



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**DIVERSIDAD MICROBIANA DE BACTERIAS CULTIVABLES  
DEL ARCHIPIÉLAGO DE REVILLAGIGEDO, MÉXICO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**OSCAR TELLEZ CRUZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. TERESA GONZÁLEZ RUIZ**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA ESTADO DE  
MÉXICO, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

Agradecimientos: .....	3
Dedicatoria.....	4
Resumen.....	5
Introducción .....	6
Objetivos .....	13
General.....	13
Particulares.....	13
Justificación .....	13
Materiales y método.....	14
Área de estudio.....	14
Características de Isla Socorro .....	15
Muestreo de suelo .....	16
Características de isla Clarión.....	17
Muestreo de suelo.....	18
Trabajo de laboratorio.....	18
Obtención de bacterias cultivables para determinar la cantidad de UFC en suelo .....	18
Aislamiento y caracterización de las UTO.....	22
Identificación molecular de las UTO.....	22
Extracción de ADN.....	22
Amplificación de ADN.....	23
Análisis estadístico y de diversidad.....	24
Conformación de colección de UTO y cepas.....	25
Resultados.....	26
Resultados del conteo de UFC por isla y medio de cultivo .....	26
Isla Clarión medio ISP 2 para <i>Streptomyces</i> .....	26
Isla Socorro medio ISP 2 para <i>Streptomyces</i> .....	28
Isla Clarión en medio sin nitrógeno reducido.....	32
Isla Socorro en medio sin nitrógeno reducido.....	34
Caracterización bioquímica de las UTO para cada isla y conformación de colección de UTO y cepas .....	37
Cobertura de muestreo y riqueza efectiva por curvas de rarefacción.....	40
Diversidad de UTOs: por índices de Shannon y Simpson.....	47
Identificación taxonómica de UTO.....	47

Construcción de árbol filogenético.....	49
Discusión .....	51
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58

### Agradecimientos:

Las muestras de suelo de las islas Clarión y Socorro en el archipiélago de Revillagigedo se colectaron con los siguientes permisos: Oficio No. DICOPPU/211/1980/2016; con número de expediente SATI/PC/038/16, Oficio.-DIR.RBAR.-141/16; Expediente SIRCA: F00.1.DRPBCPN.01153/16; Oficios No. SGPA/DGVS/02920/15, SGPA/DGVS/04629/15, SGPA/DGVS/06898/15, SGPA/DGVS/12333/15, SGPA/DGVS/03574/16 y SGPA/DGVS/07492/16; Oficio SGPARN/UARRN/2958/14 y SGPARN/UARRN/2731/15.

Se agradece especialmente a la SEMAR por todo el apoyo logístico brindado, así como a SEGOB y la CONANP por los permisos y apoyo otorgados.

A la Dra. Noemí Matías Ferrer adscrita al Instituto de Ecología, A.C. por la recolecta de las muestras de suelo para el desarrollo de esta investigación y por la asesoría del uso de la herramienta BLAST para la alineación de las secuencias de ADN y su posterior identificación molecular.

Al Dr. Juan Esteban Martínez, adscrito al Instituto de Ecología, A.C. por las gestiones realizadas para la recolecta y traslado de muestras de suelo para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala y por las asesorías en el análisis y discusión de los resultados.

A la M. en C. Laura Mondragón Camarillo del Laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, por el apoyo y asesoría para la extracción de ADN y el análisis de las secuencias.

A la Dra. Teresa González Ruiz del Laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, por el apoyo y asesoría para la realización de esta tesis.

A la Dra. Mayra Mónica Hernández Moreno, el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo y al Dr. Miroslav Masek por el apoyo, asesorías y comentarios para la elaboración de esta tesis.

Esta tesis fue financiada con recursos de la UNAM, a través del Proyecto PAPPIT IN222618 “Diversidad y actividad biológica de actinobacterias del suelo de Zapotitlán: aislamiento, identificación y conservación de un banco de germoplasma”

### Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mi familia: a mi mamá Mago quien siempre me ha apoyado e impulsado a realizar todo lo que me propongo con sus palabras de aliento y su constante presencia la cual siempre me ha dado soporte para seguir; a mi padre Andres quien siempre estuvo conmigo en la toma de mis decisiones dándome esas palabras de aliento llenas de confianza que todo hijo necesita para poder seguir adelante y a mi muy querida hermana Miriam que siempre ha estado a mi lado cuidándome, apoyándome y guiándome para siempre dar lo mejor de mí y para siempre llegar más lejos.

## Resumen

Las comunidades microbianas participan en casi todos los procesos que hacen habitable la Tierra, presentan una amplia distribución, ocupando múltiples sustratos y ambientes. México posee cerca de mil islas, pero la investigación sobre sus comunidades microbianas de suelos es muy escasa. En este contexto, la pregunta de investigación de esta tesis fue ¿Cuál es la diversidad de bacterias cultivables presentes en los suelos de la isla Clarión y Socorro en el archipiélago de Revillagigedo?

Entre 2016 y 2017, se colectaron 5 y 4 muestras de suelo en isla Socorro e isla Clarión respectivamente. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, donde se les determinó la cantidad y diversidad de UFC de bacterias cultivables utilizando dos medios de cultivo: ISP 2 para *Streptomyces* y medio sin nitrógeno reducido. Se utilizaron curvas de rarefacción para estimar la cobertura del muestreo y la cantidad de morfologías coloniales diferentes esperadas en cada muestra de suelo. Se calcularon los índices de diversidad de Shannon y Simpson para las UFC en cada medio de cultivo y en cada isla. Se realizó la caracterización bioquímica y la identificación molecular de las UFC purificadas.

Se encontró una mayor cantidad de UFC en los suelos de isla Clarión, comparada con los de isla Socorro. En cuanto al tipo de medios de cultivo, para ambas islas se presentó mayor cantidad de UFC y valores de los índices de Shannon y Simpson en el medio para *Streptomyces*, comparado con el medio libre de nitrógeno reducido. Las curvas de rarefacción indicaron que, en la mayoría de los casos, la cobertura de muestreo de suelo fue suficiente para capturar a las diferentes morfologías coloniales de los suelos de cada isla en función del número de UFC contabilizadas. Se obtuvieron en total 159 aislamientos bacterianos de los cuales se caracterizaron 80 con pruebas bioquímicas, y se identificaron 36 secuencias de ADN: 31 pertenecientes al filo Actinobacteria y 5 al Filo Firmicutes. Las actinobacterias dominantes fueron las del género *Streptomyces*. Las bacterias aisladas presentaron diferente capacidad de crecimiento y propiedades funcionales, dependiendo de las condiciones de cultivo.

