asentamiento depende de las esporas macroalgales, que durante su reproducción vegetativa, se dispersan y establecen siguiendo señales químicas provenientes de una superficie adecuada, en donde sufren una serie de cambios morfológicos necesarios para crecer y desarrollarse (Callow y Callow, 2006).

3.1.2. *Ulva lactuca*

3.1.2.1. Clasificación taxonómica

El ordenamiento taxonómico se presenta según Littler *et al.* (1989), Littler y Littler (2000) y Ortega *et al.* (2001).

División Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

Orden Ulvales

Familia Ulvaceae

Género *Ulva* Linnaeus

Especie *U. lactuca* Linnaeus 1753



Figura 1. *Ulva* sp. adherida al sustrato del litoral rocoso de “La Punta de la Loma”.

Esta especie es lobulada, lanceolada de color verde oscuro (Figura 1). Se adhiere al sustrato por un disco córneo, formado por células rizoidales, del cual emergen una o varias láminas (Pardo y Solé, 2007). Puede tener un diámetro aproximado de 65 cm (Littler y Littler, 1989; Pardo-Castro, 2004; Pardo y Solé, 2007).

3.1.3. Interacción alga-bacteria

El área superficial de algunos organismos pueden servir de diversos nichos ecológicos para bacterias y otros microorganismos, según como varíen ciertas condiciones físicas tales como la tensión superficial, el grado de humectación (Taylor *et al.*, 1997), las fuerzas de van der Waals (Meseguer-Yebra *et al.*, 2004), la gravedad o la interacción electrostática, entre otros; y así dar paso a los cambios biológicos (Wahl, 2009; Potin, 2012). La colonización bacteriana es el resultado de la dinámica metabólica que favorece su establecimiento y proliferación, gracias a la formación de biopelículas, constituidas por comunidades sésiles adheridas a un sustrato que se incorporan en una matriz de polímeros extracelulares (polisacáridos, lípidos y proteínas) de alto peso molecular y que se comunican químicamente a través del proceso denominado quórum sensing (Shapiro, 1998; Dobretsov, 2008; Nagata, 2008; Jain y Bhosle, 2009; Decho *et al.*, 2010). El proceso de colonización de una superficie sólida sumergida por parte de diversos organismos se conoce como *biofouling*. Este fenómeno natural ocurre en tres etapas generales: la primera tiene que ver con la adsorción de moléculas orgánicas principalmente que condicionan la matriz, la segunda con la colonización microbiana por parte de bacterias, diatomeas y otros microorganismos (microfouling) y la tercera con el reclutamiento y desarrollo de larvas de invertebrados y esporas algales (macrofouling) (Lachnit *et al.*, 2009; Meseguer-Yebra *et al.*, 2004; Dobretsov, 2008; Briand, 2009; Wahl, 2009; Mieszkin *et al.*, 2013).

Una consecuencia de la interacción entre macroalgas y bacterias epífitas es la competencia por nutrientes, la cual puede desencadenar otros procesos como la inhibición del intercambio gaseoso, la producción de metabolitos secundarios e incluso la comunicación por quórum sensing (Meseguer-Yebra *et al.*, 2004; Tait *et al.*, 2005), los cuales pueden o no favorecer relaciones (específicas o generales) benéficas (de tipo mutualista o simbiótica), que pueden ser fuertes o débiles y directas o indirectas (Armstrong *et al.*, 2001; Munn, 2004; Wahl, 2009). De esta manera, el tipo de interacción dependerá de las ventajas y desventajas que se

presenten durante la asociación entre bacterias epífitas y el hospedero macroalgal, tal como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas potenciales de una asociación epibiótica para cada una de las partes (Modificado de Wahl, 2009).

Efectos benéficos posibles	Efectos perjudiciales posibles
<i>Para epibiontes o epífitos</i>	
Ganancia en sitio de asentamiento	Sustrato inestable
Expansión de sustrato	Aleloquímicos exudados por el basibionte
Nutrientes exudados del basibionte	Alto riesgo en el constante cambio de hábitat
Hidrodinámica favorable	Fatalidad compartida
Sustrato absorbente	
Irradiación favorable	
Transporte libre	
Resistencia de asociación	
<i>Para basibiontes</i>	
Camuflaje	Incremento en peso
Protección	Incremento en la fricción y el arrastre de los epibiontes
Nutrientes y vitaminas aportados por el epibionte/epífito	Aumenta probabilidad de daño mecánico y químico
Resistencia de asociación	Aumenta competencia por nutrientes con epibiontes
	Mayor susceptibilidad a ser predado
	Fatalidad compartida

Se ha descubierto además que uno de los estados del ciclo de vida de macroalgas del género *Ulva* sp., depende de la comunidad microbiana asociada a la superficie macroalgal (Tait *et al.*, 2005; Callow y Callow, 2006; Burke, 2010; Mieskin *et al.*, 2013). En este punto, Joint *et al.* (2002), demostraron que el asentamiento de las esporas sobre un sustrato colonizado por bacterias está relacionado con la comunicación célula-célula entre eucariotas y procariotas, gracias a que las acil-homoserin-lactonas (moléculas señal del quórum sensing) son reconocidas por las esporas de *Ulva* sp. (Tait *et al.*, 2005; Joint *et al.*, 2007;

Callow y Callow, 2006). Del mismo modo, Singh y colaboradores (2013), revelaron que las sustancias poliméricas extracelulares producidas por *Bacillus flexus* (GU592213), facilitan el asentamiento de esporas de *U. lactuca*, sobre un sustrato previamente colonizado por distintas poblaciones bacterianas.

3.2. Estudios realizados con bacterias epífitas de macroalgas marinas

Gran parte de la investigación enfocada al estudio de bacterias asociadas a macroalgas marinas se ha basado en análisis metagenómicos. Trabajos realizados con bacterias epífitas de *Delisea pulchra* y *Ulva australis* (Longford *et al.*, 2007), muestran que las comunidades bacterianas están principalmente representadas por los grupos *Alpha*, *Delta* y *Gammaproteobacteria*, mientras que en menor proporción se reportan los grupos *Actinobacteria*, *Planktomycetes* y *Bacteroidetes*. Para el caso de macroalgas de las especies *U. australis* y *U. lactuca*, se ha reportado la presencia de especies bacterianas tales como *Pseudoalteromonas tunicata* y *Roseobacter gallaeciensis*, las cuales al parecer, juegan un papel importante en la protección del hospedero en contra del establecimiento de otros microorganismos colonizadores (Longford *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2006; Burke, 2010). Por otra parte, Singh *et al.* (2013) detectaron la presencia de los géneros *Marinomonas* sp. y *Bacillus* sp. asociados a la superficie de *U. lactuca*, comprobando su actividad inductora, durante el proceso de morfogénesis de esta macroalga marina. En India, Chandan-jain y colaboradores (2013) aislaron bacterias de los géneros *Vibrio* sp. y *Exigobacterium* sp. asociados a la superficie de *U. lactuca*, los cuales al parecer también están involucrados en los mecanismos de regulación de la comunidad bacteriana que crece sobre la superficie macroalgal.

Con respecto a la extracción del ADN bacteriano en la cantidad y calidad requeridas para los estudios metagenómicos, se tienen reportes de protocolos que buscan la extracción rápida y específica de suficiente cantidad de ADN de diferentes fuentes, dentro de los que se registran muestras de suelo (Picard *et al.*, 1992; Malik *et al.*, 2008; Hirsch *et al.*, 2010), sedimentos marinos (Luna *et al.*,

2005; Kimes *et al.*, 2013), aguas profundas y pelágicas (DeLong *et al.*, 2006), macroalgas (Shivji *et al.*, 1992), bacterias epibiontes en esponjas (Ouyang *et al.*, 2009) y en copépodos (Brandt *et al.*, 2010), entre otros. Así mismo, existen algunos trabajos que buscan caracterizar la comunidad microbiana asociada a la superficie de macroalgas clorófitas y rodófitas (Fisher *et al.*, 1998; Longford *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2009; Burke, 2010; Goecke *et al.*, 2013), sin embargo; solo Burke *et al.* (2009) hacen énfasis en la importancia de emplear un método lo suficientemente selectivo, que evite la co-extracción de ADN proveniente de otros organismos eucariotas asociados, así como del hospedero macroalgal, lo que afecta el resultado de los estudios metagenómicos enfocados al estudio de bacterias epífitas debido a la contaminación de la muestra con ADN eucariota que dificulta los análisis posteriores.

Sin embargo, pese a las investigaciones previamente descritas, a nivel mundial son pocos los grupos de investigación enfocados al estudio de bacterias epífitas de macroalgas marinas. De la misma manera, para Colombia, no se encontraron reportes de estudios que describan las poblaciones de bacterias epífitas asociadas a macroalgas del género *Ulva* sp. presentes en litorales rocosos del Caribe Colombiano.

3.3. Importancia del ADN en la ecología microbiana

La ecología microbiana estudia el rol que cumplen los microorganismos en un ambiente, explicando sus interacciones con el mismo y con otros microorganismos que compartan el mismo nicho (Munn, 2004; Fani, 2006; Rastogi y Sani, 2011). Para entender las funciones y la diversidad de las comunidades microbianas, los avances que esta ciencia ha alcanzado, se han logrado mediante el desarrollo de métodos de aislamiento y cultivo de los microorganismos *in vitro* que tratan de simular las condiciones ambientales óptimas que favorezcan su crecimiento. Esto ha permitido caracterizar atributos morfológicos (*e. g.* estructura celular, carácter gram), metabólicos (*e. g.* rutas bioquímicas y sus compuestos derivados, remineralización de materia orgánica e inorgánica) y ecológicos como

las relaciones con otros organismos (Jain y Bhosle, 2009; Rastogi y Sani, 2011). Sin embargo, aún existen muchas especies bacterianas que no pueden ser cultivadas en laboratorio dada la interdependencia que tienen con otros microorganismos en el ambiente y/o por los requerimientos desconocidos para su desarrollo específico (Pace, 1996). Dado que la fracción cultivable que hasta el momento se ha investigado constituye menos del 1%, y más aún cuando solo entre el 0,001 y 0,01 % corresponde a microorganismos marinos (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz, 2002), la fuente principal de información de la mayoría de comunidades microbianas yace en la biología molecular.

La ecología, al encontrarse con los límites de la caracterización fenotípica tradicional de la microbiología, está estrechamente relacionada con estudios basados en la maquinaria molecular, mediante técnicas que evalúan huellas genéticas (*e. g.* RFLP, RAPD, DGGE), las cuales dependen típicamente de la amplificación de secuencias de alto interés (*e. g.* gen ADNr 16S en procariontes, 18S en eucariotas) a través de la PCR (Bej y Mahbubani, 1992; Munn, 2004; Luna *et al.*, 2005) y otras herramientas moleculares tal y como se ilustra en la Figura 2. Por lo tanto, el análisis directo de los genes y las biomoléculas presentes en una muestra ambiental, permite inferir sobre la diversidad filogenética, abundancia y la actividad funcional de las comunidades microbianas presentes en los diferentes ecosistemas (Somerville *et al.*, 1989; Munn, 2004; Danovaro *et al.*, 2006; Burke, 2010; Rastogi y Sani, 2011; Vakhlu *et al.*, 2012; Goecke *et al.*, 2013; Kimes *et al.*, 2013).

La aplicación de estas herramientas moleculares depende netamente del estado en que se encuentre el material genético, en términos de calidad y cantidad. Por lo tanto, la elección de un método selectivo de extracción debe tener en cuenta factores como la simplicidad, la reproducibilidad y la efectividad, entre otros (Burke *et al.*, 2009).

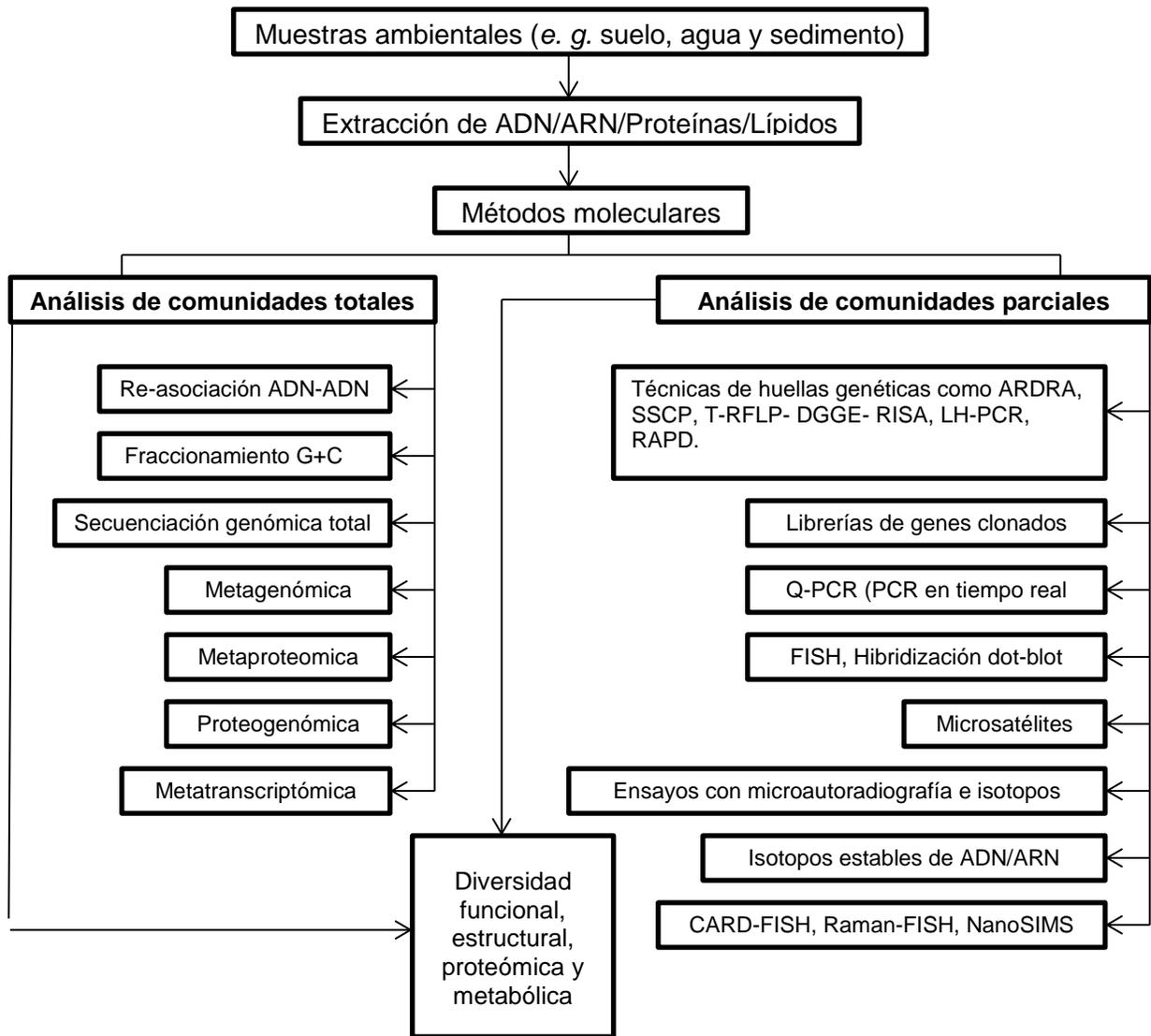


Figura 2. Esquema de las herramientas moleculares utilizadas para caracterizar la diversidad estructural y funcional de los microorganismos en el ambiente. Modificado de Rastogi y Sani (2011).

3.4. Actividad biológica de bacterias epífitas de macroalgas marinas

Una de las formas para evaluar la actividad de bacterias presentes en una determinada muestra ambiental, se basa en el aislamiento de enzimas u otros compuestos (e.g. antibióticos, bacteriocinas, sideróforos) que reflejan sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. Las comunidades han adquirido estos atributos, gracias a procesos adaptativos dependientes de la sinergia entre

factores ambientales que influyen sobre el nicho disponible en las superficies macroalgales (Kennedy *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2008; Odisi *et al.*, 2012).

Dentro de las enzimas producidas intra y extracelularmente (Patil *et al.*, 2011) por bacterias epífitas se encuentran las lipasas, las cuales son capaces de catalizar la hidrólisis de triacilgliceroles (cadenas con 10 o más átomos de carbono) para producir ácidos grasos, di, monoglicéridos y aceites como el glicerol; propiedades que le confieren una alta aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica y de detergentes (Sharma *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2011). Por otra parte, también se destacan las celulasas, enzimas especializadas en degradar un recurso abundante y renovable como la celulosa, razón por la que resultan ser fundamentales en procesos industriales tales como la remoción de desechos, así como en la síntesis de papel, textiles, alimentos y biocombustibles, entre muchos otros productos de alto valor agregado (Lynd *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2013; Penesyan *et al.*, 2009).

Además de la síntesis de enzimas, las bacterias también se caracterizan por producir sideróforos, los cuales son moléculas orgánicas capaces de secuestrar el hierro en su forma férrica (Fe^{+3}) del medio circundante y transportarlo hacia la célula, gracias a que poseen cadenas laterales y grupos funcionales con alta afinidad por este elemento, permitiéndoles actuar como quelantes. Esta función es importante para la sobrevivencia bacteriana, debido a que casi el 99 % del hierro disuelto en el agua se encuentra unido a compuestos orgánicos, y por ende se presenta en muy bajas concentraciones en el ambiente marino (Winkelmann, 2002; Munn, 2004). Adicionalmente, el hierro es esencial en la consolidación estructural celular ya que es cofactor de numerosas enzimas (complejo de nitrogenasas) y proteínas (citocromos) involucradas en procesos biológicos tales como la producción de ATP, la síntesis de ADN, el transporte de oxígeno, la fijación de nitrógeno, además de los procesos de respiración, fotosíntesis (Greenshields *et al.*, 2007) y en la formación de biopelículas y las interacciones que allí suceden (Simões *et al.*, 2007). Actualmente, los sideróforos son importantes en procesos de biorremediación en ambientes contaminados con metales pesados o hidrocarburos, también se conoce que ejercen cierto control

sobre bacterias patógenas en peces (Marques *et al.*, 2012), y además presentan importantes aplicaciones a nivel médico, particularmente en investigaciones relacionadas con sideromicinas (Nagoba y Vedpathak, 2011). Es por esto que se han desarrollado métodos para su detección a través de la implementación de procedimientos sencillos y reproducibles a nivel de laboratorio (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

4.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Colombia posee dos mares (Caribe y Pacífico), que albergan una gran diversidad de microorganismos, de la cual un porcentaje importante se encuentra asociado a superficies vivas. Las macroalgas presentan superficies de alta complejidad debido a sus características morfológicas y a que son ambientes ricos en nutrientes, razón por la que albergan un gran número de bacterias epífitas (Egan *et al.*, 2000). La importancia de estas bacterias radica en que influyen en diversos procesos de las macroalgas, a través de la producción de metabolitos secundarios y la síntesis de enzimas que participan en los procesos macroalgales. Sin embargo, a pesar del potencial de estos microorganismos y sus productos, a nivel mundial, son pocos los grupos de investigación dedicados a su estudio (Yan *et al.*, 2002). A nivel nacional, aún no se encuentran reportes que registren la diversidad microbiana asociada a macroalgas del género *Ulva* presentes en el Caribe colombiano, por lo tanto los genomas allí presentes se consideran como posibles fuentes de nuevos compuestos de interés en investigaciones encaminadas a la bioprospección marina (Srivastava *et al.*, 2013). Para acceder a esas fuentes es necesario obtener un método que permita extraer ADN bacteriano de la calidad requerida, de lo contrario, la construcción de librerías y su posterior análisis podrían errar en sus conclusiones. Por tal motivo esta propuesta se centra en validar una metodología selectiva a partir de protocolos estandarizados para la extracción de ADN de bacterias epífitas de *Ulva lactuca*, que por su calidad pueda ser utilizado en estudios metagenómicos posteriores. Adicionalmente, como un *screening* preliminar de la actividad biológica de las bacterias epífitas cultivables, se pretende evaluar su actividad lipolítica, celulolítica y la producción de sideróforos. De esta forma se puede contribuir al conocimiento de la biodiversidad marina, encontrando fuentes potenciales de compuestos bioactivos y enzimas en el Caribe colombiano de fácil acceso, que puedan ser aprovechables a nivel biotecnológico.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener una metodología selectiva para la extracción de ADN de calidad para su utilización en análisis metagenómicos y evaluar el aislamiento así como la actividad biológica (actividad lipolítica, celulolítica y producción de sideróforos) de bacterias epífitas cultivables asociadas a macroalgas de la especie *Ulva lactuca* presentes en el litoral rocoso de “La Punta de la Loma”, Santa Marta.