Es necesario profundizar en el estudio de la diversidad microbiana de los sistemas insulares, debido a que tienen características que no se presentan en los ecosistemas terrestres. La información de la dinámica microbiológica puede aportar elementos para la toma de decisiones sobre el manejo de los suelos en estos ecosistemas.

## Introducción

La biodiversidad se define como el conjunto de todos los seres vivos del planeta, el ambiente en el que viven, la relación que guardan con otras especies y la amplia cantidad de genes que poseen, resultado de procesos y patrones ecológicos y evolutivos irrepetibles. Este término surgió como una contracción del término diversidad biológica y fue utilizado por Walter G. Rosen en 1985 en el marco de la primera reunión de planeación del Foro Nacional sobre la BioDiversidad de Estados Unidos. Este foro se llevó a cabo en Washington un año después, centrando sus temas en la degradación del ambiente, en la diversidad biológica y por ende en la importancia de su conservación (Halffter, 1994; Pérez-Mesa, 2013).

Debido a la complejidad conceptual inmersa en el término *diversidad biológica*, su estudio se dividió en 3 niveles: diversidad de genes, de especies y de ecosistemas. La diversidad genética está contenida dentro y entre la diversidad de especies, y ambas a su vez, están contenidas dentro de la diversidad de ecosistemas. Sin embargo, esta complejidad también se relaciona con los diferentes enfoques con los cuales se puede estudiar a la biodiversidad, dependiendo del contexto en que se le menciona como por ejemplo desde la perspectiva de la política ambiental, o desde el ámbito social o científico (Núñez *et al.*, 2003). A su vez, en este último aspecto de la investigación científica hay múltiples enfoques. Inició como una combinación de varias disciplinas como la ecología, la evolución, la taxonomía y la paleobiología, pero después éstas mismas se fueron relacionado y apoyando entre sí, lo que ha permitido tener una mejor comprensión de la biodiversidad (Rillig *et al.*, 2015).

Desde la perspectiva ecológica, la diversidad biológica se puede abordar tomando como base a los diferentes niveles de organización que van desde individuos, pasando por poblaciones, comunidades y cerrando en ecosistemas. Las poblaciones se definen como un grupo de organismos que pertenecen a la misma especie y que interactúan unos con otros. Las comunidades son definidas como un grupo de diferentes poblaciones de especies, es decir poblaciones de organismos que están localizados en un área y en un tiempo determinados, y que interactúan directa o indirectamente independientemente de su identidad taxonómica. Por último, los ecosistemas son el conjunto de especies que se encuentran en un área y que interactúan con su ambiente, conformando un sistema que se

autorregula energéticamente debido a las interacciones entre el ambiente biótico y abiótico (Smith y Smith, 2007; Krebs, 2008).

Cada uno de los diferentes niveles de organización ecológica tiene propiedades emergentes particulares o intrínsecas. Por ejemplo, para las poblaciones, estas propiedades son el tamaño de la población, la densidad poblacional, los patrones de distribución de los organismos y los parámetros demográficos como la tasa de natalidad, tasa de mortalidad, tasa de emigración y tasa de inmigración. Para las comunidades, las propiedades emergentes son las formas de vida, la composición específica, la riqueza de especies, las abundancias relativas, la dominancia y diversidad específica; y para los ecosistemas, sus propiedades emergentes son la estructura, la función, la homeostasia, la resiliencia y la diversidad. Es por esto que los estudios ecológicos de poblaciones y comunidades, aun cuando su enfoque principal son los componentes vivos y las diferentes propiedades emergentes de cada nivel, también pueden tener enfoques en las partes abióticas del ambiente, pues con esto se complementa la información y se generan explicaciones sobre diferentes situaciones en las poblaciones o comunidades (Bowman, 2017).

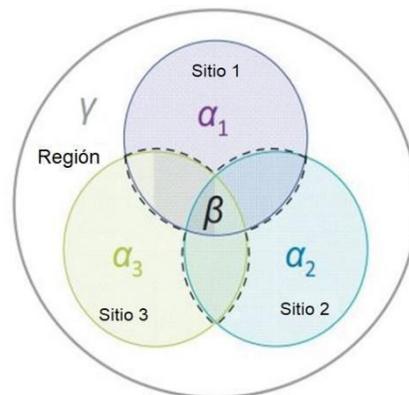
Dentro de las propiedades emergentes, la diversidad biológica cae de manera directa dentro de las comunidades, y su estudio se puede realizar de manera sencilla resumiendo una gran cantidad de información a través del análisis de los dos componentes de la diversidad: a) la riqueza de especies, que es el número de especies diferentes en una comunidad particular; y b) la abundancia relativa, que se considera como la proporción de una especie respecto de todas las especies contenidas en un sitio y cuan común o rara puede ser, en comparación con otras especies (Bravo-Nuñez, 1991). Junto con el estudio de la riqueza y abundancia de las especies, el estudio de la diversidad puede hacerse a través del análisis de las denominadas diversidad alfa, beta o gama (Figura 1).

-La diversidad alfa se refiere a la cantidad de especies presentes en un lugar o muestra. Generalmente se mide a través de la riqueza de especies y de la distribución de especies, sin embargo, la riqueza de especies encontrada es altamente dependiente del esfuerzo de muestreo. Para disminuir la influencia de este factor, es necesario utilizar estimadores de riqueza como el índice de Chao o ACE (Abundance-based coverage estimator) el cual se basa en el número de individuos colectados, y con esto se estima la proporción de la

comunidad que fue muestreada, y se complementa con la cuantificación de la dominancia de las especies con el índice de Simpson.

-La diversidad beta mide las diferencias entre las especies de dos o más puntos, comunidades o paisajes. Estas variaciones pueden medirse en escala espacial o temporal, donde la categoría de tipo espacial se refiere a estudios en zonas diferentes en un mismo periodo de tiempo, mientras que la de tipo temporal se refiere a un estudio en una misma zona, pero en un tiempo diferente. Puede reportarse considerando únicamente la composición de especies, para lo cual se utilizan índices de similitud como los de Jaccard o Sørensen

-La diversidad gama es la cantidad de especies del conjunto de localidades o comunidades que forman parte de un paisaje. La unidad de paisaje puede ser una localidad de amplio espacio o una región formada por ecosistemas que comparten condiciones ambientales e historia biogeográfica común (Halffter y Moreno 2005, Sofía, 2013).



**Figura 1:** Representación de las 3 diversidades. Diversidad Alfa ( $\alpha$ ) representada por los círculos de colores. Diversidad Beta ( $\beta$ ) representada por la línea punteada en la intersección de los círculos. Diversidad Gama ( $\gamma$ ) representada por el círculo exterior (tomado de Zinger *et al.*, 2012).

La diversidad de especies dentro de las comunidades es un tema central en ecología debido a que conecta directamente el funcionamiento de los ecosistemas, por ejemplo, la tasa fotosintética o el reciclaje de nutrientes con los componentes bióticos que participan en estas funciones dentro de una comunidad determinada. Por ello, es necesario realizar medidas adecuadas de la diversidad que permitan generar información sobre sus

tendencias de cambio a través de gradientes ambientales naturales o como producto de la actividad humana (Moreno *et al.*, 2011).

Los estudios más básicos sobre diversidad de especies involucran el recuento de la riqueza de especies, es decir cuántas especies hay en un determinado lugar y tiempo (diversidad alfa). A nivel planetario tenemos un conocimiento muy limitado sobre el número de especies, aun cuando las descripciones biológicas iniciaron desde el siglo XVII. Se estima que actualmente existen entre 1.5 a 2 millones de especies en el planeta (CONABIO, 2021), que incluyen microorganismos, animales y plantas, siendo los insectos, los vertebrados y las plantas superiores los grupos más conocidos, mientras que el resto de los grupos se considera mal o muy mal explorados (Ortega, 2020).

Sin embargo, aunque los estudios de diversidad son más numerosos en los macroorganismos, se sabe que la mayor diversidad biológica se encuentra en los microorganismos como bacterias, hongos, algas y protistas. Esto se explica principalmente por su historia evolutiva y su rápida capacidad para adaptarse a los cambios ambientales (Capello *et al.*, 2000).

De manera particular, los estudios sobre la diversidad microbiana tienen alta relevancia debido a que los microorganismos participan en casi todos los procesos que hacen habitable la Tierra, como la regulación climática, el control de ciclos biogeoquímicos a partir de los cuales los nutrientes se vuelven biodisponibles para los productores primarios, así como la transferencia de estos nutrientes a los niveles superiores de las redes tróficas. Esto permite el establecimiento de las comunidades vegetales que, a su vez, sirven de hábitat y fuente de energía para las comunidades animales (Escalas *et al.*, 2019). Es por ello que el estudio de las comunidades microbianas del suelo y de sus propiedades biogeoquímicas se vuelve fundamental para comprender las dinámicas dentro del ecosistema completo (Ferrera y Alarcón, 2001).

Dentro de las comunidades microbianas, las bacterias desarrollaron una gama de metabolismos que surgieron como adaptación a los diferentes ambientes terrestres o marinos en donde se encontraban, lo cual les permitió aprovechar diferentes fuentes de energía. Por ejemplo, las bacterias que utilizan la luz se denominan fotótrofas como *Chromatium* o *Rhodospirillum*; las que utilizan compuestos orgánicos se denominan quimioorganótrofas como *Escherichia coli* y las que utilizan compuestos inorgánicos son llamadas quimiolitotróficas como *Thiobacillus* o *Nitrosomonas* (Lucena 2012; Romero *et al.*,

2012). Esta diversidad metabólica es uno de los aspectos que explican que hasta el momento sólo se haya podido cultivar aproximadamente el 1% de los microorganismos y que para el 99% restante no ha sido posible su cultivo por métodos tradicionales de aislamiento ya que existe el desconocimiento de los requerimientos nutricionales básicos y las condiciones ambientales mínimas necesarias para poder simular su ambiente natural (Parera-Valadez *et al.*, 2019) y detonar su crecimiento *in vitro*. Derivado de esta situación, desde hace años se están implementado otro tipo de técnicas que permiten generar otro tipo de información de las especies microbianas presentes en el ambiente, tal es el caso de las técnicas moleculares que permiten la secuenciación del ADN directamente de los microorganismos, o de muestras de suelo (Custodio *et al.*, 2021), agua (Álvarez, 2017) o sedimentos (García, 2016).

Las técnicas de cultivo clásicas están limitadas por el bajo número de microorganismos que pueden ser cultivados, y porque no proporcionan información de tipo molecular, pero tienen la enorme ventaja de generar información sobre la fisiología, el metabolismo y los requerimientos nutrimentales y ambientales en los cuales se puede desarrollar el microorganismo, su forma colonial y celular y el tiempo de crecimiento; e incluso permiten observar interacciones *in vivo* (Rivera-Cruz *et al.*, 2002) imposibles de detectar si solo se extrae el ADN, ya sea de los propios microorganismos o del ambiente en el que se encuentran (Ospino *et al.*, 2017). Así mismo, el cultivo de los microorganismos permite analizar la degradación de ciertos contaminantes agregados a los medios de cultivo y la posibilidad de purificar metabolitos secundarios resultantes del metabolismo microbiano como los antibióticos. Esta información puede servir de base para aplicaciones biotecnológicas o de biomedicina en las cuales el conocimiento de las condiciones del crecimiento y funcionalidad microbiana es fundamental.

Por otro lado, las técnicas de tipo molecular permiten conocer la identidad taxonómica de los organismos por su ADN, así como la diversidad bacteriana de muestras ambientales sin la necesidad de cultivarlas, incluso teniendo la precisión de encontrar grupos específicos con el uso de *primers* adecuados, además que permiten tener resultados en un periodo de tiempo mucho menor (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

Es importante remarcar que ambos tipos de técnicas (tradicionales de cultivo y moleculares) generan diferente tipo de información, y por lo tanto se pueden considerar complementarias. Esto permite que su uso conjunto ayude a describir de mejor manera la diversidad microbiana de distintos ambientes terrestres y acuáticos. Sin embargo, aún con el uso de

ambos tipos de técnicas, se está muy lejos de tener un catálogo completo de la diversidad microbiana en el planeta por lo que es necesario profundizar en su estudio (Fierer y Lennon, 2011; Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

Los estudios de ecología de microorganismos presentan ciertas similitudes con los estudios ecológicos de macroorganismos, por ejemplo, pueden funcionar como indicadores biológicos ante perturbaciones ambientales naturales o antropogénicas, o presentar patrones de distribución biogeográfica determinada por la dispersión y heterogeneidad ambiental debida a factores como el pH, la productividad del sistema, u otras modificaciones ambientales derivadas de la actividad humana (Yanez-Montalvo *et al.*, 2020).