4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Validar una metodología de extracción selectiva de ADN bacteriano aislado de la superficie de *Ulva lactuca*, a través de la comparación de diferentes protocolos establecidos para bacterias epífitas de macroalgas marinas.

- b) Realizar un tamizaje funcional de lipasas, celulasas y sideróforos en bacterias cultivables asociadas a *Ulva lactuca*.

5. HIPÓTESIS

- La comparación de las seis metodologías de extracción evaluadas, permitirá obtener un protocolo para el aislamiento de ADN de bacterias epífitas que pueda ser utilizado en análisis metagenómicos posteriores.
- Las superficies macroalgales son colonizadas por bacterias que presentan las características necesarias para el funcionamiento de la comunidad epifítica. Debido a esta diversidad funcional, se espera encontrar actividad lipolítica, celulolítica y/o presencia de sideróforos en bacterias cultivables aisladas de la superficie de macroalgas de la especie *Ulva lactuca*.

6. METODOLOGÍA

6.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de macroalgas provienen del litoral rocoso de “La Punta de la Loma”, localizado en el sector del Aeropuerto Simón Bolívar de la ciudad de Santa Marta, entre las coordenadas 11° 07' 30,86" N y 74° 13' 59,02" W (Figura 3). En esta zona, el sustrato está compuesto principalmente por esqueletos calcáreos coralinos y raíces de mangle litificadas, que conforman el litoral sobre una plataforma principalmente arenosa. En general, la dinámica temporal de la comunidad macroalgal, presenta dos períodos de abundancia anuales; uno entre enero y abril y el segundo entre agosto y octubre (García y Díaz-Pulido, 2006). Esta dinámica al parecer se presenta como consecuencia del régimen climático del departamento del Magdalena –época seca y lluviosa– (Franco, 2005). En cuanto a la presencia de macroalgas en el sitio de muestreo, García y Díaz-Pulido (2006), después de realizar un monitoreo durante tres años en “La Punta de la Loma”, reportan que las macroalgas del género *Ulva* son de las más abundantes y frecuentes (40 – 60%), durante las dos épocas climáticas previamente descritas.

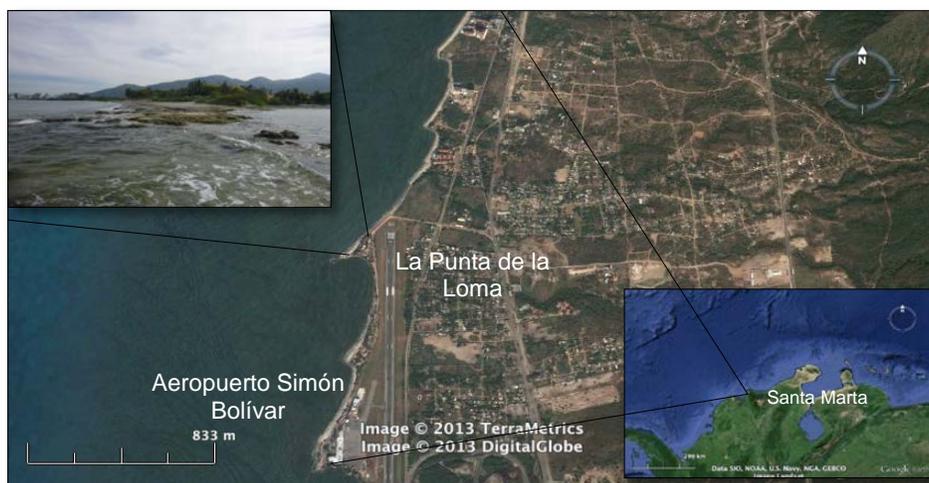


Figura 3. Ubicación geográfica del sitio de recolección de *Ulva lactuca* (La Punta de la Loma). Modificado de Google Earth® (2013).

6.2. DISEÑO MUESTREAL

6.2.1. Fase de campo

La colecta fue realizada el 9 de febrero entre las 8:00 y 10:00 a. m. Luego de realizar un recorrido a lo largo de la playa, se buscó un sitio en el cual se observara la presencia de macroalgas del género *Ulva*. Particularmente, se encontró un tronco asentado sobre la franja intermareal cuya corteza estaba colonizada por lo que a simple vista parecía ser *U. lactuca* (Figura 4). Esto se confirmó luego de observar cortes correspondientes a diferentes zonas macroalgales cuyas características fueron comparadas con las descritas para esta especie en particular.



Figura 4. Tronco en sector de “Punta de la Loma” del cual se recolectaron todas las muestras de *U. lactuca*.

Se recolectaron talos completos, los cuales se almacenaron con agua de mar en bolsas de plástico estériles (Figura 5a y b) y se transportaron en condiciones de refrigeración (Figura 5c) hasta su llegada al laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional - Sede Bogotá (IBUN). Las muestras obtenidas se procesaron en el mismo día de la colecta, tanto para la extracción de ADN bacteriano, como para el aislamiento y cultivo de bacterias

epífitas asociadas a *U. lactuca*. Éstas se sometieron a lavados sucesivos con agua de mar estéril, con el fin de remover los organismos macroscópicos y otras partículas asociadas que no eran de interés para el estudio. Las muestras destinadas a la extracción de ADN fueron almacenadas a -80°C hasta su uso, mientras que las macroalgas colectadas para el aislamiento de bacterias epífitas fueron procesadas el mismo día del muestreo.



Figura 5. Recolección de los talos de *U. lactuca* **a)** Lavado con agua marina para remover macroorganismos y partículas adheridas. **b)** Almacenamiento en bolsas plásticas. **c)** Transporte refrigerado.

6.2.1.1. Reconocimiento de *U. lactuca*

Se escogieron aquellos talos delgados cuya forma presentara un aspecto de lechuga frondosa de color verde brillante u oscuro con margen ondulada (Figura 6), las cuales se encontraran adheridas en un único punto al sustrato, del cual emergen una o varias láminas (Littler y Littler 1989; Pardo y Solé, 2007).



Figura 6. Talo de *U. lactuca*. Modificado de Pardo-Castro (2004).

6.2.2. Fase de laboratorio

6.2.2.1. Reconocimiento microscópico de *U. lactuca*

Se observaron cortes de la zona basal, media y apical de las hojas de algunas macroalgas colectadas, de esta manera se compararon las características de las células con la registradas para la especie *U. lactuca*, las fotografías de los cortes realizados aparecen en la Figura 7, en la cual se señalan características particulares de la especie.

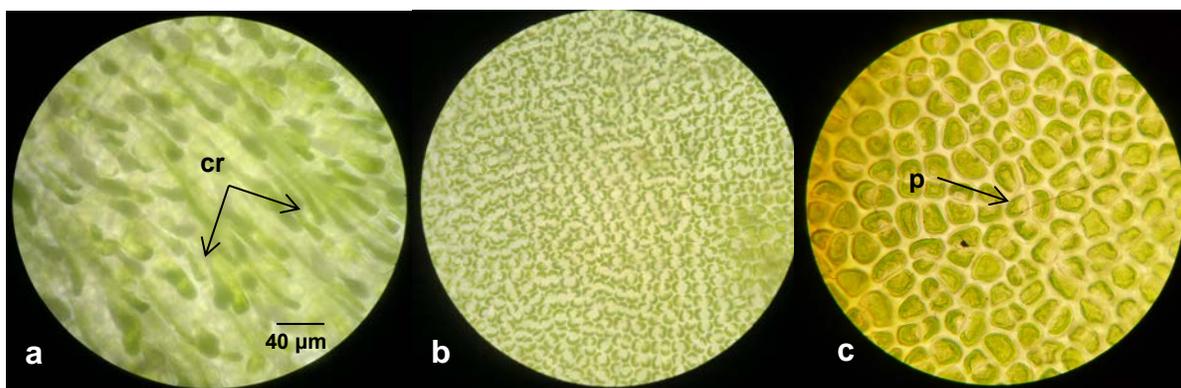


Figura 7. Células vistas a nivel **a)** basal (cr: células rizoidales) 1000X, **b)** medio 400X y **c)** apical (p: pirenoides) 1000X, de una de las muestras identificada como *U. lactuca*.

6.2.2.2. Obtención de una metodología selectiva para la extracción de ADN de bacterias epífitas de *U. lactuca*

Con el fin de obtener ADN de bacterias epífitas de *U. lactuca*, se emplearon protocolos utilizados en estudios previos con macroalgas del género *Ulva* (Meusnier *et al.*, 2001; Longford *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2009 y Liu *et al.*, 2011). Se utilizó además un kit de extracción de suelos comercializado con el nombre ZR Soil Microbe DNA MicroPrep™ por Zymo Research, el cual está recomendado para la extracción de ADN de muestras ambientales.

Antes de la extracción de ADN por cualquiera de estas metodologías excepto Meusnier *et al.* (2001), el tejido algal almacenado a -80°C fue colocado en buffer de lisis y/o con perlas de sílice o de vidrio y posteriormente se sometió a vortex donde las células procariotas fueron desprendidas de la superficie algal y lisadas para liberar el ADN dañando de forma mínima las células eucariotas del alga. Este paso en el protocolo, es el que favorece la presencia de ADN procariota sobre el ADN eucariota en la muestra de ADN aislado. En el procedimiento de Longford *et al.* (2007), la muestra algal se introduce en tubos específicos que contienen perlas de sílice, junto con el buffer de lisis y se centrifuga. El kit ZR, incluye un buffer específico de lisis y perlas de sílice pero somete la muestra algal al *bead beating*. En el caso de Burke *et al.* (2009), el alga se expone a ondas de ultrasonido mientras que está sumergida en el buffer de lisis. Finalmente, en el método de Liu *et al.* (2011), el alga choca continuamente contra perlas de vidrio en agua de mar estéril. Las suspensiones que se obtienen con estos procesos en cada protocolo, son las que se utilizan durante la extracción. En el caso del protocolo de Meusnier *et al.* (2001), el alga se macera suavemente antes de la lisis celular por lo tanto existe la probabilidad de que se libere en este proceso de extracción una mayor cantidad de ADN eucariota que en las otras metodologías.

En la Tabla 2, se describen las etapas y los reactivos que utilizan las metodologías antes mencionadas durante la extracción. Brevemente, las diferencias entre los protocolos tienen que ver con el almacenamiento de la muestra, el tipo de lisis celular (química o física) la composición de los buffers de precipitación y purificación del ADN o el uso enzimas específicas (RNAsas). Con respecto a los kits de extracción rápida (Longford *et al.* 2007 y kit ZR), el primero difiere en que utiliza SDS como denaturante orgánico y, hacia el final de la extracción, el ADN es purificado promoviendo su unión a una matriz de sílica líquida. El kit ZR, al contrario, no emplea denaturantes orgánicos y, durante la mayor parte de la extracción, el ADN permanece adherido a una matriz de sílica sólida. La composición de las soluciones se describen en los anexos (B, D y E), a excepción de aquellas en los kits de extracción rápida. Es importante mencionar que, el kit ZR modificado representa una metodología distinta cuya

implementación se explica en los resultados. En este procedimiento, se utilizaron distintos tiempo de lisis en el *bead beater*, sometiendo las muestras a sesiones de 40 s, 90 s y 3 min (dividido en 2 sesiones de 90 s, con un intervalo de 5 min en hielo) a máxima velocidad. En el caso del protocolo de Burke *et al.* (2009) – Anexo D – se lleva a cabo una metodología estandarizada que emplea un reactivo especial (Limpiador multi-enzimático rápido 3M™, Sydney, NSW, Australia), el cual ya no se encuentra disponible en el mercado. Para compensar su ausencia durante el procesamiento, se optó por implementar un paso de sonicación justo después de agregar el buffer de extracción. En esta parte, el desprendimiento celular fue realizado con un sonicador de vástago durante 2 min en sesiones de 20 s, con descansos de 20 s.

Los productos de extracción se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 0,8 % en buffer TBE 1X, corriéndose a 80 V entre 60 a 90 min, dependiendo el avance de las bandas. Para visualizar las bandas de ADN mediante luz UV, se agregó 0,5 µl de *SYBR® Safegel stain* (Life Technologies) a todos los geles.

Finalmente, la concentración de ADN de cada muestra obtenida a partir de los protocolos realizados fue determinada mediante el cuantificador *Qubit® Fluorometric Quantitation* y el *dsDNA HS Assay Kit* (0,2 – 100 ng).

Tabla 2. Diferencias generales de las etapas de extracción de ADN en cada protocolo a evaluar.

Referencia	Preservación y cantidad de la muestra macroalgal	Kit de extracción rápida	ETAPAS DE LA EXTRACCIÓN						Reactivos y pasos adicionales/modificaciones
			Lisis celular	Remoción de proteínas	Purificación del ADN			Eliminación de ARN	
					Precipitación del ADN	Lavado del pellet	Recuperación		
Meusnier <i>et al.</i> (2001)	0,01 – 0,105 g; en sílica gel	No	Química (SDS)	Buffer de extracción, desnaturalización a 65 °C y acetato de potasio	Isopropanol	Buffer TE	Isopropanol	-	β-mercaptoetanol (antioxidante) Filtración previa a la etapa de precipitación
Longford <i>et al.</i> (2007)	0,5 mg; congelación	Si (FastDNA Spin kit for Soil)	Química (Lysing Matrix E y SDS)	Solución de precipitación de proteínas (PPS)	Suspensión de Matriz asociada (<i>Binding Matrix suspension</i>) y solución SEWS-M			-	-
Burke <i>et al.</i> (2009)	20 g; refrigeración	No	Química (Agua marina artificial libre de Ca y Mg - CMFSW-)	-	Fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1, acetato de sodio y etanol 70 %)		Agua desionizada estéril	RNAsa	-
Liu <i>et al.</i> (2011)	50 g; refrigeración	No	Química (Buffer STE y SDS 1%) y física (perlas de vidrio)	-	Fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), acetato de sodio y etanol absoluto frío etanol 70 %		Agua estéril	-	Muestra pre-filtrada (PFs Millipore 3,0 y 0,2 μm diámetro de poro)
Kit ZR	0,25 g	Si	Química (<i>Lysis solution</i>) y física (<i>bead beater</i>)	Incluido en las soluciones de purificación	Matriz (sílice) de unión al ADN – <i>Soil DNA Binding Buffer</i>	Matriz (sílice) – <i>Soil DNA Pre-Wash Buffer</i> y <i>Wash Buffer</i>	Matriz (sílice) – <i>DNA Elution Buffer</i>	-	-
Kit ZR modificado	0,25	Si	Química (<i>Lysis solution</i>) y física (<i>bead beater</i>)	Incluido en las soluciones de purificación	Matriz (sílice) de unión al ADN – <i>Soil DNA Binding Buffer</i>	Matriz (sílice) – <i>Soil DNA Pre-Wash Buffer</i> y <i>Wash Buffer</i>	Matriz (sílice) – <i>DNA Elution Buffer</i>	-	Tiempo de lisis en el <i>bead beater</i> (40, 90 y 180 s)

6.2.2.3. Análisis de calidad del ADN obtenido en las metodologías evaluadas

El ADN extraído de las bacterias epífitas de *U. lactuca* fueron analizadas por PCR con el fin de evaluar la calidad del material genético obtenido. Para esto se amplificó el gen ADNr 16S empleando los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCCTGTTACGACTT-3'), utilizados por Burke *et al.* (2009). Las reacciones para la PCR estuvieron compuestas por: 0,25 µM de ambos primers (27F y 1492R), 0,5 mM de dNTPs, buffer de reacción 1x, 0,4 unidades de Taq polimerasa, 5 mM de MgCl₂ y ADN (50 ng) en un volumen de reacción de 20 µl. Para esta amplificación, las secuencias fueron inicialmente denaturadas a 94 °C por 4 min, luego se realizaron 30 ciclos (denaturación por 30 s a 94 °C, alineamiento por 1 min a 50 °C y elongación durante 3 min a 72 °C), con una extensión final de 6 min a 72 °C (Burke *et al.*, 2009).

Los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, observando la presencia de bandas correspondientes a un tamaño de 1500 pb, utilizando el marcador molecular Hyperladder III™ de Bionline.

Adicionalmente con el fin de identificar la presencia de ADN eucariota en las muestras obtenidas a partir de las metodologías utilizadas, se amplificó el gen ADNr 18S empleando los iniciadores EK1F (5' -CTGGTTGATCCTGCCAG- 3') y 18Sr-b (5' -GATCCTTCYGCAGGTTACCTA- 3'), utilizando las mismas condiciones de amplificación de la región ADNr 16S (Burke *et al.*, 2009).

6.2.2.4. Aislamiento de bacterias epífitas de *U. lactuca*

Con el fin de promover la separación de las bacterias epífitas de la superficie macroalgal y de esta manera facilitar su aislamiento, se realizaron ensayos con diferentes medios de cultivo, y distintos mecanismos de remoción. Los medios de cultivo líquidos utilizados fueron agua peptonada salina -APS-, caldo marino -CM- y solución de nueve sales -VNSS- (Egan *et al.*, 2001), mientras que los sólidos fueron agar marino –AM 2216 Zobell Himedia®- y agar de nueve sales -AVNSS-. Para promover la separación de las bacterias epífitas, se utilizaron dos mecanismos uno de agitación continua y otro que se basó en la aplicación de ondas de ultrasonido (mediante el empleo de sonicación).

En el método de agitación continua, se dispuso la porción del talo macroalgal en 100 ml de APS y VNSS a 200 r.p.m y una temperatura de 25°C, durante 40 min, (Figura 8a). Una vez se realizó el desprendimiento celular, 100 µl fueron sembrados por duplicado en AM y AVNSS. Para el método con ondas de ultrasonido, se montaron cultivos líquidos de APS tal como se describió anteriormente, pero en vez de agitación, se sonicaron durante 15 min (Figura 8b) (Menezes *et al.*, 2010).