En la mayoría de los ecosistemas, las comunidades microbianas presentan una amplia distribución, ocupando diferentes tipos de sustratos y ambientes (Scervino *et al.*, 2014). De manera particular, el suelo es un ambiente con una amplia actividad biológica. El suelo es un sistema altamente complejo compuesto por una mezcla de diferentes proporciones de arenas, limos, arcillas, materia orgánica en diferente estado de descomposición, agua, aire y organismos vivos. En el suelo, las bacterias son los microorganismos más abundantes pues se les encuentra en un rango aproximado de  $10^6$  a  $10^8$  células por gramo de suelo (Calvo *et al.*, 2008). En microbiología las UFC son utilizadas como una unidad de medida para la cuantificación de los microorganismos es decir conocer la cantidad de bacterias o células viables presentes en una muestra líquida o sólida (Bennington, 1999). Para algunas bacterias Gram+ se han reportado valores poblacionales de  $2 \times 10^6$  UFC/g de suelo seco, mientras que para bacterias Gram- de  $2.5 \times 10^6$  UFC/g de suelo seco (Chaves-Bedoya, 2013). En contraste, ciertos grupos de hongos se encuentran entre  $1.5 \times 10^3$  a  $30 \times 10^6$  UFC por g de suelo seco (Almaguer, 2009).

En México se han realizado diversos estudios sobre la diversidad microbiana de los suelos de diferentes ecosistemas. Por ejemplo, Montaña *et al.* (2012) comparó la cantidad de bacterias cultivables del suelo del bosque tropical seco de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, Jalisco, México durante la temporada de lluvias y sequía. Encontró que algunos grupos bacterianos tenían un mayor crecimiento en época de lluvias, y que otros se mantienen en rangos similares en ambas épocas. Otros estudios se han enfocado en entender los cambios en la abundancia de las bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de derrames de petróleo. En este contexto, Rivera-Cruz *et al.* (2002) usaron técnicas de cultivo clásicas con medios nutritivos y obtuvieron que el cambio

en las condiciones de humedad y de salinidad provocado por los derrames, impedía el crecimiento de algunos grupos de bacterias y de otros microorganismos, causando su disminución, comparado con suelos no contaminados.

Otro tipo de estudios se han enfocado en probar diferentes técnicas para obtener una mejor extracción de la comunidad de bacterias. [Fernández-Rendón y Barrera-Escorcía \(2013\)](#) reportaron que las técnicas de acción química fueron más eficaces que las técnicas acción mecánica para extraer a la comunidad de bacterias de sedimentos lacustres.

Como se puede observar en los ejemplos anteriores, los estudios sobre diversidad microbiana del suelo que se han desarrollado en México son de temáticas diversas y con el uso de técnicas diferentes, dependiendo de los objetivos de cada trabajo. De manera particular, los estudios sobre la diversidad de bacterias en donde se complementen las técnicas tradicionales y moleculares resultan escasos. El trabajo desarrollado por [Rivera-Cruz et al. \(2002\)](#) sobre las comunidades bacterianas de suelos contaminados es un ejemplo de este tipo de enfoques. Esta situación de escasez de información se profundiza para los suelos pertenecientes a los sistemas insulares nacionales.

México posee cerca de mil islas principales, las cuales en conjunto tienen una superficie de 5,127 km<sup>2</sup>, equivalentes al 0.3% del total del territorio nacional continental ([Aguirre-Muñoz et al., 2010](#)); sin embargo, a pesar de su poca extensión, son reconocidas mundialmente por contener una gran diversidad de especies y una gran cantidad de endemismos ([Ortiz-Alcaraz et al., 2017](#)).

En el Pacífico mexicano se encuentra el archipiélago Revillagigedo constituido por cuatro islas de origen volcánico: Socorro, Clarión, San Benedicto y Roca Partida ([Lara-Lara et al. 2008](#)). La estructura física del archipiélago lo convierte en una red de nodos de conectividad biológica de especial relevancia para la biota marina, y gracias a las investigaciones científicas realizadas hasta el momento, se ha obtenido información valiosa sobre su biodiversidad y las condiciones excepcionales en las que ha evolucionado la vida en ese lugar. Algunos de los estudios realizados en este sistema se refieren a los siguientes grupos biológicos: aves ([Baptista y Martínez, 2002](#); [González-Zamora et al., 2016](#)), reptiles ([Mulcahy et al., 2014](#)) composición florística ([Flores-Palacios et al., 2009](#)), crustáceos ([Sanvicente-Añorve et al., 2010](#)), peces cartilaginosos y óseos ([Fourrière et al., 2016](#); [Schaefer et al., 2014](#)), corales ([Ketchum y Reyes, 2001](#)) y algunos microorganismos, como fitoplancton ([Gárate-Lizárraga et al., 2018](#)) y parásitos ([Carlson et al., 2013](#); [Yanga et al.,](#)

2011). Respecto de las comunidades microbianas del suelo, [Quintanar et al. \(2022\)](#), reportaron la abundante presencia de actinobacterias del género *Streptomyces* en el suelo de isla Socorro. Considerando la poca información sobre los microorganismos del suelo para los sistemas insulares mexicanos, el presente proyecto de tesis estuvo enfocado a explorar la diversidad microbiana de dos de las islas del archipiélago Revillagigedo. En este contexto se propuso como pregunta de investigación ¿Cuál será la diversidad de bacterias cultivables presentes en los suelos de la isla Clarión y Socorro?

## Objetivos

### General

Explorar la diversidad de bacterias cultivables del suelo de las islas Clarión y Socorro en dos medios de cultivo con diferentes características nutrimentales.

### Particulares

- Aislar mediante resiembras sucesivas, diversas Unidades Taxonómicas Operativas (UTO) representativas de la diversidad bacteriana cultivable obtenidas del suelo de cada isla, en dos medios de cultivo.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente las UTO que fueron aisladas en cada medio de cultivo.
- Determinar y comparar la diversidad (abundancia y riqueza) de UTO del suelo de las islas Clarión y Socorro obtenidas en dos medios de cultivo.
- Identificar con herramientas moleculares las UTO que previamente fueron caracterizadas morfológica y bioquímicamente.
- Conformar un cepario con las UTO aisladas, caracterizadas e identificadas.

### Justificación

La diversidad microbiana en sus componentes riqueza y abundancia contiene en sí misma una gran cantidad de información respecto del estado de una comunidad o ecosistema. Esta información incluye entre muchos otros aspectos, la regulación de la velocidad de degradación de la materia orgánica y su relación con la abundancia y composición de las comunidades de microorganismos presentes en una escala pequeña, hasta la regulación de los ciclos biogeoquímicos del ecosistema completo.

De esta manera, los estudios de diversidad microbiana en sistemas frágiles como las islas, toman particular importancia, ya que estos sistemas concentran un gran número de endemismos y funcionan como espacios de refugio para organismos tanto terrestres como acuáticos. En México, los estudios ecológicos de microorganismos de suelos de islas son prácticamente inexistentes, a pesar de que poseemos como país un gran número de islas con alto nivel de diversidad. Por ello, la importancia de este trabajo radica en explorar la diversidad de bacterias cultivables de dos islas (Clarión y Socorro) pertenecientes al archipiélago Revillagigedo, que es un sistema que ha sido poco perturbado por la actividad humana.

## Materiales y método

### Área de estudio

El archipiélago de las Islas Revillagigedo se encuentra situado en el Océano Pacífico Nororiental entre los 18°20' N a 19° 20' N y los 110° 45' a 114° 50' O. Es la porción del territorio mexicano más alejado del macizo continental del país. Esta lejanía incrementa casi al doble la extensión de la Zona Económica Exclusiva de México en esa región (Lara-Lara *et al.*, 2008). Aunque esta lejanía ha impedido el establecimiento de asentamientos humanos permanentes, con excepción de una base ocupada por personal de la Secretaría de Marina, la introducción de animales como cerdos, borregos, conejos, gatos y ratones ha perturbado la vegetación y fauna nativa de las islas. Diversas instituciones como la SEMAR y SEMARNAT a través de la CONANP y la CONABIO, además de otras instancias de índole académico y fundaciones nacionales e internacionales han realizado esfuerzos importantes para erradicar a los cerdos y borregos de las islas Clarión y Socorro desde 2010, lo cual ha permitido la recuperación de la parte de la vegetación; sin embargo aún se mantienen conejos y gatos que se encuentran en proceso de manejo y erradicación (INECC, 2007; CONANP, 2019; Ortiz-Alcaraz *et al.*, 2019).

El archipiélago Revillagigedo está integrado por cuatro islas de origen volcánico que de mayor a menor superficie son: Socorro, Clarión, San Benedicto y Roca Partida (Lara-Lara *et al.* 2008; Figura 2). Fue declarado Área Natural Protegida con carácter de Reserva de la Biosfera desde 1994 y en 2017 se cambió su categoría a Parque Nacional. En el plano internacional, el archipiélago forma parte de los sitios RAMSAR desde 2004 y Patrimonio Mundial Natural de la Humanidad desde 2016 (CONANP 2019, UNESCO 2019).



**Figura 2.** Mapa de México con algunos de sus sistemas insulares

Debido a la dificultad inherente para ingresar a las islas (distancia, presupuesto y pertenencia al Sistema de Áreas Naturales Protegidas de México, lo cual restringe los permisos de colecta de material biológico), el suelo utilizado en el presente proyecto fue muestreado en Isla Clarión e isla Socorro en diferentes fechas y con diferente diseño de muestreo por personal del Instituto de Ecología A.C. (INECOL) y donadas al Laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala.

### Características de Isla Socorro

Isla Socorro es la isla más grande del archipiélago. Se localiza en las coordenadas 18°47'04"N, 110°58'30"O (Figura 2), cuenta con una superficie total de 131.86 km<sup>2</sup> y se encuentra a una distancia de 390 km al este de isla Clarión, a 465 km al suroeste de Cabo San Lucas y a 690 km al oeste del puerto de Manzanillo. Tiene un clima árido cálido con temperatura media anual de 24.7° C, la mayor parte de la precipitación pluvial ocurre entre julio-octubre y existe una época de sequía muy marcada entre febrero y junio. La isla es un gran volcán por lo cual la mitad septentrional está integrada por derrames de lava y piroclastos asociados con el Volcán Evermann. Poco a poco, a través de siglos, se creó

una gran plataforma y se agruparon fragmentos de rocas vítreas. Las lavas se enfriaron rápidamente por el contacto con el agua y con el tiempo se produjeron corrientes de lavas compactas, algunas con estructura prismática de formas pentagonales o hexagonales. Posterior a la constitución terrestre de Isla Socorro, en la región continental ocurrieron movimientos que ocasionaron la sumersión de la isla bajo el nivel del mar, por lo cual está parcialmente sumergida (CONANP, 2004).

Los suelos en isla Socorro son producto del intemperismo y erosión de las rocas volcánicas y de los procesos de sedimentación marina. En esta isla predominan los litosoles como el suelo más abundante, abarcando un 50.6% del territorio insular, localizados en el cuadrante norte-centro, oeste y suroeste. Estos suelos son muy delgados y sobreyacen directamente a la roca, por lo que no presentan horizontes. En segundo término, se localizan los andosoles desde la parte centro-este de la isla hasta la porción centro-sur. Estos suelos son derivados de vidrio volcánico y tienen una muy baja densidad aparente, lo que los hace fácilmente erosionables. Finalmente, en tercer lugar, se localizan los luvisoles que se encuentran en el sur y sureste de la isla, generalmente presentan colores rojizos a causa de la oxidación del hierro que contienen y se caracterizan por ser suelos maduros que tienen un elevado contenido de arcilla en el horizonte "B". Esta característica hace que estas unidades sean fácilmente erosionables (CONANP, 2004).

Respecto de los tipos de vegetación, una de las primeras descripciones la realizó Faustino Miranda en 1960. En este trabajo se definieron siete tipos de vegetación siguiendo la variación altitudinal de la costa a lo alto del Volcán Evermann: agrupaciones de halófitas costeras, matorral de crotón, matorral de guayabillo, selva de higueras o amates con o sin guayabillo, selva subperennifolia de zapotillo-guayabillo, matorral de dodonea y praderas (CONANP, 2004; Flores-Palacios *et al.*, 2009). En un estudio más reciente, Flores Palacios *et al.* (2009) reportaron agrupaciones de halófitos costeros, matorral de *Conocarpus*, pastizal, pradera, matorral de *Croton masonii*, matorral de *Pteridium-Dodonaea*, bosque tropical caducifolio, bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña.