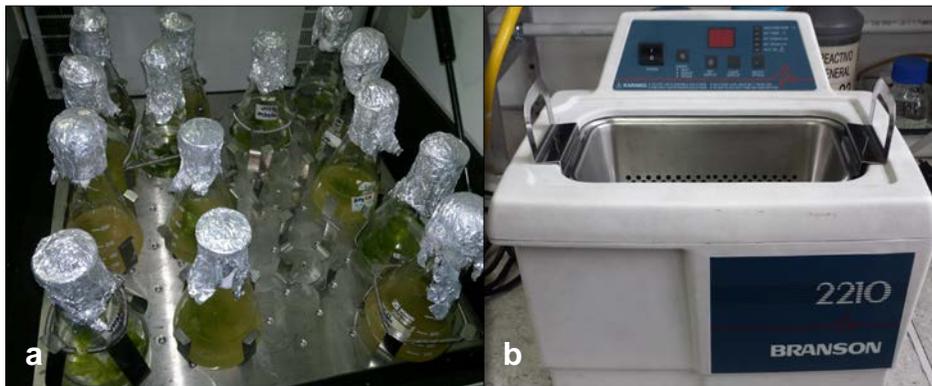


Figura 8. a) Cultivos de APS y VNSS en incubación y agitación constante. **b)** Sonicador.

De la misma manera, se realizaron siembras directas ubicando entre 0,5 y 1 g del talo sobre el medio sólido -AM, VNSS- (Figura 9a), además de un raspado de la superficie macroalgal con ayuda de un hisopo estéril, el cual fue luego inoculado en el medio sólido correspondiente (Figura 9b).

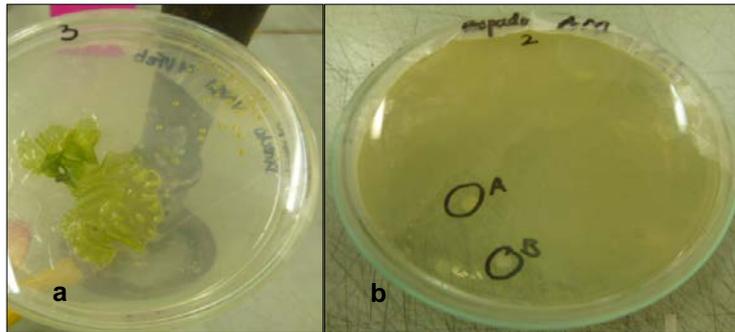


Figura 9. a) Siembra directa del talo sobre el agar. **b)** Siembra proveniente del raspado con el hisopo. A y B indican dos colonias.

Paralelamente, se cultivaron talos (entre 0,5 y 1 g) en los medios APS, CM y VNSS, a 25°C durante un tiempo de incubación que osciló entre 48 y 72 h aproximadamente, hasta observar crecimiento evidenciado por la aparición de turbidez en el medio de cultivo (Figura 10a). Transcurrido el tiempo de incubación, se llevaron a cabo 3 diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), a partir de las cuales realizaron siembras en cajas de Petri con AM (Figura 10b y c). Estas placas fueron incubadas a 25°C, hasta observar crecimiento (Figura 10c).



Figura 10. a) Medios APS con turbidez. **b)** Medios preparados para las diluciones. **c)** Siembra por triplicado en medios sólidos de las suspensiones celulares de cada dilución.

Con las colonias obtenidas en todos los ensayos realizados, se llevaron a cabo pases sucesivos en AM, con el fin de conseguir cultivos bacterianos puros (Figura 11).



Figura 11. Algunas de las diferentes cepas aisladas puras, sobre medios AVNSS o AM.

6.2.2.5. Tamizaje funcional (*Screening*) de lipasas, celulasas y sideróforos sintetizados por bacterias epífitas de *U. lactuca*

Con las cepas aisladas, se realizaron ensayos con el fin de identificar actividad lipolítica y celulolítica, así como la producción de sideróforos. El fundamento básico de estos procedimientos radica en el cambio fenotípico, como consecuencia de la reacción –ya sea de asimilación o degradación– entre las enzimas de interés y el sustrato específico, o entre los sideróforos y el metal que secuestra del medio, el cual causa igualmente un cambio fenotípico (Beisson *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004).

6.2.2.5.1. Tamizaje de lipasas

La actividad lipolítica de las bacterias epífitas se evaluó utilizando como medio de cultivo AM suplementado con Tween 80 (monoéster de ácido oleico del polioxietilen-sorbitano) al 0.5% (concentración final), el cual es uno de los compuestos más utilizados para detectar este tipo de actividades en medios sólidos (Plou *et al.*, 1998). Las lipasas, en presencia del Tween 80, catalizan su

hidrólisis liberando ácidos grasos a partir del sustrato. Estos productos forman sales con cationes divalentes como el calcio (Ca^{+2}), el cual es uno de los componentes del medio de cultivo AM, y se manifiestan mediante la aparición de pequeños cristales (Falero, 2013). También es posible observar una clarificación alrededor de la colonia con capacidad lipolítica, la cual ocurre porque los numerosos ácidos grasos hidrolizados (*i. e.* de tamaño corto y emulsificados), disminuyen la difusión de la luz a través del medio, causando así los halos claros (Beisson *et al.*, 2000).

Las bacterias fueron inoculadas e incubadas a 25°C, hasta observar crecimiento (de 3 a 8 días). Aquellas cepas con posible actividad se evidenciaron al observar zonas claras (Figura 12a), así como la formación de pequeños cristales alrededor de la colonia, características que indican la hidrólisis del polisorbato.

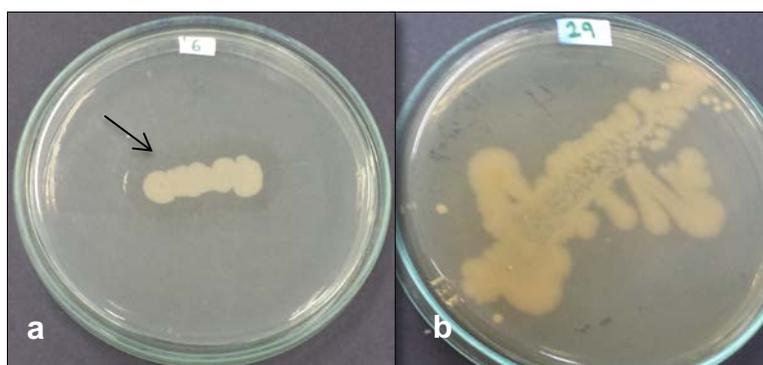


Figura 12. a) Prueba positiva para actividad lipolítica. **b)** Prueba negativa.

6.2.2.5.2. Tamizaje de celulasas

Con el fin de identificar actividad celulolítica en bacterias epífitas de *U. lactuca*, se realizó un primer ensayo con rojo congo (Teather y Wood, 1982). Esta prueba se fundamenta en la unión del colorante a la celulosa, formando complejos entre los grupos hidroxilo del polisacárido y los grupos aminos del colorante, cuando la celulosa aún no ha sido hidrolizada. La hidrólisis a cargo de las

celulasas, fragmenta al polisacárido y por ende al complejo con el rojo congo, liberando así el colorante y produciendo los halos incoloros.

Para ello, se sembraron las cepas aisladas en AM y AVNNS suplementados con carboximetil celulosa (CMC) al 0,5% (concentración final), para luego ser incubadas a 25 °C hasta observar crecimiento (de 3 a 8 días). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a agregar sobre las colonias, una solución de rojo congo, la cual se dejó sobre el agar por 15 min. Posteriormente, se removió esta solución, teniendo cuidado de no perder la integridad de las colonias, y se procedió a agregar NaCl 3 M, durante el mismo tiempo (Figura 13). De manera que las colonias con actividad celulolítica, se identifican por la formación de un halo transparente a su alrededor (Figura 13a).

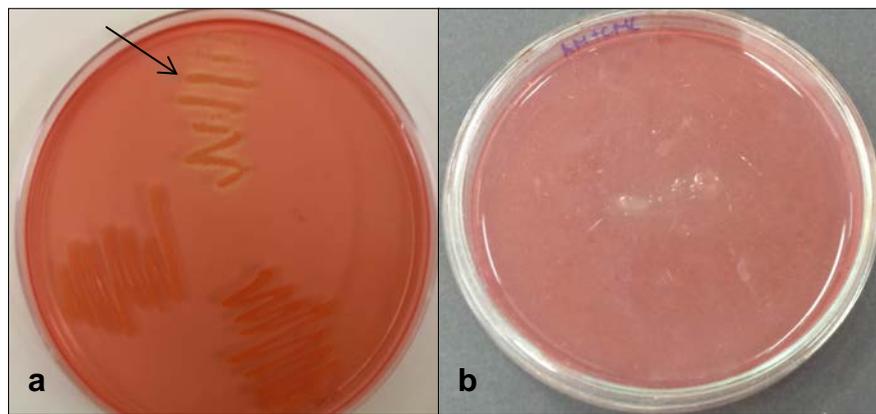


Figura 13. a) Prueba positiva (indicador) con medio AM + CMC al 0,5% y rojo congo. **b)** Prueba negativa.

La ejecución de la prueba anterior, presentó una dificultad con respecto a la integridad de las colonias, por lo que se realizó un segundo ensayo basado en el método de azúcares reductores y su detección colorimétrica al reaccionar con el ácido 3,5-dinitrosalicílico o DNS (Bello-Gil *et al.*, 2006). Este ensayo permite detectar la actividad celulolítica mediante la cantidad de azúcares reductores (*i. e.* glucosa) liberados al medio por la acción enzimática. Cuando se observa un viraje de color amarillo a rojo, esto significa que la prueba es positiva (Figura 14) por la presencia de azúcares reductores que a su vez indican la presencia de celulasas. Este cambio de color sucede porque la glucosa reduce el DNS –amarillo–

convirtiéndolo en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico –rojo– (Chose, 1987; Bello-Gil *et al.*, 2006).

Para el ensayo, los aislamientos bacterianos fueron inoculados en CM e incubados a 25°C con agitación constante (200 r.p.m.) durante 48 h. Transcurrido este tiempo, los cultivos obtenidos fueron centrifugados a 5.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C, con el fin de eliminar el pellet celular y obtener el sobrenadante del cultivo bacteriano. Posteriormente, se colocaron en tubos de ensayo 100 µl de cada uno de los sobrenadantes (por triplicado) junto con 200 µl de CMC al 0.5 % (concentración final). Los tubos con la mezcla se incubaron a 42 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se agregaron 300 µl de DNS y se incubó a 92°C por 10 min y luego en hielo durante el mismo tiempo. Finalmente, se tomaron 200 µl de cada uno de los tubos y se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pozos (Figura 15) y se leyeron a 540 nm.



Figura 14. Comparación de una prueba positiva (pozos rojos) y negativa (pozos amarillos del método de azúcares reductores y el DNS).

Finalmente, se realizó un tercer ensayo empleando un compuesto fluorogénico (4-Metilumbeliferil-MU) unido a un azúcar, llamado MU-β-D-glucopiranosido (MUG) a una concentración 0,2 mM, de acuerdo a la metodología propuesta por Odisi *et al.* (2012). Este sustrato, en presencia de celulasas, es hidrolizado liberando el compuesto MU del azúcar, el cual es responsable de emitir

fluorescencia a una longitud de onda de 312 nm, comprobando de tal manera la actividad enzimática.

Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación, en las cuales se colocaron 50 µl de sobrenadante del cultivo bacteriano (por triplicado) y 50 µl del sustrato a evaluar (Figura 15). Posteriormente las placas fueron incubadas durante 90 min a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se visualizó el producto la reacción, mediante la exposición de la placa a la luz ultravioleta, con resultados positivos para los pozos en los que se producía emisión de fluorescencia y negativos, en los que este fenómeno no se observaba.



Figura 15. Placa de microtitulación de 96 pozos utilizada para el método de azúcares reductores con DNS y el ensayo con el sustrato MUG-β-D-glucopiranososa. Los números indican la cepa inoculada. (C: control positivo).

6.2.2.5.3. Tamizaje de sideróforos producidos por bacterias aisladas de la superficie de *U. lactuca*

Para la detección de sideróforos en bacterias epífitas de *U. lactuca* se utilizó el método O-CAS (*Overlaid-Chrome Azurol S*) propuesto por Pérez-Miranda *et al.* (2007), el cual consiste en cubrir las placas de agar previamente inoculadas con 10 ml de solución CAS (60,5 mg de azul cromoazurol- S; 72,9 mg de bromuro de amonio hexadeciltrimetil HDTMA; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM en 10 ml de HCl 10 mM y agarosa 0,9% p/v). El fundamento de esta metodología radica en que el colorante azul cromoazurol-S (CAS), el detergente HDTMA y la solución de cloruro férrico, forman el complejo Fe-CAS-HDTMA, del cual el sideróforo secuestra el metal y por consiguiente causa la alteración del color del medio (Figura 16), con la formación de un halo característico de acuerdo al tipo de sideróforo producido.

Para el ensayo, las cepas aisladas fueron cultivadas por duplicado en AM a 25°C, la siembra se realizó colocando 2 puntos equidistantes sobre el agar. Una vez se observó crecimiento, se procedió a cubrir los cultivos bacterianos con la solución CAS, para luego incubarlos a 25°, hasta observar cambios en la coloración del medio (de 2-7 h). De esta manera, cambios de color en el medio de azul a púrpura, indicaban la presencia de sideróforos de tipo catecol (Figura 16a), así mismo variaciones de azul a naranja correspondían a sideróforos del tipo hidroxamato (Figura 16b). Finalmente, la aparición de una coloración amarilla clara en el medio de cultivo, fue registrada para sideróforos de tipo carboxilato (Figura 16c) (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

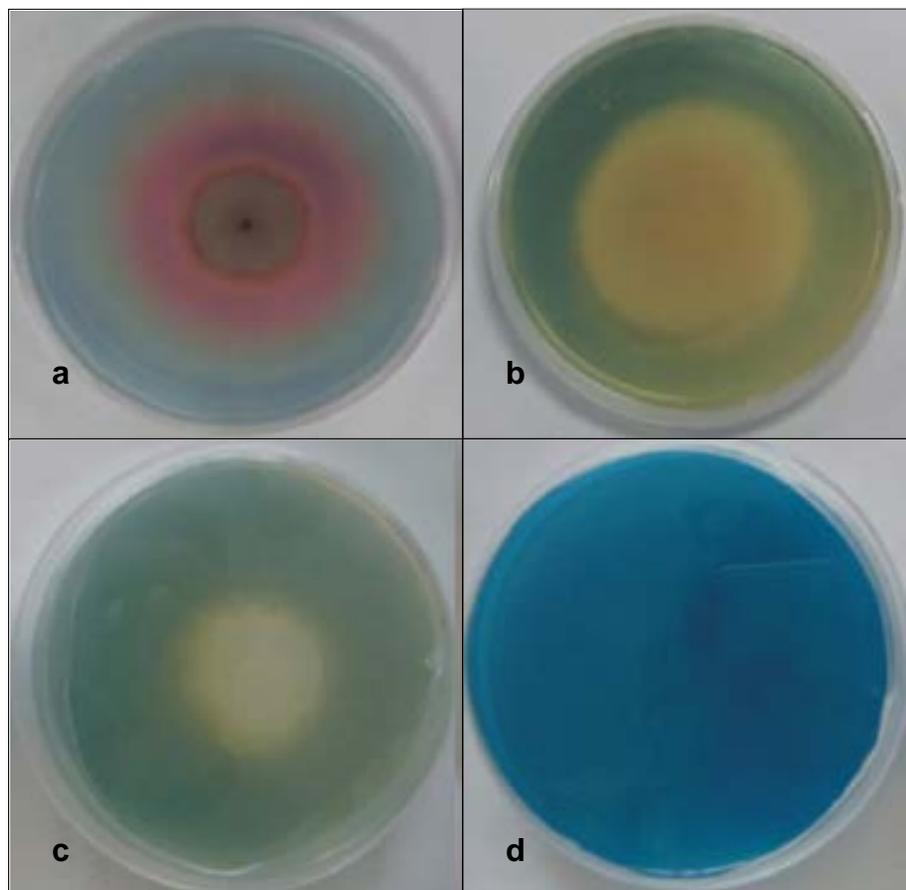


Figura 16. **a)** Ejemplo de un microorganismo productor de sideróforos tipo catecol, **b)** tipo hidroxamato, **c)** tipo carboxilato, **d)** control negativo. Modificado de Pérez-Miranda *et al.* (2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Obtención de una metodología selectiva para la extracción de ADN de bacterias epífitas de *U. lactuca*

Con el fin de obtener ADN de bacterias epífitas asociadas a *U. lactuca*, se emplearon protocolos estandarizados en estudios previos para macroalgas del género *Ulva* (Meusnier *et al.* 2001, Longford *et al.* 2007, Burke *et al.* 2009 y Liu *et al.* 2011), además de un kit utilizado para la extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de suelos (*ZR Soil Microbe DNA MicrobePrep*) y su modificación (Anexos B a F). Los cambios realizados en este kit se hicieron con el fin de mejorar la extracción, en términos de la cantidad.

La mayor cantidad de ADN se obtuvo con los protocolos del kit ZR modificado -27,90 ng/μl-, Meusnier *et al.* (2001) -21,70 ng/μl- y Longford *et al.*, (2007) -5.20 -ng/μl- a partir de las suspensiones obtenidas de la superficie de *U. lactuca*.

Tabla 3. Concentración promedio de ADN (ng/μl) obtenido para cada metodología evaluada.

Protocolo/Kit	Concentración de ADN (ng/μl)
Meusnier <i>et al.</i> (2001)	21,70
Longford <i>et al.</i> (2007) (Kit FastDNA Spin)	5,20
Burke <i>et al.</i> (2009)	1,66
Liu <i>et al.</i> (2011)	0,88
Kit ZR	4,78
Kit ZR modificado	27,90

La Figura 17 muestra los resultados del corrido electroforético de cada muestra obtenida con las metodologías mencionadas, excepto aquellas obtenidas con el kit ZR modificado, las cuales se exponen en la Figura 18. En primer lugar, se observan bandas delimitadas de ADN extraído por los protocolos de Longford *et al.* (2007) –carriles 3 y 4– y Meusnier *et al.* (2001) –carriles 5 y 6–, en contraste con el barrido o *smearing* que sufren las muestras extraídas con el kit ZR –carriles 1 y 2– (Figura 17) y el kit ZR modificado (Figura 18). Con respecto a este último, aunque es claro que la cantidad de ADN extraída aumenta considerablemente modificando los tiempos de lisis (Tabla 3), también lo hace la degradación del ácido nucleico.

En algunos estudios se ha demostrado que uno de los problemas de los métodos mecánicos de lisis, como el *bead beating*, es la ruptura del ADN genómico en fragmentos de menor tamaño con respecto a los que se obtienen con métodos de lisis química (Lloyd-Jones *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2004; Roh *et al.*, 2006; Fatima *et al.*, 2011). Esto es evidente por los barridos intensos que se observan en la Figura 18, en especial la muestra en el carril 3, la cual fue sometida a un mayor tiempo de lisis. Por lo tanto, con el kit ZR es posible obtener una cantidad de ADN considerable para análisis moleculares posteriores, sin embargo hay que buscar la forma de atenuar el efecto de la lisis mecánica de tal modo que la calidad del material genético no sea afectada drásticamente.