#### Muestreo de suelo

Las muestras de suelo de isla Socorro fueron tomadas en cinco sitios ubicados en diferentes comunidades vegetales (Tabla 1): bosque de *Ficus* (sitio 1), bosque de *Croton* como especie dominante (sitio 2), bosque mesófilo ubicado al norte del volcán Evermann (sitio 3), bosque mesófilo ubicado al sureste del volcán Evermann (sitio 4), bosque mesófilo al

sureste del volcán Evermann (sitio 5). El muestreo se realizó entre la última semana de diciembre de 2016 y la primera semana de enero de 2017 (Matias-Ferrer, N., Com. Pers)

-	Localidad	Ubicación dentro de la isla	Vegetación	Altitud (msnm)	Coordenadas	Fecha
S1	Campamento Paradero	Sur de isla Socorro	Bosque <i>Ficus</i>	450	18 46.030 N 110 57.268 W	25-dic-16
S2	Grutas		Bosque de <i>Croton</i>	550	18 44.976 N 110 57.065 W	28-dic-16
S3	Campamento Norte	Norte de isla Socorro	Bosque mesófilo	841	18 48.068 N 110 58.429W	30-dic-16
S4	Volcán Evermann	Sureste del Volcán Evermann	Bosque mesófilo	850	18 47.462 N 110 58.161 W	03-ene-17
S5	Campamento Péricos		Bosque mesófilo	600	18 46.888 N 110 57.339 W	03-ene-17

**Tabla 1.** Características de los puntos de muestreo en isla Socorro

### Características de isla Clarión

Isla Clarión se localiza en las coordenadas 18°21'32"N, 114°43'19"O (Figura 2), cuenta con una superficie total de 19.67 km<sup>2</sup> y se encuentra a 710 km al suroeste de Cabo San Lucas, Baja California y a 1,100 km al oeste del puerto de Manzanillo, Colima. Al igual que en Socorro, las temperaturas medias anuales en general son cálidas, superiores a los 22°C y la temperatura del mes más frío es superior a los 18°C. Isla Clarión se formó con material de erupciones volcánicas entre el Mioceno y Eoceno. En esta isla es posible observar una secuencia de basalto de más de 60 m con abundantes fenocristales de labradorita, lo cuales constituyen hasta 50% de este tipo de roca. A pesar de ser una isla de origen volcánico, los sedimentos predominantes son de origen marino, y en su fracción arenosa incluyen corales, conchas de pelecípodos y gasterópodos. También hay presencia de rocas volcánicas, cuarzos, feldspatos y vidrios con trazas de magnetita y hematita. La abundante presencia

de estos sedimentos sugiere que en la isla predomina el intemperismo físico sobre el químico (CONANP, 2004).

Los estudios de suelo para isla Clarión son escasos; sin embargo, Vivó *et al.* (1977) indicaron que las partes sur y centro-sur de la isla, se caracterizan por la presencia de suelos migajonosos limosos, mientras que, en la porción sur en la zona costera, los suelos son migajón- arcillo - arenosos.

La vegetación se compone de un número reducido de especies, comparada con Isla Socorro, las cuales crecen sobre terrenos en extremo irregulares. La mancha vegetal aparece dispersa, y está compuesta por arbustos, pastos y diversas especies arbóreas de un aspecto achaparrado. La altura de los arbustos no sobrepasa los 4 m y existe un número considerable de plantas anuales cuyo ciclo de vida está restringido a la cantidad de lluvia. Según Miranda y Hernández (1963), Clarión conserva cuatro tipos principales de vegetación: pastizal, matorral de hierba de mula, amate y nopalera (CONANP, 2004; Flores-Palacios *et al.*, 2009).

### Muestreo de suelo

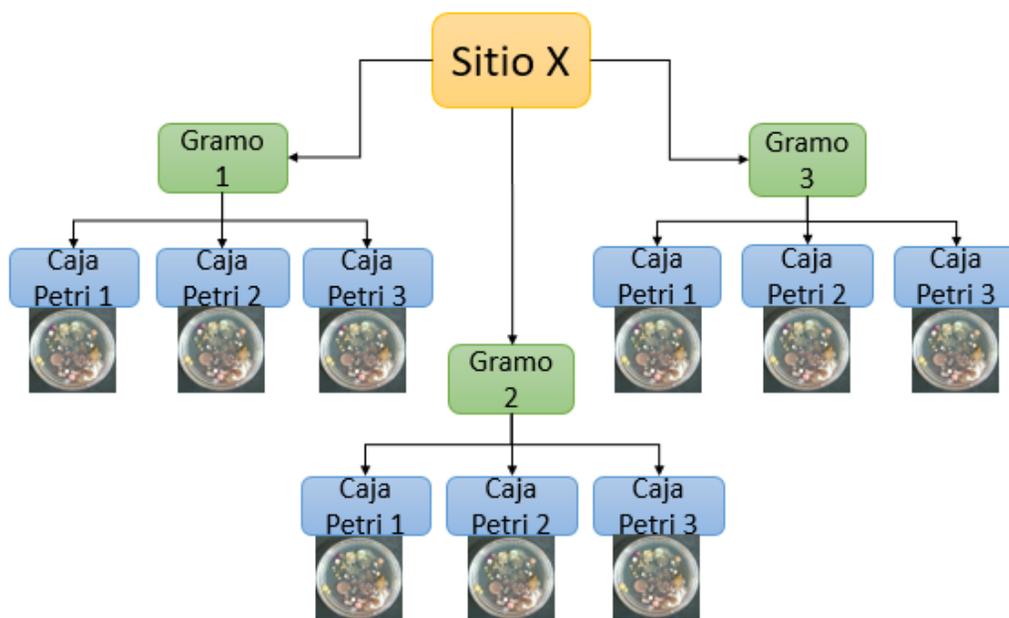
En Isla Clarión se colectaron cuatro muestras de suelo de aproximadamente 300 g con un nucleador de PVC de 7 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. Los sitios de muestreo se ubicaron entre los 182 y 200 msnm, inmersos dentro de una zona de anidación de pájaros bobo (*Sula* sp). Toda la zona de colecta de suelo tenía como vegetación dominante a arbustos del género *Karwinskia* y a una leguminosa rastrera. El muestreo se realizó en la primera semana de noviembre de 2017.

### Trabajo de laboratorio

#### Obtención de bacterias cultivables para determinar la cantidad de UFC en suelo

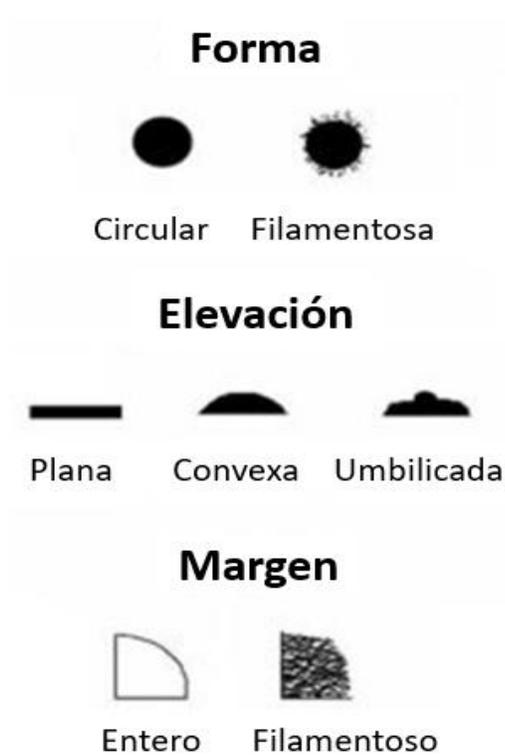
Para todas las muestras de suelo colectadas en ambas islas (cinco para Socorro y cuatro para Clarión), la obtención de las bacterias cultivables se realizó por el método de dilución en placa. El procedimiento general consistió en homogeneizar en un vórtex un gramo de suelo (peso húmedo) en 9 ml de agua destilada estéril durante un minuto y dejar reposar durante 5 minutos. El sobrenadante se utilizó para hacer diluciones sucesivas hasta llegar