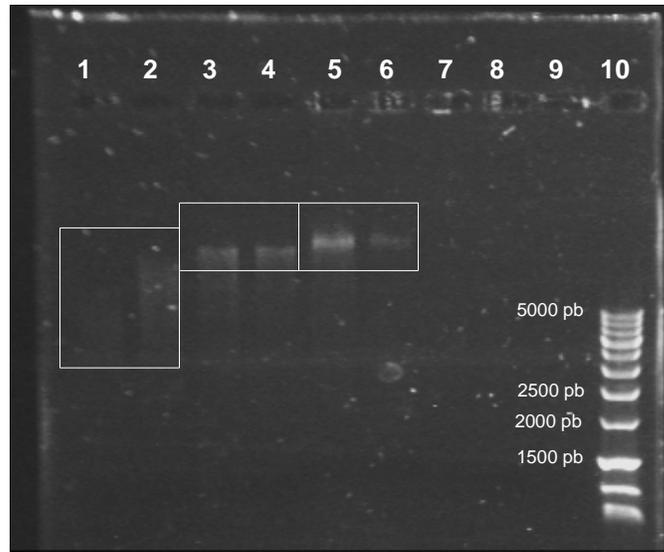


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con el ADN aislado a partir de las 5 metodologías evaluadas. **1 y 2:** Kit ZR **3 y 4** Longford *et al.* (2007) **5 y 6:** Meusnier *et al.* (2001) **7:** Burke *et al.* (2009) **8:** Liu *et al.* (2011) **9:** Control negativo (agua HPLC) **10:** Marcador Hyperladder III.

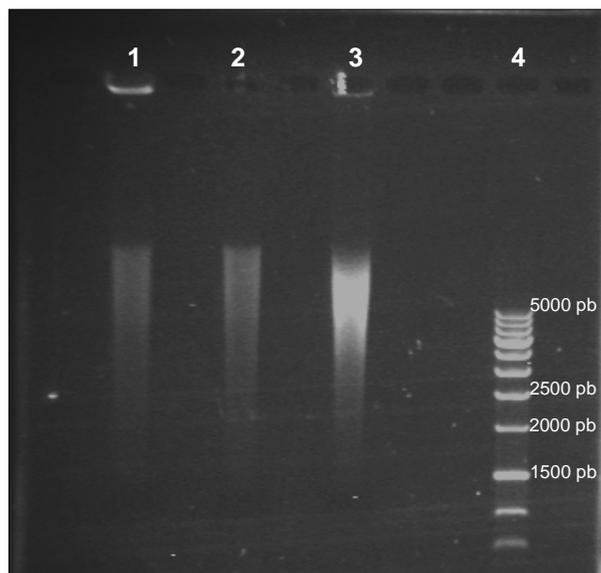


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con el ADN extraído a partir del kit ZR modificado. **1:** Lisis durante 40 s **2:** Lisis durante 90 s **3:** Lisis durante 3 min (2 sesiones de 90 s con descanso de 5 min en hielo). **4:** Marcador Hyperladder III.

En cuanto a los protocolos de Burke *et al.* (2009) y Liu *et al.* (2011), cuya implementación no favoreció la extracción de ADN de la superficie macroalgal (Figura 17), es posible que la forma de remoción de las células bacterianas asociadas a la superficie de *U. lactuca*, no haya sido la mejor. En el caso particular de la metodología propuesta por Burke *et al.* (2009), se piensa que la ausencia del limpiador multienzimático 3M™ en el buffer utilizado para desprender y lisar las bacterias asociadas a la superficie macroalgal, fue el factor principal que impidió la extracción de ADN de la superficie macroalgal. Si bien se emplearon métodos alternos (sonicación y agitación constante a 200 r.p.m, con el uso de perlas de vidrio) con el fin de desprender las células bacterianas de la superficie de *U. lactuca*, estos no funcionaron.

Por otra parte, en el caso de Liu *et al.* (2011), puede que la extracción no haya funcionado por el método físico de lisis el cual emplea perlas de vidrio. La agitación continua de estas perlas y su golpe contra el alga en un recipiente de volumen considerable (erlenmeyer de 1L), actúan con el mismo principio del *bead beating*. Sin embargo, el material de las perlas parece influir sobre la eficiencia del método de extracción, además del tamaño y el peso (Bowien y Dürre, 2003; Fujimoto *et al.*, 2004). Evidentemente, las perlas incluidas en los tubos de columna *Fast Spin* que emplean los kits rápidos de extracción (Longford *et al.* 2007 y kit ZR) son más pequeñas que las perlas de vidrio, atribuyéndoles una mayor relación superficie/unidad de masa, y por consiguiente una mayor frecuencia de choque contra las bacterias epífitas (Fujimoto *et al.*, 2004), ya sea promoviendo la lisis por centrifugación (tal y como se instruye en el kit empleado por Longford *et al.* 2007) o por *bead beating* (kit ZR). De modo que, así hayan empleado reactivos (Buffer STE – Anexo E) que usualmente funcionan para purificar, extraer y precipitar el ADN, si las bacterias epífitas permanecen adheridas a la biopelícula, y si su pared celular mantiene su integridad, entonces no habría acceso para extraer el material genético.

La comparación de las diferentes metodologías evaluadas en este trabajo permite destacar que, las técnicas elaboradas de extracción por columna *Fast Spin* (Longford *et al.* 2007 y kit ZR); que incluyen matrices de sílica (cargadas

positivamente en la superficie) con alta afinidad a la columna fosfatada (con carga negativa) del ADN mientras éste es purificado, junto con el uso de métodos de ruptura mecánica celular como el *bead beating* (Fujimoto *et al.*, 2014), pueden aumentar la eficacia de tal manera que se logra aislar mayores concentraciones de ADN, pero no siempre de la mejor calidad, por los resultados observados atribuidos al efecto del *bead beating*.

7.2. Análisis de calidad del ADN obtenido en las metodologías evaluadas

La amplificación del gen ADNr 16S se realizó con el producto de la extracción de los protocolos de Meusnier *et al.* 2001, Longford *et al.* 2007, Burke *et al.* 2009 y Liu *et al.* 2011 y kit ZR modificado. Los resultados (Figura 19) muestran que el único ADN que amplificó en la reacción de PCR fue aquel extraído con el kit ZR modificado.

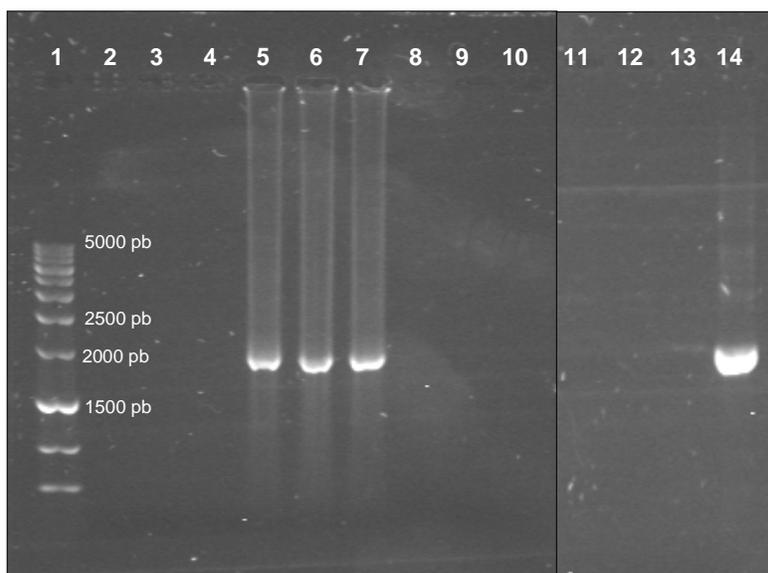


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con productos de la PCR de la región ADNr 16S. **1:** Hyperladder III. **2, 3 y 4:** Longford *et al.* (2007). **5, 6 y 7:** Kit ZR modificado. **8, 9 y 10:** Meusnier *et al.* (2001). **11:** Burke *et al.* (2009). **12:** Liu *et al.* (2011). **13:** Control negativo (agua HPLC). **14:** Control positivo (*Klebsiella* sp.).

La amplificación del gen ADNr 18S se realizó con el producto de la extracción de los protocolos de Meusnier *et al.* 2001, Longford *et al.* 2007, Burke *et al.* 2009 y Liu *et al.* 2011 y kit ZR modificado. La Figura 20 muestra que las únicas muestras de ADN que amplificaron para el gen ADNr 18S fueron los ADN extraídos con las metodologías de Longford *et al.* (2007) y Burke *et al.* (2009). Inesperadamente, el ADN extraído con el método del kit ZR modificado no amplificó para el gen ADNr 18S.



Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con amplicones obtenidos en la PCR del gen ADNr 18S. **1:** Kit ZR modificado. **2:** Longford *et al.* (2007). **3:** Meusnier *et al.* (2001). **4:** Burke *et al.* (2009). **5:** Liu *et al.* (2011). **6:** Control positivo (ADN de *Hevea brasiliensis*) **7:** Control negativo (agua HPLC). **8:** Hyperladder III.

De estos resultados, se resalta la señal tenue del producto de amplificación del ADN extraído con la metodología de Burke *et al.* (2009). Aunque la baja cantidad de ADN (1,66 ng/ μ l) aislado no se visualizó en la electroforesis (Figura 17), al parecer fue suficiente para amplificar el gen 18S. Burke *et al.* (2009), realizaron un análisis de contaminación eucariota con las muestras de ADN

extraídas de *U. australis*, amplificando el gen 18S. Este análisis resultó en un amplicon muy tenue a partir de una muestra de ADN con concentración de 0,5 ng, pero amplificó secuencias de la región 16S a partir de concentraciones más bajas de ADN (5×10^{-4} - 0,5 ng), resultados que no se duplicaron en el presente trabajo (Figura 19), probablemente debido a la ausencia del limpiador multienzimático en los reactivos de extracción.

En lo que concierne con el producto amplificado a partir del ADN obtenido con el kit ZR modificado (Figura 19) y con el método de Longford *et al.* (2007) (Figura 20), no es posible afirmar que estos kits sean selectivos para extraer ADN procariota o eucariota a pesar de que la muestra aislada con el kit ZR sólo amplificó la región 16S y la muestra aislada con el kit de Longford *et al.* (2007) sólo amplificó la región 18S. Según Mahmoudi *et al.* (2011), este tipo de kits están diseñados para extraer fácil y rápidamente ADN microbiano tanto procariota como eucariota a partir de muestras ambientales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden deberse a deficiencias en la estandarización de la reacción de PCR. Aunque los controles positivos amplificaron, quizá es necesario modificar la concentración de polimerasa o magnesio en las muestras para que este ADN procariota o eucariota amplifique. Ante esto, en un futuro es necesario asegurarse de que las condiciones de la reacción de PCR están estandarizadas de forma óptima para amplificar estos dos genes de origen procariota y eucariota (Ishii y Fukui, 2001; Hongoh *et al.*, 2003; Sipos *et al.*, 2007), de tal forma que cuando en la reacción de PCR no haya amplificación de la región ADNr 18S, se puede estar seguro de que se debe a que no hay ADN eucariota.

En el caso de Meusnier *et al.* (2001), con el cual se obtuvo la segunda mayor concentración de ADN (Tabla 2; Figura 17) pero cuya muestra no logró amplificar la región 16S ni la 18S (Figuras 19 y 20), es posible que la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra explique los resultados observados. La presencia de estos inhibidores en la muestra de ADN extraída puede deberse al proceso de maceración al inicio del protocolo de extracción. Estos compuestos son polifenoles o polisacáridos complejos (*e. g.* pectinas, xilanos, ulvanos); metabolitos secundarios liberados por el alga, conocidos por inhibir la reacción de

la PCR en estudios con muestras ambientales (Demeke y Adams, 1992; Monteiro, 1997; Jiang *et al.*, 2005). Los inhibidores dificultan la lisis celular, degradan ácidos nucleicos o inhabilitan la amplificación a cargo de las polimerasas o las transcriptasas reversas (Schrader *et al.*, 2012; Thaler y Bajc, 2013). Además, existen registros acerca de algunos reactivos comúnmente utilizados en metodologías de extracción por solventes (*i. e.* SDS, Proteinasa K, Fenol) que también pueden actuar como en el momento de llevar a cabo la PCR (Schrader *et al.*, 2012; Thaler y Bajc, 2013). Aunque uno de los reactivos que utiliza Meusnier *et al.* (2001) es el PVP (polivinil pirrolodina) –Anexo B– el cual evita que los polifenoles se unan a las proteínas (John, 1992; Castro-Gómez *et al.*, 2012), su concentración pudo ser insuficiente para abarcar el exceso de estos inhibidores.

Es posible concluir, primero, que de las metodologías evaluadas, el kit ZR modificado fue el mejor método para extraer una cantidad considerable de ADN amplificable en la reacción de PCR de la región ADNr 16S. Esta es una técnica más elaborada de purificación del ADN basada en la remoción de compuestos inhibitorios de la PCR (*e. g.* polifenoles o ácidos húmicos), sin la necesidad de utilizar solventes orgánicos o proteasas que también pueden interferir en reacciones de amplificación (Schrader *et al.*, 2012; Thaler y Bajc, 2013). No obstante, la calidad del ADN extraído con este kit depende drásticamente del tiempo al que se someten las muestras durante la lisis en el *bead beater*, de modo que se debe controlar esta variable para que el ADN genómico no se degrade por fragmentación. Segundo, es importante tener presente el propósito de los kits de extracción rápida. El hecho de que el ADN aislado con el kit ZR modificado haya amplificado la secuencia del gen ADNr 16S en particular y no la región 18S, no significa que sea una metodología selectiva para ADN procariota. Se sugiere, entonces que el uso del kit ZR es una opción aceptable para obtener ADN genómico de bacterias epífitas asociadas a la superficie de *U. lactuca* considerando que el tiempo de la lisis mecánica (*bead beater*) se realice en sesiones cortas con amplios intervalos de descanso en hielo. Tercero, es necesario estandarizar las reacciones de PCR de ambas regiones (18S) con el fin de detectar la presencia de ADN eucariota en el ADN extraído. Por último, sería

interesante en un futuro modificar la metodología de extracción propuesta por Meusnier *et al.* (2001) para evitar la presencia de inhibidores, debido a que con este método se logra extraer una alta concentración de ADN, sin embargo el protocolo actual no extrae ADN amplificable en la reacción de PCR.

7.3. Aislamiento de las bacterias epífitas cultivables de *U. lactuca*

Luego de implementar los diferentes tratamientos (agitación y vortex) con el fin de desprender las bacterias asociadas a la superficie de *U. lactuca*, se aisló un total de 31 cepas, las cuales presentaron variedad de morfologías a nivel macroscópico; algunas crecieron de forma dispersa, mientras que otras formaron colonias redondas de diferentes tamaños y coloraciones (Anexo A). La mayoría de las cepas, 22 (70,97%) específicamente fueron aisladas de los cultivos sometidos al tratamiento con vortex (Figura 21a) (agitación continua a 200 r.p.m, por 40 min a 25°C). De las 9 cepas restantes, 5 (16,13%) se aislaron a partir del raspado con hisopos (Figura 21c) y 4 (12,9%), como resultado de la siembra directa del alga sobre el agar (Figura 21b).

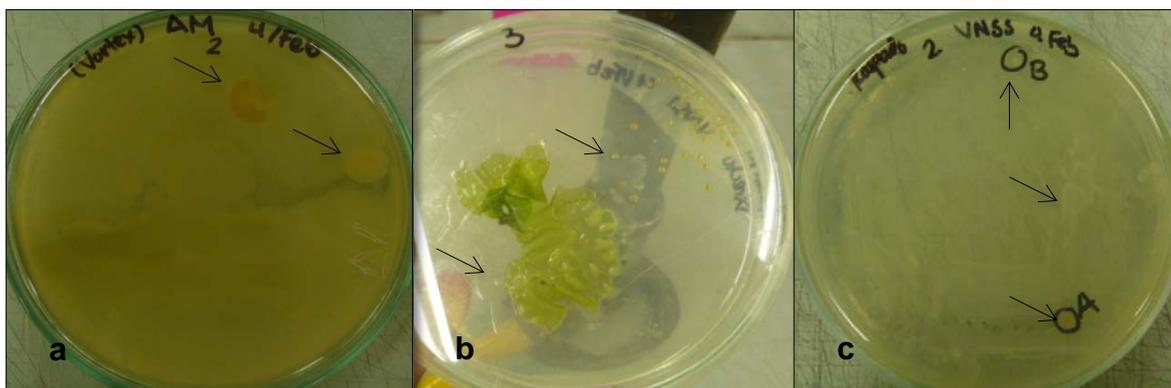


Figura 21. Crecimiento de las bacterias en los diferentes tratamientos. Los indicadores muestran colonias con morfologías distintas, las cuales fueron escogidas para ser aisladas **a)** Tratamiento con vortex. **b)** Siembra directa del alga en el agar. **c).** Raspado de la superficie con hisopos.

En cuanto a los medios de cultivo utilizados, la mayoría de las cepas (21) crecieron en AM, las 10 restantes lo hicieron en AVNSS. Por otra parte, en los medios de cultivo líquidos (CM, VNSS y APS) sometidos a los mecanismos de agitación y sonicación, se observó el crecimiento de tapetes bacterianos, lo que dificultó la obtención de aislamientos puros (Figuras 22 a-c).

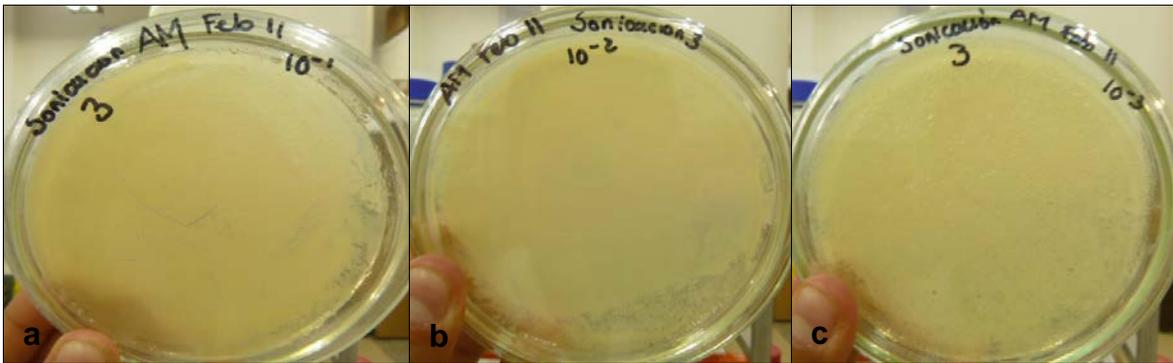


Figura 22. Aislamientos obtenidos utilizando medios de cultivo líquidos. Tratamiento con sonicación y siembra en AM (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) (a-c).

Las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas, se observan en el Anexo A. A nivel microscópico la mayoría de las cepas fueron bacilos y cocobacilos, lo cual concuerda por lo descrito por Burke *et al.* (2009) y (2010) quienes describen que la comunidad de bacterias cultivables asociada a la especie *Ulva australis* está compuesta por bacilos, cocobacilos, además de bacilos creciendo a manera de filamentos.