a  $10^{-3}$ . Este procedimiento se repitió por triplicado (3 submuestras de 1 g por cada muestra de suelo) para las 5 muestras de isla Socorro (N=5) y las 4 muestras de isla Clarión (N=4). A su vez, a partir de cada una de las tres diluciones de  $10^{-3}$  (cada submuestra) se sembraron por triplicado 20  $\mu$ l en cajas Petri con dos medios de cultivo diferentes: medio libre de nitrógeno reducido (Rennie, 1981 modificado en el laboratorio de Ecología Microbiana, UBIPRO, UNAM) y medio 5265 ISP 2 para *Streptomyces* (Shirling y Gottlieb, 1966; Wink, 2020). Este sistema de réplicas se realizó con el fin de capturar la mayor diversidad cultivable de bacterias del suelo de las islas (Figura 3). Las placas se incubaron a 28°C durante un lapso de 7 a 10 días. El uso de dos medios de cultivo permitió obtener bacterias con diferentes necesidades nutrimentales y características fisiológicas y funcionales.



**Figura 3.** Proceso de siembra para cada muestra de suelo en ambas islas, el proceso se realizó por triplicado

Después de la incubación se contaron las colonias presentes en cada caja, separándolas por morfologías similares utilizando características como el tipo de borde, la forma, la elevación y el color (Figura 4; Vargas-Flores y Kuno-Vargas 2014).



**Figura 4.** Características morfológicas utilizadas para la descripción de las colonias bacterianas obtenidas de suelo de isla Socorro y Clarión

Esta separación morfológica permitió conformar para ambas islas, 4 grupos de colonias en medio ISP 2 para *Streptomyces* y 2 grupos de colonias en medio Rennie. Las características de cada grupo se presentan en la **Tabla 2**.

Medio para <i>Streptomyces</i>	
Grupo de colonias	Descripción
Grupo 1: Borde filamentoso - forma plana	Colonias con borde filamentoso sin elevación y textura algodonosa
Grupo 2: Borde entero - forma plana	Colonias con borde entero, sin elevación y textura mucosa
Grupo 3: Borde filamentoso - forma umbonada	Colonias con borde filamentoso, con elevación de tipo umbonada y textura algodonosa

Grupo 4: Borde entero - forma convexa	Colonias con borde entero, con una elevación de tipo convexa y textura mucosa
Medio Rennie	
Grupo de colonias	Descripción
Grupo 1: Borde filamentosos	Colonias con borde filamentosos sin elevación y textura algodonosa
Grupo 2: Borde entero	Colonias con borde entero, sin elevación y textura mucosa

**Tabla 2.** Descripción general de los grupos de morfologías bacterianas formados para ambas islas por medio de cultivo

Para todas las muestras de suelo, se cuantificó el número de colonias pertenecientes a cada grupo de bacterias en cada medio de cultivo. Luego, se calculó el número de UFC de cada grupo de bacterias/g suelo de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$UFC \text{ (gramo de suelo húmedo)} = \frac{\text{(Promedio del número de colonias de bacterias por gramo de suelo * Factor de dilución)}}{\text{Volumen sembrado en cada placa petri}}$$

$$UFC \text{ (gramo de suelo seco)} = \frac{UFC \text{ (gramo de suelo húmedo)}}{\text{Peso de suelo seco}}$$

El peso seco de cada muestra se obtuvo por análisis gravimétrico (Radulovich, 2009), el cual consistió en pesar 1 g de suelo y secarlo durante 72 horas a 60°C, permitiendo su enfriamiento en un desecador con perlas de gel sílice, posteriormente se volvió a pesar. El contenido de humedad se calculó como la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco.

Para el análisis de los datos del número de UFC (Gutiérrez et al., 2020), el primer paso fue obtener el promedio de las UFC por grupo de bacterias que se encontró en cada una de las tres cajas Petri a partir de la alícuotas de 20 µl y que provenían de una misma submuestra (gramos 1, 2 y 3). Con estos promedios se obtuvo a su vez el promedio para cada muestra de suelo. De esta manera, los resultados de las UFC se reportan como el promedio del número de UFC por gramo de suelo seco para cada grupo morfológico por cada tipo de medio de cultivo e isla, con N=5 para isla Socorro y N=4 para isla Clarión.

### Aislamiento y caracterización de las UTO

A la par que se realizó el conteo de las UFC, se seleccionaron diversas morfologías con base en sus diferencias principales: forma, color, textura y borde. De cada morfología seleccionada, se realizaron cultivos por agotamiento hasta obtener cultivos puros (Gutiérrez *et al.*, 2020). A cada morfología aislada y purificada se le denominó Unidad Taxonómica Operativa (UTO). Estas UTO se enumeraron de manera secuencial y se registraron los datos generales de cultivo, entre los que se encontraban la isla y número de muestra de origen, y el medio de cultivo de aislamiento.

Para complementar la caracterización de las UTO, se realizaron algunas pruebas bioquímicas. Para ello se sembraron algunas colonias de cada UTO en medios de cultivo que presentaban una sola de las siguientes condiciones: cloruro de sodio al 0, 1.5, 3 y 4.5%; pH 5, 7, y 9; y como fuente de carbono: sacarosa, dextrosa, fructosa y manitol (Wink, 2020). Los resultados de esta caracterización se reportan como positivos o negativos al crecimiento para cada una de las diferentes condiciones.

### Identificación molecular de las UTO

Como último aspecto de la caracterización de las UTO, se realizó su identificación molecular para aquellas que fue posible extraer y secuenciar el ADN. La extracción se realizó siguiendo en la mayoría de los casos el protocolo de Doyle y Doyle (1987), y para algunas UTO, este protocolo fue modificado en el laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, agregando 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml).