En este estudio, el método más adecuado para el aislamiento de bacterias epífitas de *U. lactuca*, consistió en someter el alga a agitación constante (200 r.p.m, por 40 min a 25°C) para remover las bacterias de la superficie y obtenerlas en suspensión. Luego tomar 50 a 100 μ l del medio, inocular en AM e incubar a 25°C hasta observar crecimiento (de 2 a 8 días). El AM, en comparación con el AVNSS (Anexo G), es un medio con mayor número de componentes, es decir, es más enriquecido. Esto podría considerarse una ventaja y también, una razón por

la cual la mayoría de bacterias epífitas de *U. lactuca* crecieron favorablemente. Sin embargo, Jensen *et al.* (1996), al aislar bacterias cultivables de *Lobophora variegata* (Phaeophyta) y *Halimeda copiosa* (Chlorophyta) comparan medios con baja (agua marina filtrada y agar al 1,7%) y alta cantidad de nutrientes (peptona, glicerol, extracto de levadura, agar y agua marina filtrada) y observan que aquel menos enriquecido, favorece el crecimiento de bacterias marinas en cuanto a la abundancia. A partir de lo anterior, los autores afirman que los medios enriquecidos tales como el AM 2216 Difco™, (el cual tiene los mismos componentes que el AM 2216 Zobell Himedia®), no contienen los nutrientes que realmente se encuentran en el medio marino, considerando que este es un ambiente oligotrófico (Menezes *et al.*, 2010).

No obstante, estudios realizados previamente han utilizado medios de cultivo como el AM para el aislamiento de bacterias epífitas de macroalgas marinas entre ellas *Sargassum polycystum* (Trivedi *et al.*, 2013) e incluso de algunas especies de dinoflagelados (Sakami *et al.*, 1999; Ashton *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2007), obteniendo resultados positivos evidenciado en el aislamiento de *Pseudoalteromonas* spp., *Bacillus* spp., entre otros géneros.

7.4. Tamizaje funcional de lipasas, celulasas y sideróforos en bacterias cultivables asociadas a *U. lactuca*

7.4.1. Tamizaje de lipasas

En este ensayo, se identificaron 10 cepas con actividad, las cuales representan el 29,03 % de los aislamientos (Anexo H). La presencia de lipasas se evidenció por la formación de un halo translucido alrededor de la colonia (Figura 23a) o por la aparición de pequeños cristales (Figura 23b). Las demás cepas crecieron en el medio de cultivo pero transcurrido el tiempo de incubación, no mostraron ningún indicio de degradación del sustrato.

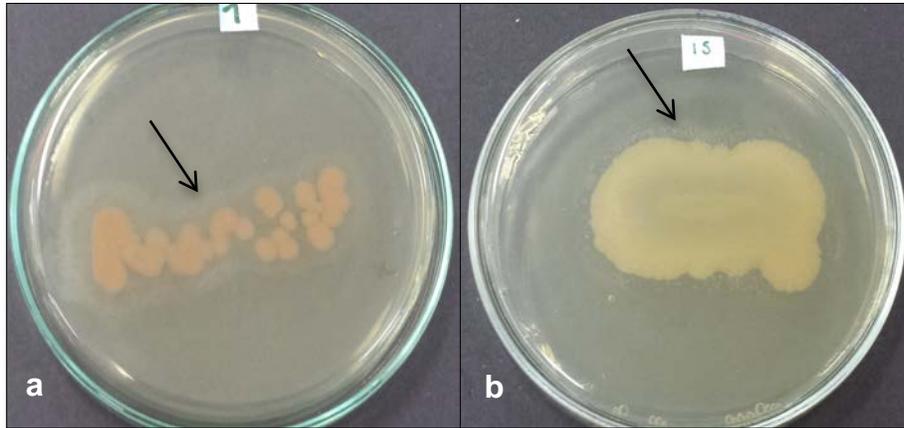


Figura 23. Ejemplo de 2 cepas que presentaron actividad lipolítica, representada por un halo transparente **(a)** Cepa no. 1, y por la formación de cristales **(b)** Cepa no. 15.

Dado el interés atribuido a la búsqueda de lipasas, se han desarrollado diversos métodos de *screening* para enzimas de origen bacteriano, provenientes de ambientes como suelos contaminados, residuos industriales (Veerapagu *et al.*, 2013), aguas termales (Wang *et al.*, 1999), alimentos en descomposición (Abdou, 2003), entre otros. Del mismo modo, se han estudiado lipasas sintetizadas por bacterias marinas dentro de las que se encuentra *Vibrio fischeri*, aislada de cefalópodos (Ranjitha *et al.*, 2009), *Pseudomonas* spp., *Cytophaga* spp. y *Vibrio* spp. asociadas a aguas superficiales (Bruni *et al.* 1982) y bacterias del género *Pseudoalteromonas* sp. provenientes de la región Antártica y de sedimentos en grandes profundidades (Zeng *et al.*, 2004; Giudice *et al.*, 2006; Odisi *et al.*, 2012), además de *Halomonas* sp. y *Marinobacter* sp. procedentes de sedimentos marinos costeros (Silveira, 2013). En cuanto a algas marinas, en la revisión realizada no se encontraron registros de bacterias asociadas productoras de enzimas lipolíticas. Sin embargo; investigaciones enfocadas a la búsqueda de compuestos bioactivos, hablan de la presencia de ácidos grasos con propiedades antimicrobianas en diferentes géneros y especies algales (Potin, 2012; Al-Saif *et al.*, 2014), dentro de las que se registra *U. lactuca* (Egan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007), los cuales pueden ser producto de la hidrólisis a cargo de las lipasas sintetizadas por

bacterias asociadas a la superficie macroalgal (Yung *et al.*, 2011; Goecke *et al.*, 2010).

Algunos estudios que describen la composición química de *Ulva* spp., afirman que el ácido α -linolénico es un ácido graso característico del género, el cual tiende a encontrarse en mayores cantidades que el ácido linoléico (Pereira *et al.*, 2012). Con respecto a *U. lactuca*, esta macroalga presenta altos contenidos de ácido palmítico (C16) y ácido oleico (C18), entre otros ácidos grasos poliinsaturados (Ortiz *et al.*, 2006; Yaich *et al.*, 2011; Al-Saif *et al.*, 2014), de modo que su superficie ofrece diversos sustratos que pueden favorecer la expresión de lipasas en las bacterias epífitas, tal y como se observó en los resultados obtenidos en el presente estudio.

7.4.2. Tamizaje de celulasas

Con el método del rojo congo, todas las cepas presentaron la particularidad de que perdían fácilmente su integridad cuando se agregaban las soluciones del ensayo. A pesar de varios intentos en obtener resultados con este primer ensayo, no se logró ver los halos característicos para comprobar la presencia de celulasas. Por lo tanto, se discutirán los resultados de los últimos 2 métodos.

La Figura 24 ilustra el producto de la reacción con el DNS, la coloración de los pozos muestra la ausencia azúcares reductores, lo cual es un indicio de la carencia de actividad celulolítica en bacterias aisladas de la superficie de *U. lactuca*.

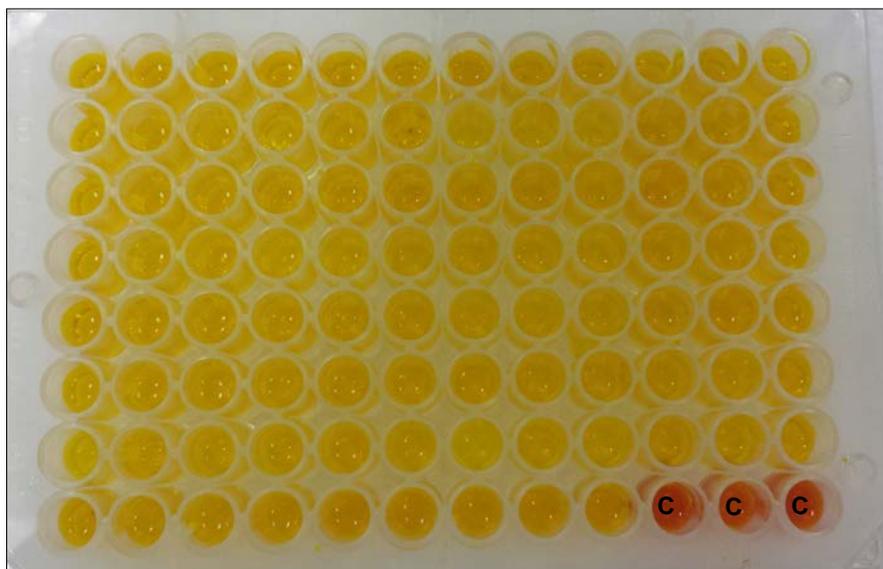


Figura 24. Producto final del ensayo con el método de azúcares reductores y DNS. (C: control positivo).

Ante estos resultados, se podría concluir que el hospedar miembros bacterianos con actividad celulolítica no es una condición benéfica para *U. lactuca*, ya que la integridad estructural de sus paredes celulares podría verse afectada por las bacterias epífitas con este tipo de actividad enzimática. Sin embargo, existen registros que describen bacterias que participan en los procesos de descomposición del talo macroalgal cuando las algas mueren (Sakami *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 2001; Goecke *et al.*, 2013). Lo mismo sucede con bacterias aisladas de la superficie de *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), capaces de degradar el porfirano (Yoshimura *et al.*, 2006), o de *Fucus evanescens* (Phaeophyta) que presentan actividad celulolítica (Ivanova *et al.*, 2002). Asimismo, otros estudios caracterizaron una celulasa alcalina halotolerante producida por *Bacillus flexus*, aislado de *U. lactuca* (Trivedi *et al.*, 2011), lo que demuestra la presencia de actividad celulolítica por parte de bacterias epífitas asociadas a superficies macroalgales, entre las que se encuentran *U. lactuca*.

En el caso particular de especies del género *Ulva* (*U. lactuca*, *U. fasciata* y *U. rigida*), los polisacáridos que constituyen las paredes celulares, y los exudados

secretados en la superficie, son polímeros sulfatados de ramnosa, xilosa y los ácidos glucurónico e idurónicos con enlaces $\beta(1,4)$; componentes de los ulvanos (Martin *et al.*, 2014). Otros polisacáridos presentes contienen arabinosa, galactosa, manosa (Leppard, 1995; Siddhanta *et al.*, 2001) y β -glucano, un polímero lineal conformado por unidades de glucosa con enlaces $\beta(1,3)$ (Ray y Lahaye, 1995; Popper y Fry, 2003). Estos compuestos son importantes en la relación entre bacterias y macroalgas en la medida en que son utilizados como fuentes orgánicas y por ende favorecen el desarrollo y establecimiento de las bacterias sobre la superficie macroalgal (Vu *et al.*, 2009; Goecke *et al.*, 2013).

En cuanto a las metodología utilizadas para el *screening* de celulasas, estudios en los cuales se empleó el método DNS (Lo *et al.*, 2009; Trivedi *et al.*, 2011), argumentan que la síntesis de estas enzimas, depende entre otros factores del tipo de sustrato que induce la reacción. En este caso, las bacterias fueron cultivadas en AM, el cual contiene extracto de levadura como principal fuente de carbono y por consiguiente, no favoreció la síntesis de celulasas en las bacterias aisladas de la superficie macroalgal. Por tal motivo y con el fin de inducir la producción de dichas enzimas, se utilizó un medio de cultivo (AVNSS) suplementado con CMC. Sin embargo; transcurrido el tiempo de incubación tampoco se obtuvieron resultados positivos para actividad celulolítica en las cepas cultivadas (Figura 24).

Del mismo modo se sabe que la presencia de ciertos iones y sales, que hacen parte del medio de cultivo AM (con alto contenido de sales) pueden influir sobre el método del DNS, así como en la actividad de las endo o exoglucanasas, lo que conlleva a la sobre o subestimación del contenido de azúcares reductores en la reacción (Chose, 1987; Bello-Gil *et al.*, 2006; Safari y Emtiazi, 2006; Chen *et al.*, 2011).

A pesar que de los 2 primeros métodos no permitieron detectar la actividad celulolítica de las cepas, con el ensayo que emplea el compuesto fluorogénico MUG (Figura 25) si fue posible revelar que 4 cepas (no. 7, 17, 22 y 29) son capaces de producir celulasas de los 3 tipos (endoglucanasas EC. 3.2.1.4,

exoglucanasas EC 3.2.1.91, y β -glucosidasas EC. 3.2.1.21), debido a que este sustrato no es específico para un tipo en particular (Percival-Zhang *et al.*, 2006).

Estos resultados indican que el ensayo con el sustrato MUG presentó mayor sensibilidad que los otros métodos, lo cual es característico de este tipo de sustratos, ya que son ampliamente utilizados para detectar enzimas presentes en muestras ambientales y cultivos bacterianos (Coleman *et al.*, 2007).

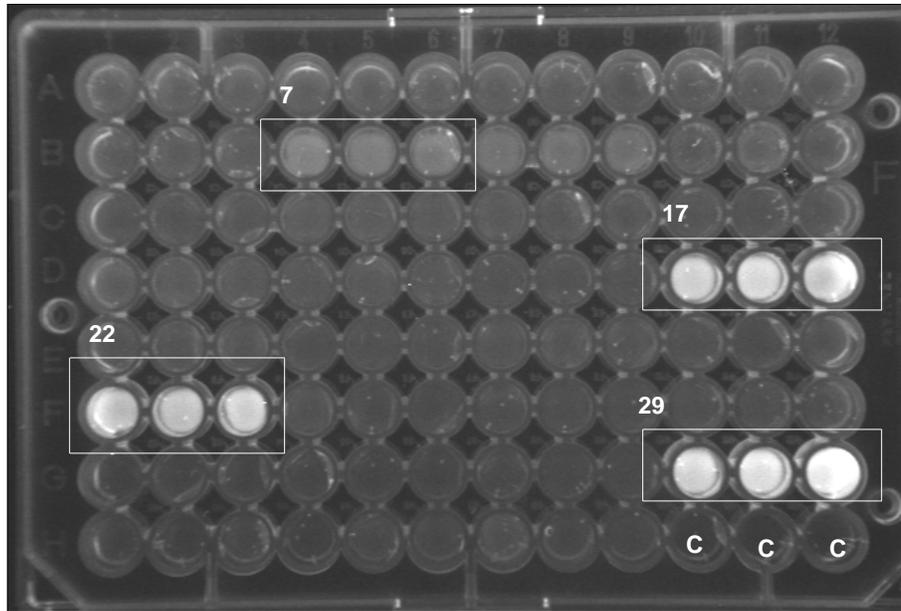


Figura 25. Producto final de la prueba para lipasas con el sustrato MUG- β -D-glucopiranososa. Los pozos enmarcados corresponden a cepas con actividad positiva (C: control negativo).

7.4.3. Tamizaje de sideróforos

De las 31 cepas aisladas de la superficie de *U. lactuca* 14 (45,16 %) – Anexo H – formaron un halo de color amarillo bastante tenue o casi transparente, luego de agregar la solución CAS (Figura 26).

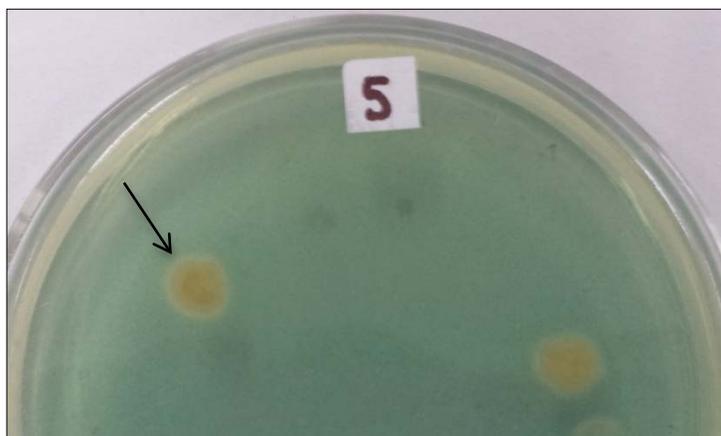


Figura 26. Ejemplo de una cepa (5) con halo de color amarillo tenue, indicando la presencia de sideróforos.

Como se describió en la metodología, el método CAS permite diferenciar el tipo de ligando (*i. e.* hidroxamato, catecolato y carboxilato) con el cual el sideróforo secuestra el ión Fe^{+3} , de acuerdo con el color del halo formado. Por lo tanto, es posible afirmar que todos los sideróforos producidos por las cepas descritas en el Anexo I poseen un ligando de tipo carboxilato (ver Figuras 16c y 26). Sideróforos de este tipo, pueden encontrarse junto con otros que presentan cualquiera de los otros 2 ligandos, casos en los cuales se les denomina sideróforos de tipo mixto. Ejemplos de sideróforos con ligandos mixtos son apreciables en algunas especies de *Pseudomonas*, en las que se encuentran los tipos catecolato e hidroxamato (Meyer *et al.*, 2002; Lamont y Martin, 2003; Dave *et al.*, 2006), o en *Rhizobium* spp. con grupos tipo hidroxamato y carboxilato (Dreschsel *et al.*, 1995). Si bien, es posible que las bacterias aisladas en este estudio produjeran sideróforos mixtos, solo se pudo evidenciar la presencia de sideróforos de tipo carboxilato, los cuales, junto a los catecolatos, presentan la particularidad de formar complejos 1:1 con el Fe^{+3} (Ahmed y Homlström, 2014).

Teniendo en cuenta que los sideróforos hacen parte de un sistema estratégico de captura e ingreso del ión férrico, cuando éste se encuentra en bajas concentraciones, las bacterias epífitas aisladas de *U. lactuca* son productoras potenciales de estas moléculas orgánicas, aun cuando este epibionte en particular

(y otras especies del mismo género) posea la capacidad de bioacumular (Lee y Wang, 2001; Han *et al.*, 2008; Apaydin *et al.*, 2010) o bioadsorber algunos metales, entre ellos el hierro (Venkateshwar, 2007; Wang y Chen, 2009). De la relación entre el hierro y *U. lactuca* por ejemplo, se ha observado que este metal actúa como cofactor de las enzimas nitrato y nitrito reductasas, utilizadas en el proceso de asimilación de nitrógeno proveniente del ambiente marino (Viaroli *et al.*, 2005). Como ya se ha demostrado, uno de los beneficios de la interacción entre bacterias y macroalgas es el aporte de nutrientes esenciales y promotores de crecimiento por parte de las bacterias a su hospedero macroalgal (Croft *et al.*, 2006; Hollants *et al.*, 2012), por ende, el incremento en la solubilidad del hierro gracias al papel que cumplen los sideróforos puede aumentar la biodisponibilidad del metal hacia el epibionte.

Aunque el intercambio de hierro y carbono, componentes importantes en procesos fotosintéticos, ha sido estudiado y descrito con base en el mutualismo entre microalgas (dinoflagelados y cocolitóforos) y bacterias del género *Marinobacter*, productoras de vibrioferrina (Amin *et al.*, 2009), seguramente esta dinámica debe ser universal en las interacciones de organismos autótrofos y sus hospederos en el ambiente marino.

En resumen, se observó que 19 (61,29%) de las cepas aisladas fueron positivas para un tipo de actividad enzimática o para la producción de sideróforos (Anexo I). Es así como, 11 de las bacterias asociadas a la superficie de *U. lactuca* presentaron al menos un tipo de actividad enzimática o produjeron sideróforos, mientras que 7 presentaron 2 tipos de actividad. La bacteria no. 22, fue la única que presentó actividad lipolítica, celulolítica y además produjo sideróforos, siendo entonces una cepa interesante para estudios posteriores por parte del grupo de investigación.

8. CONCLUSIONES

Mediante la realización de este estudio se propone una metodología para la extracción de ADN de bacterias epífitas asociadas a macroalgas de la especie *Ulva lactuca* presentes en el litoral rocoso de “La Punta de la Loma” (Santa Marta- Caribe Colombiano). La implementación de un kit comercial (*ZR Microbe DNA Prep™*) resultó ser la metodología más adecuada para la extracción de ADN de bacterias epífitas asociadas a macroalgas de la especie *Ulva lactuca*, el cual se obtuvo en la cantidad y calidad requerida para análisis metagenómicos posteriores. Aunque la calidad del ADN genómico se ve afectado por la etapa mecánica de lisis debido al *bead beating*, está lo suficientemente buena para análisis de PCR.

Utilizando diferentes metodologías de cultivo y desprendimiento de bacterias asociadas a la superficie macroalgal, fue posible el aislamiento de 31 bacterias epífitas de macroalgas de la especie *U. lactuca*, presentes en el litoral rocoso de “La Punta de la Loma” (Santa Marta- Caribe Colombiano). De las 31 cepas aisladas de la superficie macroalgal de *U. lactuca*, 19 (61,29%) fueron positivas para un tipo de actividad enzimática o para la producción de sideróforos. Del mismo modo, la bacteria identificada con el no. 22, fue la única que presentó actividad lipolítica, celulolítica y además produjo sideróforos, siendo entonces una cepa interesante para estudios posteriores realizados por el grupo de investigación.

9. RECOMENDACIONES

A continuación se señalan aspectos importantes para complementar los resultados encontrados en este trabajo:

Realizar otras modificaciones en cuanto a los tiempos de lisis celular en el *bead beater*, utilizando el kit *ZR Microbe DNA Prep®*, con el fin de verificar si existen variaciones en la cantidad de ADN bacteriano extraído de la superficie macroalgal.

Proponer modificaciones para estandarizar las reacciones de PCR en estudios posteriores, utilizando muestras de ADN extraídas con el kit *ZR Microbe DNA Prep®*, con el kit *FastDNA Spin Kit for Soil* empleado por Longford *et al.* (2007).

Plantear cambios en la metodología propuesta por Mesunier *et al.* (2001) que permitan mejorar el proceso de desintegración del biofilm en donde residen las bacterias epífitas del alga y la remoción de inhibidores de la reacción de la PCR.

Continuar con el estudio de las bacterias aisladas de la superficie macroalgal, que presentaron actividad enzimática (lipolítica y celulolítica), además de producir sideróforos, evaluando otros tipos de actividades biológicas (producción de compuestos antimicrobianos, inhibición de quorum sensing, entre otros), así como llevar a cabo su identificación a nivel taxonómico.

Realizar muestreos en diferentes épocas del año, con el fin de establecer si existen diferencias entre los aislamientos, así como en el tipo de actividad biológica encontrada (síntesis de lipasas, celulasas o producción de sideróforos), de acuerdo a una determinada escala temporal evaluada.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, A. M. 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. *J. Dairy Sci.* 86: 127-132.
- Abell, G. y J. Bowman. 2005. Ecological and biogeographic relationships of class Flavobacteria in the Southern Ocean. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 51: 265-277.
- Ahmed, E. y S. J. Holmström. 2014. Siderophores in environmental Research: roles and applications. *Microbial. Biotechnol.* 7 (3): 196-208.
- Al-Saif, S. S. A.-I., N. Abdel-Raouf, H. A. El-Wazanani y I. A. Aref. 2014. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red Sea, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 21: 57-64.
- Amann, R. I., W. Ludwig y K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.* 59 (1): 143-169.
- Amin, S. A., D. H. Green, M. C. Hart, F. C. Küpper, W. G. Sunda y C. J. Carrano. 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *PNAS.* 106 (40): 17071-17076.
- Apaydin, G, V. Ayliker, E. Cengiz, M. Saydam, N. Küp y E. Tıraşoğlu. 2010. Analysis of metal contents of seaweed (*Ulva lactuca*) from Istanbul, Turkey by EDXFR. *Turkis J. Fish. Aquat Sci.* 10:215-220.
- Armstrong, E., L. Yan, K. G. Boyd, P. C. Wright y J. G. Burgess. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia.* 461: 37-40.
- Ashton, M., W. Rosado, N. S. Govind y T. R. Tosteson. 2003. Culturable and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Toxicon.* 42: 419-424.
- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière y R. Verger. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 133–153.
- Bej, A. K. y M. H. Mahbubani. 1992. Applications of the Polymerase Chain Reaction in environmental microbiology. *Genome Res.* 1: 151-159.

- Bello-Gil, D., E. Carrera-Bocourt y Y. Díaz-Maqueira. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA*. 2: 45-50.
- Bowien, B y P. Dürre. 2002. *Nucleic Acids Isolation Methods*. American Scientific Publishers. 200 p.
- Boyd, K. G., A. Mearns-Spragg, G. Brindley, K. Hatzidimitriou, A. Rennie, M. Bregu, M. O. Hubble y J. G. Burgess. 1998. Antifouling potential of epiphytic marine bacteria from the surfaces of marine algae. 128-136. En: Le Gal, y A. Muller-Feuga (Eds.). *Marine microorganisms for industry*. Editions Ifremer. Plouzané. France. 207 p.
- Boyd, K. G., D. R. Adams y G. Burgess. 1999. Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling*. 14 (3): 227-236.
- Brandt, P., G. Gerdt, M. Boersma, K. H. Wiltshire y A. Wichels. 2010. Comparison of different DNA-extraction-techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Heligoland Marine Research*. 64 (4): 331-342.
- Briand, J. F. 2009. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 25 (4): 297-311.
- Bruni, V., T. Maugeri y V. Alonzo. 1982. Lipolytic activity of marine bacteria. Influence of NaCl and MgCl₂. *Marine Biology*. 67: 113-119.
- Burke, C., S. Kjelleberg y T. Thomas. 2009. Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (1): 252-256.
- Burke, C. 2010. A metagenomic analysis of the epiphytic bacterial community from the green macroalga *Ulva australis*. Faculty of Science. University of New South Wales. 238 p.
- Callow, J. A. y M. E. Callow. 2006. The *Ulva* spore adhesive system. 63-78. En: Smith, A. M. y J. A. Callow. (Eds.). *Biological adhesion*. Springer-Verlag, Berlin. 284 p.
- Castro-Gómez, J. C., M. Cobos-Ruiz, R. Ramírez-Saavedra y S. I. Correa. 2012. Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) "Camu Camu" apropiado para análisis moleculares. *Ciencia Amazónica*. 2 (1): 7-15.

- Chandan-jain, S., J. Sivakumar y P. Malaiyarasa pandian. 2013. Surface associated bacteria of marine algae in Kovalanm beach, Chennai, had screened for its antifouling activity. *Indian J. Geo-Marine Sciences*. 42 (4): 498-502.
- Chen, H.-J., H.-J. Chang, C. Fan, W.-H. Chen y M.-S. Lee. 2011. Screening, isolation and characterization of cellulose biotransformation bacteria from specific soils. *International Conference on Environment and Industrial Innovation*. 12: 216-220.
- Chistoserdova, L. 2010. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 32: 1351-1359.
- Chose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59 (2): 257-268.
- Coleman, D. J., M. J. Studley y J. J. Naleway. 2007. A long-wavelength fluorescent substrate for continuous fluorometric determination of cellulase activity: resorufin- β -D-cellobioside. *Anal. Biochem.* 371: 146-153.
- Cooksey, K. E. y Wigglesworth-Cooksey, B. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 9: 87-96.
- Croft, M. T. y A. D. Lawrence. 2005. Algae acquire vitamin B-12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 438 (7064): 90-93.
- Croft, M. T. y M. J. Warren. 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell*. 5 (8): 1175-1183.
- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno y B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic analysis for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Dave, B., K. Anshuman y P. Hajela. 2006. Siderophores of halophilic archaea and their chemical characterization. *Indian J. Exp. Biol.* 44: 340-344.
- Dawes, J. C. 1991. Botánica Marina. Ed Limusa, México. 149 p.
- Decho, A.W., R. S. Norman y P. T. Visscher. 2010. Quorum sensing in natural environments: emerging view from microbial mats. *Trends Microbiol.* 18(2): 73-80.

- DeLong, E. F., D. G. Franks y A. L. Aldredge. 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 38: 924-934.
- DeLong, E., C. Preston, T. Mincer, V. Rich, S. Hallam, N. Frigaard, A. Martínez, M. Sullivan, R. Edwards, B. Rodríguez, S. Chisholm y D. Karl. 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Sci.* 311 (5760): 496-503.
- Demeke, T. y R. P. Adams. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques.* 12: 332-334.
- Dobretsov, S. 2008. Inhibition and induction of marine biofouling by biofilms. 293-313. En: Flemming, H. C., P. S. Murthy, R. Venkatesan, y K. E. Cooksey. (Eds.). 2009. Marine and Industrial Biofouling. Vol. 4. Springer-Verlag, Berlin. 346 p.
- Drechsel, H., M. Tschierske, A. Thieken, G. Jung, H. Zahner y G. Winkelmann. 1995. Siderophore rhizoferrin and its analogs produced by direct fermentations. *J. Ind. Microbiol.* 14: 105-112.
- Egan, S., T. Thomas, C. Holmström y S. Kjelleberg. 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ. Microbiol.* 2 (3): 343-347.
- Egan, S., C. Holmström y S. Kjelleberg. 2001. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1499-1504.
- Falero, E. 2013. Identificación y caracterización de enzimas bacterianas de origen antártico, con potencial aplicación biotecnológica. Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. 60 p.
- Fani, R. 2006. Microbial Ecology: molecular methods and strategies for the analysis of natural microbial communities. 16th Meeting of the Italian Society of Ecology. Viterbo/Civitavecchia. 1-4.

- Fatima, F., I. Chaudhary, j. Ali, S. Rastogi y N. Pathak. 2011. Microbial DNA extraction from soil y different methods and its PCR amplification. *Biochem. Cell. Arch.* 11(1): 1-5.
- Fisher, M. M., L. W. Wilcox y L. E. Graham. 1998. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on Charophycean green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11): 4384-4389.
- Franco, A. 2005. Oceanografía de la Ensenada de Gaira. El Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe colombiano. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 58 p.
- Fujimoto, S., Y. Nakagami y F. Kojima. 2004. Optimal bacterial DNA isolation method using bead-beating technique. *Memoirs Kyushu Univ. Dep. of Health Scis. Of Medical Sch.* 3: 33-38.
- García, C. B. y G. Díaz-Pulido. 2006. Dynamics of a macroalgal rocky intertidal community in the Colombian Caribbean. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 35: 7-18.
- Giudice A., L. Michaud, D. de Pascale, M. Domenico, G. di Prisco y R. Fani. 2006. Lipolytic activity of Antarctic cold adapted marine bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 101: 1039-1048.
- Goecke, F., A. Labes, J. Wiese y J. F. Imhoff. 2013. Phylogenetic analysis and antibiotic activity of bacteria isolated from the surface of two co-occurring macroalgae from the Baltic Sea. *Eur. J. Phycol.* 48 (1): 47-60.
- Greenshields, L. D., L. Guosheng, J. Feng, G. Selvaraj y Y. Wei. 2007. The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol. Plant. Pathol.* 8: 411-421.
- Gupta, R., N. Gupta y P. Rathi. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.
- Gupta, R., G. Mehta, D. Deswal, S. Sharma, K. Kumar-Jain, A. Singh y R. C. Kuhad. 2013. Cellulases and their biotechnological applications. 89-106. En: Kuhad, R. C. y A. Singh. (Eds.). 2013. *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Springer, India, 313 p.

- Han, T., S.-H. Kang, J.-S. Park, H.-K. Lee y M. T. Brown. 2008. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 86: 176-184.
- Hayden, H. S. y J. R. Waaland. 2002. Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences. *J. Phycol.* 38: 1200-1212.
- Hirsch, P. R., T. H. Mauchline y I. M. Clark. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry.* 42: 878-887.
- Hollants, J., F. Leliaert, O. De Clerck y A. Willems. 2012. What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacteria associations. *FEMS Microbiol Ecol.* 1-16.
- Holmström, C., D. Rittschof y S. Kjelleberg. 1992. Inhibition of settlement by larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. *App. Environ. Microbiol.* 58: 2111-2115.
- Hongoh, Y., H. Yuzawa, M. Ohkuma y T. Kudo. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 299-304.
- Hugenholtz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology.* 3 (2): Reviews 0003.1-0003.8.
- Ishii, K. y M. Fukui. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *App. Environ. Microbiol.* 67: 3753-3755.
- Ivanova, E., I. Bakunina, T. Sawabe y K. Hayashi. 2002. Two species of culturable bacteria associated with degradation of Brown algae *Fucus evanescens*. *Microb. Ecol.* 43: 242-249.
- Jain, A. y N. B. Bhosle. 2009. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. *Biofouling.* 25 (1): 13-19.
- Jensen, P. R., C. A. Kauffman y W. Fenical. 1996. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Marine Biology.* 126: 1-7.

- Jiang, J., K. A. Alderisio, A. Singh y L. Xiao. 2005. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1135-1141.
- John, M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20 (9): 2381.
- Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, M. Camara y P. Williams. 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Sci.* 298: 1207.
- Joint, I., K. Tait y G. Wheeler. 2007. Cross-kingdom signaling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1223-1233.
- Kanagasabhapathy, M., H. Sasaki, S. Haldar, S. Yamasaki y S. Nagata. 2006. Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Ann. Microbiol.* 56: 167-173.
- Kennedy, J. J. R. Marchesi y A. D. Dobson. 2007. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *App. Microbiol. Biotechnol.* 75 (1): 11-20.
- Kennedy, J., J. Marchesi y A. Dobson. 2008. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. *Microbial Cell Factories.* 7 (27): 7-27.
- Kim, J. T., S. G. Kang, J. H. Lee, B. C. Jeong y S. J. Kim. 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (4): 820-828.
- Kimes, N. E., A. V. Callaghan, D. F. Aktas, W. L. Smith, J. Sunner, B. T. Golding, M. Drozdowska, T. C. Hazen, J. M. Suflita y P. J. Morris. 2013. Metagenomics analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in Microbiology.* 4 (50): 1-17.

- Lachnit, T., M. Blümel, J. Imhoff y M. Wahl. 2009. Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquat. Biol.* 5: 181-186.
- Lamont, I. L. y L. W. Martin. 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 149: 833-842.
- Lee, W.-Y. y W.-X. Wang. 2001. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonia and phosphate. *Sci. Total. Environ.* 278: 11-22.
- Lemos, M. L., A. E. Toranzo y J. L. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbiol. Ecol.* 11: 149-163.
- Leppard, G. G. 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment.* 165: 103-131.
- Lewis, L. A. y R. M. McCourt. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91 (10): 1535-1556.
- Littler D. S., M. M. Littler, E. K. Bucher y N. L. Norris. 1989. Marine Plants of the Caribbean: A Field Guide from Florida to Brazil. Smithsonian Institution Press, Washington D. C., 263 p.
- Littler, D. S. y M. M. Littler. 2000. Caribbean Reef Plants, Offshore Graphics, Inc. New York. 542 p.
- Liu, M., Y. Dong, Y. Zhao, G. Zhang, W. Zhang y T. Xiao. 2011. Structures of bacterial communities on the surface of *Ulva prolifera* and in seawaters in an *Ulva* blooming region in Jiaozhou Bay, China. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1703-1712.
- Lloyd-Jones, G. y D. W. F. Hunter. 2001. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 2053-2059.
- Lo, Y.-C., G. D. Saratale, W.-M. Chen, M.-D. Bai y J.-S. Chang. 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzyme for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme Microbial. Technol.* 44: 417-425.

- Longford, S. R., N. A. Tujula, G. R. Crocetti, A. J. Holmes, C. Holmström, S. Kjelleberg, P. D. Steinberg y M. W. Taylor. 2007. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquat. Microb. Ecol.* 48: 217-229.
- Luna, G. M., A. Dell'Anno y R. Donavaro. 2005. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ. Microbiol.* 8: 308-320.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van Zyl y I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3): 506-577.
- Mahmoudi, N., G. F. Slater y R. R. Fulthorpe. 2011. Comparison of comercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH contaminated soils. *Canadian J. Microbiol.* 57: 623-628.
- Malik, S., M. Beer, M. Megharaj y R. Naidu. 2008. The use of molecular techniques to characterize microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* 34: 265-276.
- Marques, M. P., K. Walshe, S. Doyle, P. Fernandes y C. C. C.R de Carvalho. 2012. Anchoring high-throughput screening methods to scale-up bioproduction of siderophores. *Process Biochemistry.* 47: 416-421.
- Martin, M., D. Portetelle y G. Michel. 2014. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2917-2935.
- Matsuo, Y., H. Imagawa, M. Nishizawa y Y. Shizuri. 2005. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Sci.* 307 (5715): 1598-1608.
- Menezes, C., R. Bonugli-Santos, P. Miqueletto, M. Passarini, C. Silva, M. Justo, R. Leal, F. Fantinatti-Garboggini, V. Oliveira, R. Berlinck y L. Sette. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Research.* 165: 466-482.

- Meseguer-Yebra, D., S. Kiil y D. Dam-Johansen. 2004. Antifouling technology- past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coatings*. 50: 75-104.
- Meusnier, I., J. Olsen, W. Stam, C. Destombe y M. Valero. 2001. Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the Mediterranean introduction. *Mol. Ecol.* 10: 931-946.
- Meyer, J.-M., V. A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak y N. J. Palleroni. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (6): 2745-2753.
- Mieszkin, S., M. E. Callow y J. A. Callow. 2013. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. 29 (9): 1097-1113.
- Monteiro, L. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35: 995-998.
- Moore, E., A. Arnscheidt, A. Krüger, C. Strömpl y M. Mau. 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Mol. Microbial Ecol. Manual*. 1.01: 3-18.
- Munn, C. B. 2004. Marine Microbiology: Ecology and Applications. Taylor & Francis Routledge. 323 p.
- Nagata, T. 2008. Organic matter-bacteria interactions in seawater. 207-242. En: Kirchman, D. L. (Ed.). *Microbial Ecology of the Oceans*. 2ª Ed. John Wiley & Sons, Inc. 607 p.
- Nagoba, B. y D. Vedpathak. 2011. Medical applications of siderophores. *Eur. J. Gen. Med.* 8 (3): 229-235.
- Nakanishi, K., M. Nishijima, M. Nishimura, K. Kuwano y N. Saga. 1996. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions. *J. Phycol.* 32 (3): 479-482.

- Odisi, E. J., M. B. Silvestrin, R. Y. Uwamori, M. A. Castro da Silva y A. O. de Souza Lima. 2012. Bioprospection of cellulolytic and lipolytic South Atlantic deep-sea bacteria. *Electr. J. Biotechnol.* 15 (5): 1-11.
- Ortega, M., J. L. Godínez y G. Garduño. 2001. Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe. UNAM. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 594 p.
- Ortiz, J., N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. López-Hernández, C. Bozzo, E. Navarrete, A. Osorio y A. Rios. 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem.* 99 (1): 98-104.
- Ouyang, Y., S. Dai, L. Xie, M. S. Ravi Kumar, W. Sun, H. Sun, D. Tang y X. Li. 2009. Isolation of high molecular weight DNA from marine sponge bacteria for BAC library construction. *Mar. Biotechnol.* Springer Science & Business Media. 1-8.
- Pace, N. R. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News.* 62: 463-470.
- Pardo-Castro, P. V. 2004. Estudio taxonómico de las macroalgas marinas bénticas de la región sur de la Península de Macanao, Isla de Margarita, Estado Nueva Esparta, Venezuela. Tesis Biol. Mar. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Santa Marta. 234 p.
- Pardo, P. y M. A. Solé. 2007. Flora marina de la península de Macanao, Isla de Margarita, Venezuela. I. Chlorophyta y Phaeophyceae. *Acta Bot. Venez.* 30 (2): 291-325.
- Patil, K. J., M. Z. Chopda y R. T. Mahajan. 2011. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology.* 4 (8): 971-982.
- Penesyan, A., Z. Marshall-Jones, C. Holmström, S. Kjelleberg y S. Egan. 2009. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 69: 113-124.
- Penesyan, A., S. Kjelleberg y S. Egan. 2010. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar. Drugs.* 8: 434-459.

- Percival-Zhang, Y.-H., M. E. Himmel y J. R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24: 452-481.
- Pereira, H., L. Barreira, F. Figueiredo, L. Custódio y C. Vizetto-Duarte. 2012. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs.* 10: 1920-1935.
- Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, R. George-Téllez, L. S. Zamudio-Rivera y F. J. Fernández. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Meth.* 70: 127-131.
- Persson, F., R. Svensson, G. M. Nylund, N. J. Fredriksson, H. Pavia y M. Hermansson. 2011. Ecological role of a seaweed secondary metabolite for a colonizing bacterial community. *Biofouling.* 27 (6): 579-588.
- Picard, C., C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme y P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2712-2722.
- Plou, F. J., M. Ferrer, O. M. Nuero, M. V. Calvo, M. Alcalde, F. Reyes y A. Ballesteros. 1998. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol. Techn.* 12 (3): 183-186.
- Popper, Z. A. y S. C. Fry. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann. Bot.* 91: 1-12.
- Potin, P. 2012. Intimate associations between epiphytes, endophytes, and parasites of seaweeds. 203-234. En: Wiencke, C. y K. Bischof (Eds.). *Seaweed Biology. Ecological Studies.* Springer-Verlag. Berlin, 507 p.
- Prieur, D., F. Gaill y S. Corre. 1993. Complex epibiotic bacterial communities on marine organisms: Fouling or interactions?. *Trends Micro. Ecol.* 207-212.
- Pröschold, T. y F. Leliaert. 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. 123-153. En: Brodie, J. y Lewis, J. (Eds.). 2007. *Unravelling the algae: the past, present and future.* CRC Press, Boca Raton 402 p.

- Ranjitha, P., E. Karthy y A. Mohankumar. 1999. Purification and characterization of the lipase from marine *Vibrio fischeri*. *International Journey of Biology*. 1 (2): 48-55.
- Rao, D., J. S. Webb y S. Kjelleberg. 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *App. Environ. Microbiol.* 71 (4): 1729-1736.
- Rao, D., J. S. Webb y S. Kjelleberg. 2006. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (8): 5547-5555.
- Rastogi, G. y R. K. Sani. 2011. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. 29-57. En: Ahmad, I., F. Ahmad y J. Pitchel. (Eds.). 2011. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer, New York, 516 p.
- Ray, B. y M. Lahaye. 1995. Cell wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydr. Res.* 274: 251-261.
- Roh, C., F. Villatte, B.-G. Kim y R. D. Schmid. 2006. A comparative study of extraction and purification methods for environmental DNA from soil and sludge samples. University of Stuttgart. Germany. 1-34.
- Safari, A. A. y G. Emtiazi. 2006. The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay. *J. Appl. Sci. Environ. Management.* 10 (3): 93-96.
- Sakami, T. 1999. Effects of algal excreted matters on epiphytic bacteria on the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* 28: 39-90.
- Sakami, T., H. Nakahara, M. Chinain y Y. Ishida. 1999. Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233: 231-246.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek y R. John. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1014-1026.
- Shapiro, J. A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 81-104.

- Sharma, R., Y. Chisti y U. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Advances*. 19: 627-662.
- Shivji, M. S., S. O. Rogers y M. J. Stanhope. 1992. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 197-203.
- Siddhanta, A. K., A. M. Goswami, B. K. Ramavat, K. H. Mody y O. P. Mairh. 2001. Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters. *Indian J. Mar. Sci.* 30: 166-172.
- Silveira, C. 2013. Atividade e estabilidade das lipases produzidas por *Halomonas sulfidaeris* LAMA 838 e *Marinobacter excellens* LAMA 842 em função da temperatura e do pH. Trabalho de Conclusão como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Tecnológicas, Da Terra e Do Mar. Universidade Do Vale Do Itajaí. 35 p.
- Simon, C. y D. Rolf. 2011. Metagenomic analyses: Past and future trends. *App. Environ. Microbiol.* 77 (4): 1153-1161.
- Simões, M., S. Cleto, L. C. Simões, M. O. Pereira y M. J. Vieira. 2007. Microbial interactions in biofilms: Role of siderophores and iron-dependent mechanisms as biocontrol strategies. 157-165. En: Gilbert, P., D. Allison, M. Brading, J. Pratten, D. Spratt y M. Upton. (Eds.). *Biofilms: Coming of Age*. The Biofilm Club. Manchester.
- Singh, R. P., M. K. Shukla, A. Mishra, C. R. Reddy y B. Jha. 2013. Bacterial extracellular polymeric substances and their effect on settlement of zoospore of *Ulva lactuca*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 103: 223-230.
- Sipos, R., A. J. Székely, M. Palatinszky, S. Révész, K. Márialigeti y M. Nikolausz. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 341-350.
- Somerville, C. C., I. T. Knight, W. L. Straube y R. R. Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *App. Environ. Microbiol.* 55 (3): 548-554.

- Srivastava, S., N. Ghosh y G. Pal. 2013. Metagenomics: Mining Environmental Genomes. 161-189. En: Kuhad, R. C. y A. Singh. (Eds.). 2013. Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery. Springer. India, 313 p.
- Su, J. Q., X. R. Yang, T. L. Zheng, Y. Tian, N. Z. Jiao, L. Z. Cai y H. S. Hong. 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 6: 799-810.
- Tait, K., I. Joint, M. Daykin, D. Milton, P. Williams y M. Camara. 2005. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green algae *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 7: 229-240.
- Taylor, G. T., D. Zheng, M. Lee, P. J. Troy, G. Gyananath y S. K. Sharma. 1997. Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic water. *Biofouling*. 11 (1): 31-57.
- Teather, R. M. y P. J. Wood. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (4): 777-780.
- Thaler, N. y M. Bajc. 2013. Effect of fungal and plant secondary metabolites on polimerase chain reaction (PCR). *Acta Silvae et Ligni*. 100: 25-40.
- Thomas, T., F. F. Evans, D. Schlecheck, A. Mai-Prochnow, C. Burke, A. Penesyan, D. S. Dalisay, S. Stelzer-Braid, N. Saunders, J. Johnson, S. Ferriera, S. Kjelleberg y S. Egan. 2008. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicate* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PLoS ONE*. 3 (9): e3252.
- Trivedi, N., V. Gupta, M. Kumar, P. Kumari, C. R. Reddy y B. jha. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*. 83: 891-897.
- Trivedi, N., V. Gupta, C. Reddy y B Jha. 2013. Detection of ionic liquid stable cellulase produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. isolated from brown alga *Sargassum polycystum* C. Agardh.

- Vakhlu, J., S. Ambardar y B. Johri. 2012. Metagenomics: A relief road to novel microbial genes and genomes. 263-294. En: Satyanarayana, T., B. Johri y A. Prakash (Eds.). *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*. Springer Science and Business Media. New York, 829 p.
- Veerapagu, M., A. Sankara, K. Ponmurugan y K. Jeya. 2013. Screening, selection, identification, production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian J. Pharma. Clinical Res.* 6 (3): 62-67.
- Venkateshwar, P. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African J. Biotechnol.* 6: 2924-2931.
- Viaroli, P., M. Bartoli, R. Azzoni, G. Giordani, C. Mucchino, M. Naldi, D. Nizzoli y L. Tajé. 2005. Nutrient and iron limitation to *Ulva* blooms in a eutrophic coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy). *Hydrobiologia.* 550: 57-71.
- Vu, B., M. Chen, R. J. Crawford y E. P. Ivanova. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules.* 14: 2535-2554.
- Wang, J. y C. Chen. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27: 195-226.
- Wang, Y., K. Srivastava, G. Shen y H. Wang. 1999. Thermostable alkalina lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). *J. Ferment. Bioeng.* 79: 433-438.
- Wahl, M. 2009. Epibiosis: Ecology, effects and defenses. 61-72. Wahl, M. (Ed). *Marine Hard Bottom Communities, Ecological Studies.* 206 p.
- Winkelmann, G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (4): 691-696.
- Yaich, H., H. Garna, S. Besbes, M. Paquot, C. Blecker y H. Attia. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry.* 128 (4): 895-901.
- Yan, I., K. Boyd y G. Burgess. 2002. Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Mar. Biotechnol.* 4: 356-366.
- Yoshimura, T., K. Tsuge, T. Sumi, M. Yoshiki, Y. Tsuruta, S. Abe, S. Nishino, S. Sanematsu y K. Koganemaru. 2006. Isolation of porphyran-degrading marine

microorganisms from the surface of red alga, *Porphyra yezoensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(4): 1026-1028

Yung, P., C. Burke, M. Lewis, S. Kjelleberg y T. Thomas. 2011. Microbial communities associated with the sponge *Cymbastela concentrica* and the green alga *Ulva australis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (4): 1512-1515.

Zeng, X., X. Xiao, P. Wang y F. Wang. 2004. Screening and characterization of phyctrotrophic lipolytic bacteria from deep-sea sediments. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:952-958.

11. ANEXOS

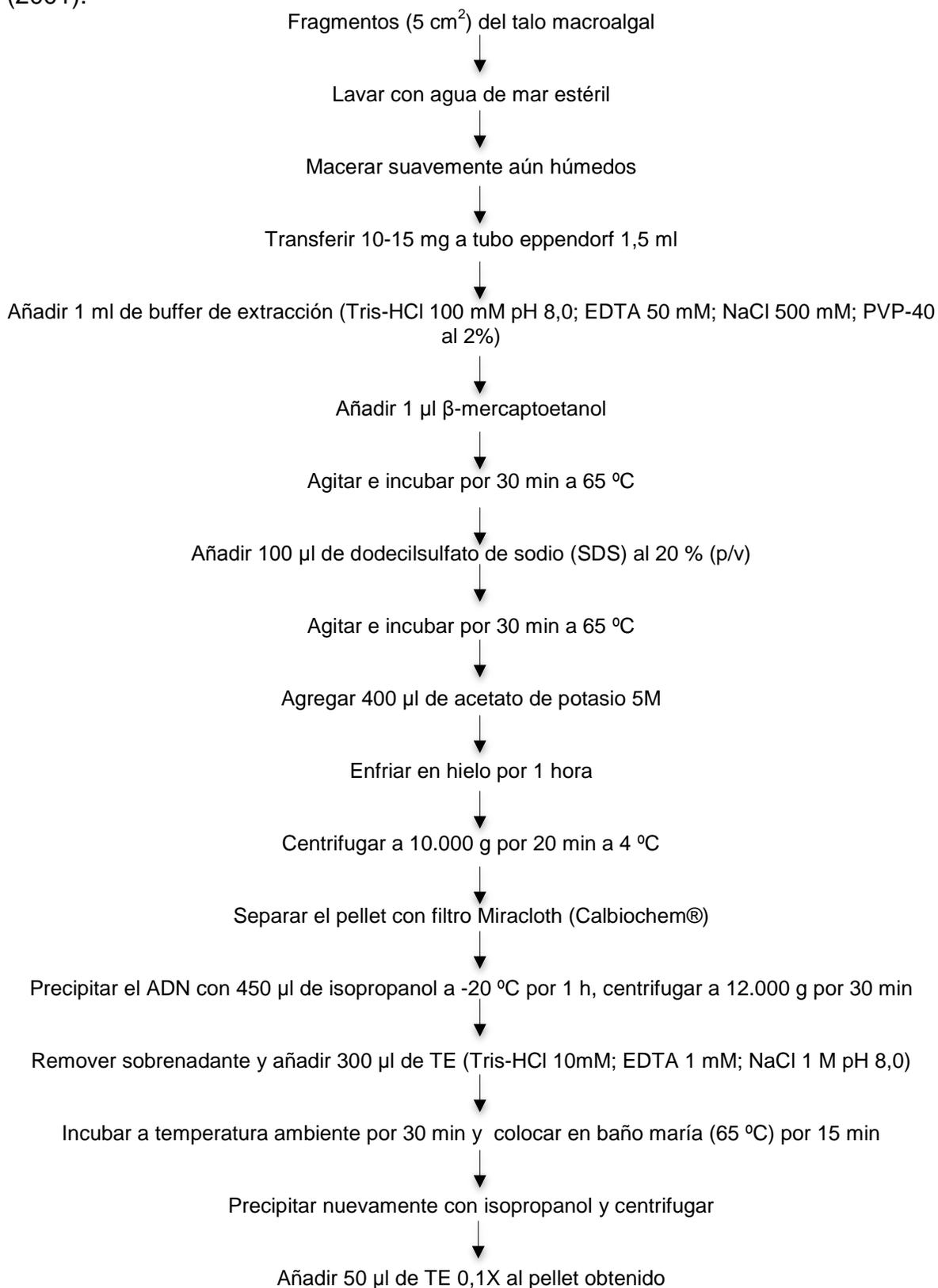
ANEXO A. Características y morfología macroscópica y microscópica, de las bacterias aisladas de la superficie macroalgal de *U. lactuca*.

Cepa	Tratamiento		Morfología macroscópica	Observaciones	
	Método de remoción celular	Medio de cultivo		Morfología Gram	Morfología microscópica
1	Agitación	AM	Colonias de aspecto cremoso y color rosado	(-)	Cocobacilos
2	-	-	-	Creció solo hasta el primer pase	
3	Agitación	VNSS	Colonias pequeñas, de color amarillo	(-)	Bacilos cortos
4	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
5	Raspado	VNSS	Colonias pequeñas, de color blanco	(-)	Cocobacilos
6	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
7	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos largos
8	Agitación	AM	Colonias blancas, cremosas y de consistencia un poco líquida	(-)	Bacilos cortos

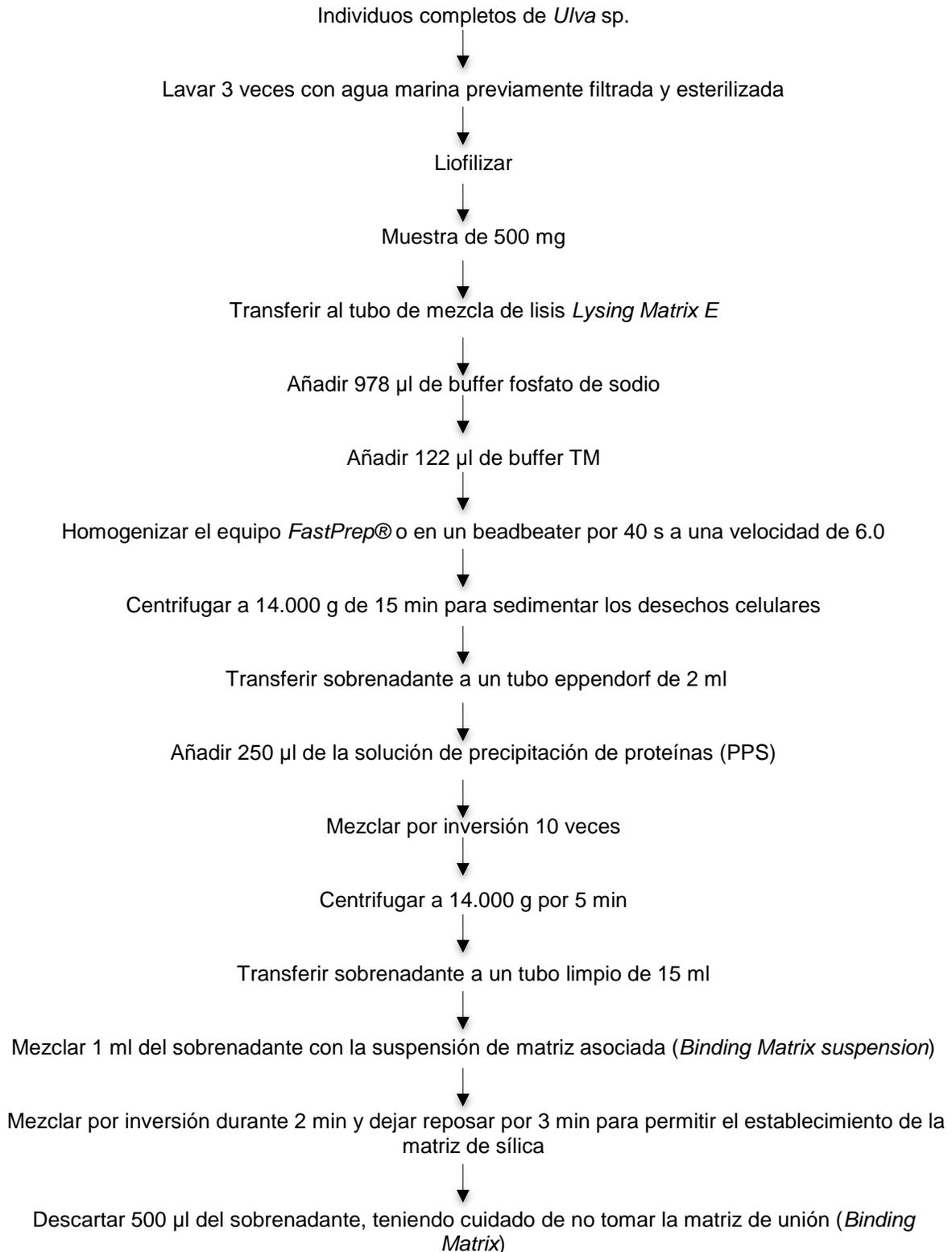
9	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos filamentosos
10	Siembra directa	VNSS	Colonias pequeñas, de color amarillo	(-)	Bacilos largos
11	Agitación	VNSS	Colonias pequeñas, opacas de color blanco	(-)	Cocobacilos
12	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Cocobacilos
13	Raspado	VNSS	Colonias redondas y cremosas, de color blanco	(-)	Bacilos largos
14	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, transparentes	(-)	Bacilos filamentosos
15	Raspado	VNSS	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(+)	Cocobacilos
16	Agitación	AM	Colonias grandes, cremosas, de color amarillo claro	(-)	Bacilos cortos
17	Agitación	AM	Colonias pequeñas cremosas, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
18	Raspado	VNSS	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos pequeños y largos
19	Agitación	AM	Colonias redondas y cremosas, de color blanco	(+)	Bacilos cortos
20	Siembra directa	AM		(-)	Bacilos cortos

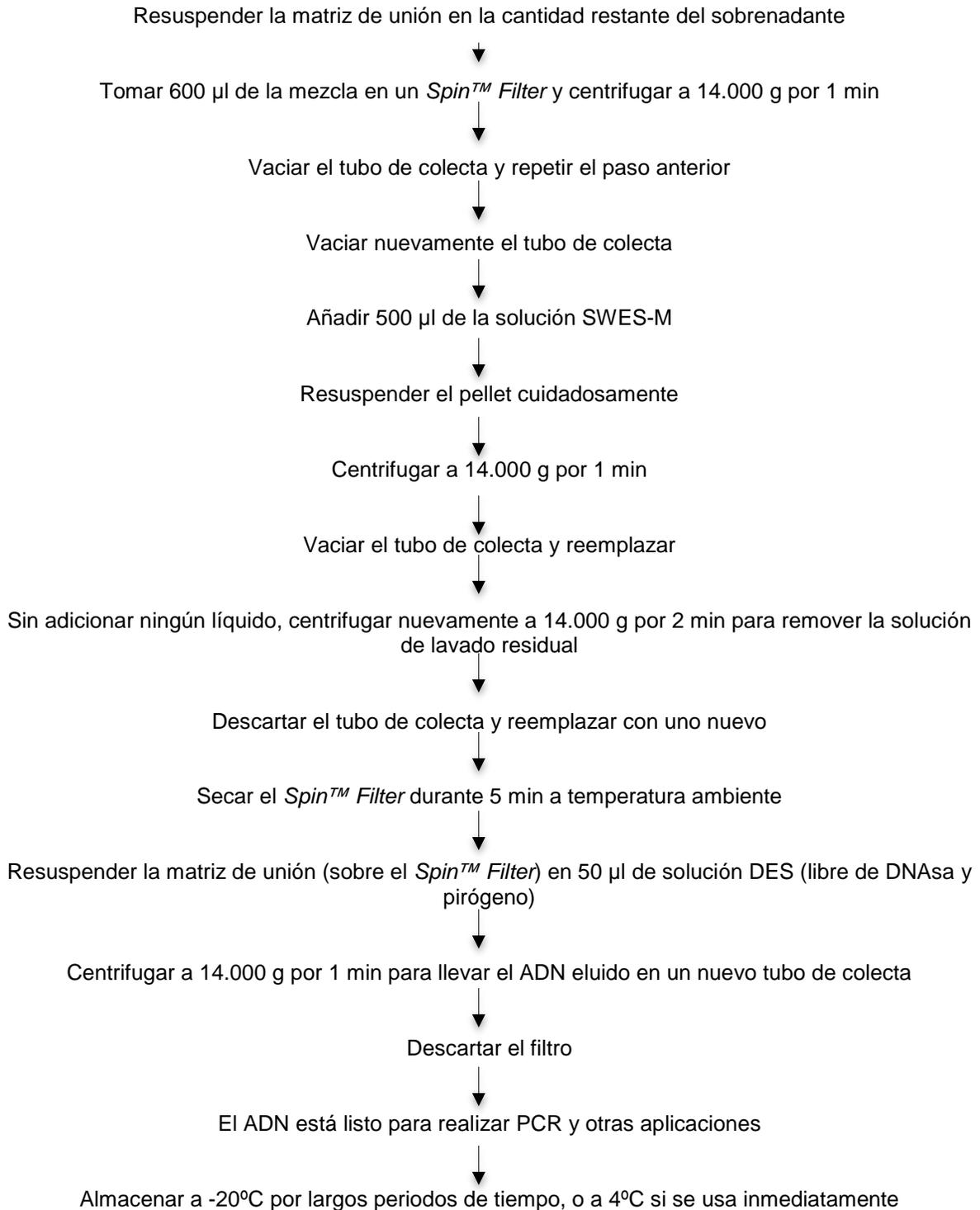
21	Agitación	AM	Colonias pequeñas y cremosas, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
22	Agitación	AM	Colonias redondas y cremosas, de color blanco	(-)	Cocobacilos
23	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(+)	Bacilos largos
24	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Cocobacilos
25	Siembra directa	VNSS	Colonias redondas, de color amarillo	(-)	Bacilos
26	Siembra directa	VNSS	Colonias pequeñas, de color amarillo	(-)	Bacilos
27	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
28	Raspado	VNSS	Colonias redondas, de color blanco	(-)	Bacilos
29	Agitación	AM	Colonias pequeñas y cremosas, de color blanco	(-)	Bacilos
30	Agitación	AM	Colonias con crecimiento a manera de tapete, de color blanco	(-)	Bacilos cortos
31	Agitación	AM	Colonias pequeñas redondas, de color blanco	(-)	Bacilos pequeños
32	Agitación	AM	Colonias pequeñas redondas y cremosas, de color blanco	(-)	Bacilos pequeños

ANEXO B. Procedimiento de extracción de ADN propuesto por Meusnier *et al.* (2001).

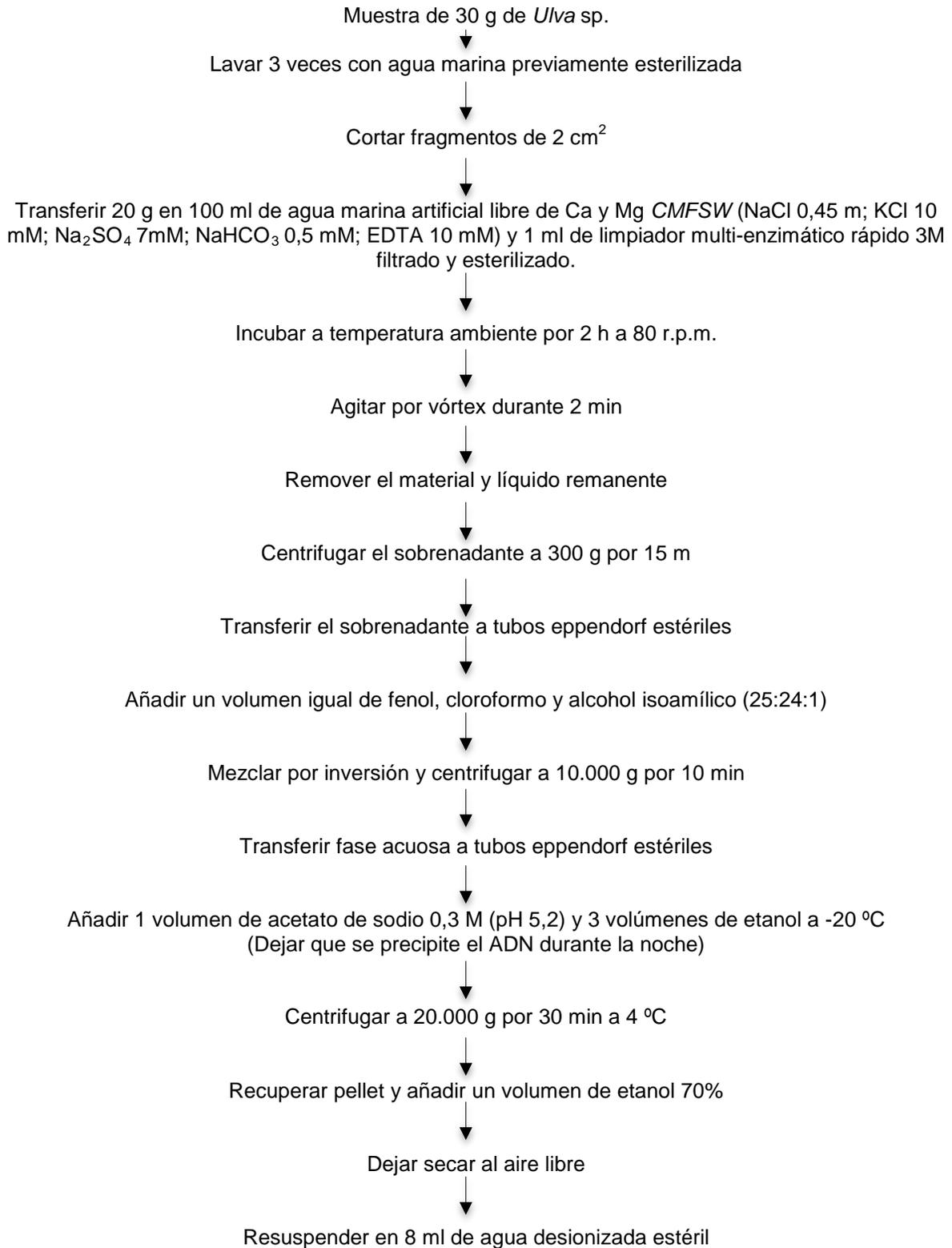


ANEXO C. Procedimiento de extracción de ADN empleando el kit *FastDNA® Spin Kit for soil* (MP Blomedicals) por Longford *et al.* (2007).





ANEXO D. Procedimiento de la extracción de ADN propuesto por Burke *et al.* (2009).



Añadir nuevamente un volumen de acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2) y 3 volúmenes de etanol
(Dejar que se precipite el ADN durante la noche a -20 °C)



Centrifugar a 20.000 g por 30 min a 4 °C

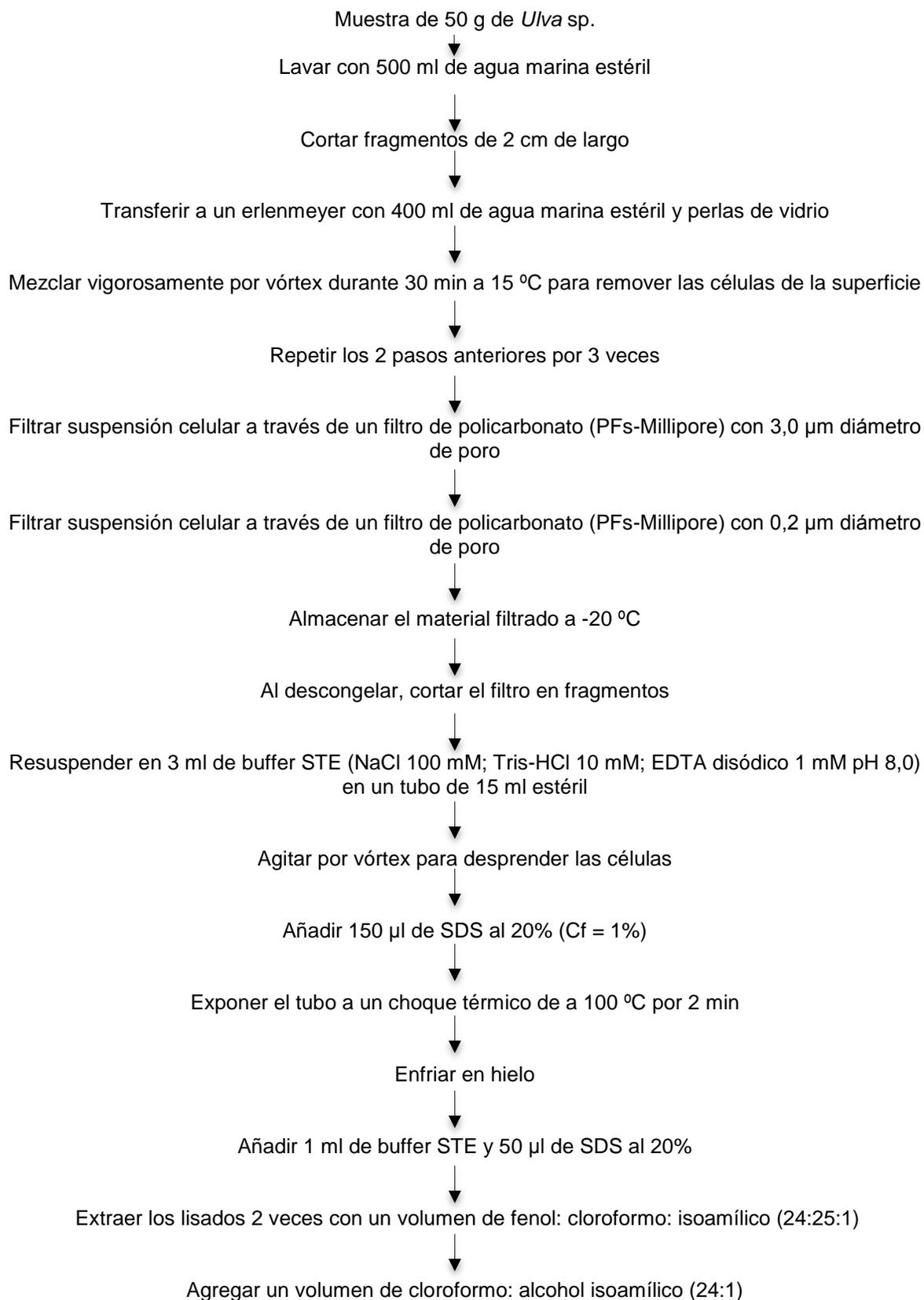


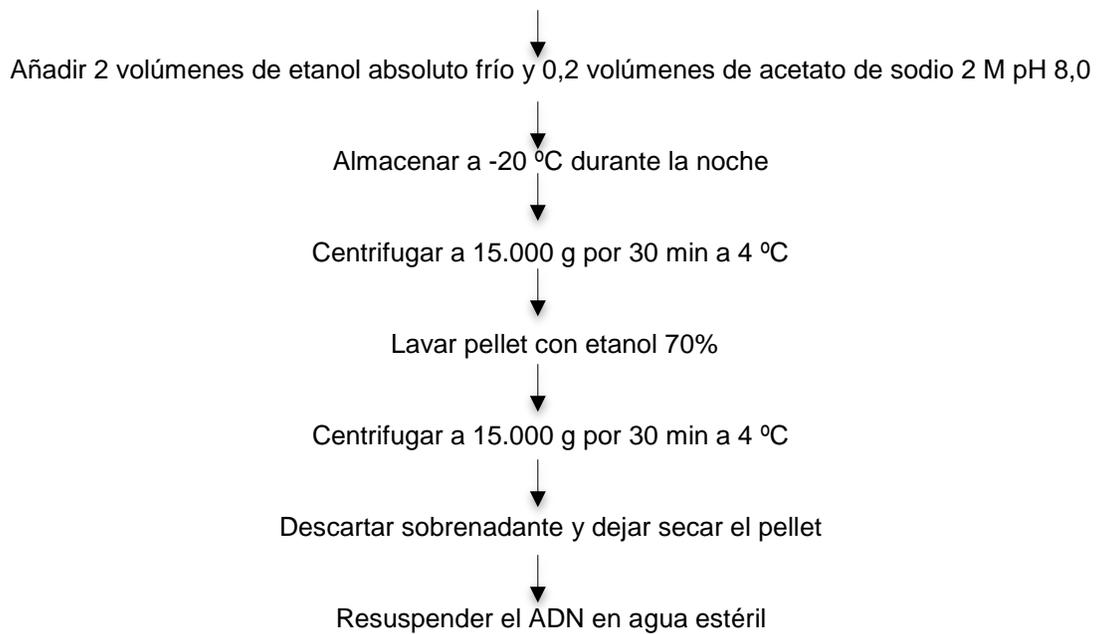
Resuspender el pellet en 1,4 ml de agua desionizada



Añadir RNAsa (0,2 mg/ml) a 4° C y dejar durante la noche

ANEXO E. Procedimiento de extracción de ADN empleado por Liu *et al.* (2011).





ANEXO F. Procedimiento de extracción de ADN empleando el *ZR Soil Microbe DNA Micro Prep™* (Zymo Research).

Añadir β -mercaptoetanol al *Soil DNA Binding Buffer* para obtener una dilución final de 0.5% (v/v)



Preparar los filtros *Zymo Spin™ IV-MHCR Spin Filters*



Añadir 0,25 g de muestra al *ZR Bashing Bead™ Lysis Tube* y 750 μ l de *Lysis Solution*.



Asegurar en un bead beater y procesar a máxima velocidad por el tiempo definido: 3 minutos con intervalos de 1.5 min en hielo



Centrifugar el *ZR Bashing Bead™ Lysis Tube* a 10.000 g por 1 min



Transferir 400 μ l del sobrenadante a un *Zymo Spin™ IV Spin Filter* en un tubo de colecta y centrifugar a 7.000 g por 1 min



Añadir 1200 μ l de *Soil DNA Binding Buffer* al filtrado en el tubo de colecta del paso anterior



Transferir 800 μ l de la mezcla del paso 5 a un *Zymo Spin™ IC Column* en un tubo de colecta y centrifugar a 10.000 g por 1 min



Descartar el flujo a filtrado en el tubo de colecta y repetir el paso anterior



Adicionar 200 μ l de *DNA Pre-Wash Buffer* al *Zymo Spin™ IC Column* en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10.000 g por 1 min



Añadir 500 μ l de *Soil DNA Wash Buffer* al *Zymo Spin™ IC Column* en un nuevo tubo de colecta y centrifugar a 10.000 g por 1 min



Transferir el *Zymo Spin™ IC Column* a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y añadir 20 μ l de *DNA Elution Buffer* directamente a la matriz de la columna



Centrifugar a 10.000 g por 30 s para extraer el DNA de la matriz



Transferir el DNA eluido del paso 10 directamente a la resina del filtro *Zymo Spin™ IV-MHCR Spin Filter* y centrifugar a 8.000 g por 1 min.



El DNA filtrado queda disponible para PCR y otras aplicaciones

ANEXO G. Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias epífitas de *U. lactuca*. Agar nueve sales –AVNSS– (Egan *et al.*, 2001) y agar marino 2215 Zobell Himedia® AM.

Componentes	Agar Nueve Sales (VNSS) (g/l)	Agar Marino 2216 (g/l)
Peptona	1,0	-
Digestión péptica de tejido animal	-	5,0
Extracto de levadura	0,5	1,0
Glucosa	0,5	-
NaCl	17,6	19,45
Na ₂ SO ₄	1,47	3,24
Na ₂ HPO ₄	0,01	0,008
Na ₂ O ₃ Si	-	0,004
NaHCO ₃	0,08	0,16
NaF	-	0,0024
KCl	0,25	0,55
KBr	0,04	0,08
FeSO ₄	0,01	-
MgCl ₂	1,87 *6H ₂ O	8,8
CaCl ₂	0,41 *2H ₂ O	1,0
SrCl	0,008 *6H ₂ O	0,034
H ₃ BO ₃	0,008	0,022
NH ₄ NO ₃	-	0,0016
Citrato férrico	-	0,1
Agar	15,0	15,0
pH final (25°C)	7,0	7,6 ±0,2

ANEXO H. Resultados del tamizaje funcional (*Screening*) de celulasas, lipasas y sideróforos sintetizados por bacterias epífitas de *U. lactuca*.

Cepa	Enzima o biomolécula detectada		
	Actividad lipolítica	Actividad celulolítica	Producción de Sideróforos
1	+	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+
5	-	-	+
6	+	-	-
7	+	+	-
8	+	-	+
10	-	-	+
11	+	-	+
15	+	-	-
17	-	+	+
21	+	-	-
22	+	+	+
25	-	-	+
26	+	-	+
27	+	-	+
29	-	+	-
31	-	-	+
32	-	-	+

(+) Actividad enzimática/ Producción de sideróforos

(-) Ausencia de actividad enzimática / Producción de sideróforos

Se resalta en rojo la cepa identificada con el no. 22, la cual además de presentar actividad para las enzimas evaluadas, mostró resultados positivos para la producción de sideróforos.

ANEXO I. Fotos de las 31 cepas aisladas.