### Extracción de ADN

La técnica de extracción se realizó tomando una pequeña muestra del material bacteriano, el cual se colocó en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml. Se le adicionaron 500 µl del buffer de CTAB (CTAB, TRIS, cloruro de Sodio, EDTA, y 2-Mercaptoetanol), y se colocó a baño María por 60 minutos, monitoreando la temperatura del agua en un rango de 55 a 65°C. Al terminar este tiempo, el tubo se retiró del baño María y se le adicionaron 400 µl de una solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y se agitó hasta que el contenido mostró una apariencia lechosa. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos con una fuerza *g* (RCF) de 8,385. En este paso se obtuvieron dos fases: la fase acuosa que contenía el ADN, y una pastilla que se precipitaba con los restos celulares, la cual se debía desechar. De la fase acuosa se extrajeron 400 µl y se colocaron en otro tubo de 1.5 ml, al cual se le agregaron 40 µl de acetato de amonio y se mezclaron. Posteriormente se agregaron 880 µl de alcohol absoluto, y se volvieron a mezclar. Después,

el tubo se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos con una fuerza *g* (RCF) de 8,385. El sobrenadante se desechó, mientras que a la pastilla se le agregaron 500 µl de alcohol al 70%, y se volvió a centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos con una fuerza *g* (RCF) de 8,385. Nuevamente, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar durante 24 horas para después adicionar 100 µl de agua destilada estéril. De este tubo se tomó una alícuota para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% y corroborar la presencia del material genético extraído (ADN ribosómico 16S) y verificar su integridad.

### Amplificación de ADN

La amplificación del ADN ribosómico 16S se llevó a cabo con la técnica de PCR en un volumen de 50 µl que contenían 0.2 µM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U de Taq polimerasa (Fermentas), 1 X PCR buffer y 50 ng de ADN. Se utilizaron los primers para actinobacterias ACT283F y ACT1360R (Tabla 3; McVeigh *et al.*, 1996)

Nombre del primer	Secuencia de primer (5'-3')
ACT 283F	GGG TAG CCG GCC TGA GAG GG
ACT 1360R	CTG ATC TGC GAT TAC TAG CGA CTC C

**Tabla 3.** Primer ocupados para Actinomicetos y secuencia de cada uno.

Posteriormente, a un tubo tipo Eppendorf estéril de 1.5 ml nuevo se le agregaron los reactivos mencionados para crear un tubo con la solución madre y con un vortex se mezcló el contenido durante 30 segundos. Después, se centrifugó durante 1 minuto para eliminar las posibles burbujas y la mezcla fue distribuida en tubos de 200 µl a los cuales se les agregó 1 µl de cada muestra de ADN.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermo Scientific™ Piko™ Thermal Cycler bajo las siguientes condiciones: Primers ACT283F y 1360R; Desnaturalización inicial a 94°C, 5 min; 10 ciclos desnaturalización a 94°C (1 min), alineación a 65°C (30 s), extensión a 72°C (2 min) y 72°C (5 min) seguido de 20 ciclos desnaturalización a 92°C (30 s), alineación a 65°C (30 s), elongación a 72°C (2.5 min) y elongación final a 72°C (5 min) (McVeigh *et al.*, 1996; Weisburg *et al.* 1991; Stach *et al.* 2003).

Para limpiar el producto de PCR se utilizó el kit PureDireX PCR Clean-Up & Gel Extraction (Bio-Helix), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La identificación molecular

de las UTO se realizó a través de la secuenciación de la fracción del gen 16S del SSU rDNA. La secuenciación se realizó en los laboratorios Macrogen Inc., en su sede de la República de Corea. Finalmente, las secuencias obtenidas se ingresaron al NCBI para obtener la identidad taxonómica de las UTO, y también fueron agregadas a la base de datos del GenBank con lo cual se obtuvo un número de acceso de cada secuencia. Los números de acceso aparecen en la sección de resultados.

### Análisis estadístico y de diversidad

Los resultados del número de UFC fueron analizados tomando como base la combinación de las variables: isla de origen (Clarion y Socorro) y medio de cultivo utilizado (medio para *Streptomyces* y medio sin nitrógeno reducido). A partir de esta combinación, se analizó el número de UFC por grupo morfológico entre los diferentes sitios de muestreo.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM SPSS Statistics Editor V25. Previamente, los valores obtenidos de los promedios de los números de UFC por sitio fueron transformados a Log10 para someter a prueba la normalidad de los datos y poder realizar análisis estadísticos de tipo paramétrico (Milton, 2001). Se realizaron ANOVA unifactoriales y pruebas post hoc entre los sitios de muestreo (4 para Clarion y 5 para Socorro), entre islas y medio de cultivo. Para el análisis de las morfologías se realizaron ANOVA unifactoriales de pruebas de t para muestras independientes entre el número de UFC de cada morfología. En el caso de los ANOVA, cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre qué situaciones (sitios de muestreo o morfologías) se encontraban esas diferencias. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas a  $\alpha \leq 0.05$ .

Para analizar la riqueza de UTO (haciendo una analogía con riqueza de especies), se realizó una curva de rarefacción en el programa iNEXT. Esta curva calcula el número esperado de especies de cada muestra asumiendo que todas las muestras son de un tamaño estándar, lo que permite comparar la riqueza de especies (en este caso UTO) de muestras que originalmente tenían diferente tamaño. Cuando la curva alcanza la asíntota permite estimar la proporción de UTO que el muestreo actual logró registrar con respecto a una riqueza total potencial indicada por la asíntota. En el resultado, los valores cercanos a 1 indican un muestreo robusto de la diversidad (Chao y Chiu, 2016; De la Mora Estrada *et al.*, 2017).

En el caso particular de esta investigación, la curva de rarefacción generó una relación entre el número de UTO (especies) y el número de UCF (individuos) contabilizados en las muestras. Esto permitió conocer el número de UCF que eran necesarios para tener representada al menos al 90% de la comunidad bacteriana cultivable, en función de la cantidad de UTOs encontradas en cada punto de muestreo y medio de cultivo utilizado.

Las curvas de rarefacción toman como base a los denominados números de Hill ( ${}^qD$ ) de orden 1, 2 y 3, donde  ${}^qD$  es la riqueza efectiva de especies y  $q$  es un parámetro que determina la sensibilidad de  $D$  a la abundancia relativa de las especies. En este trabajo se utilizó únicamente la riqueza de primer orden o riqueza efectiva de especies. Ésta se calcula con  $q = 0$ , lo cual representa una condición en la que cada especie (en este caso, UTO) está presente con al menos un individuo (en este caso, colonia). Debido a esto se conoce como riqueza efectiva, ya que solo las especies realmente detectadas contribuyen a la estimación de  $D$  (De la Mora-Estrada *et al.*, 2017).

Con los mismos datos transformados en Log10 se obtuvieron las diversidades de Shannon y Simpson utilizando el programa SpadeR (Chao *et al.*, 2015).

### Conformación de colección de UTO y cepas

Una vez que se obtuvieron los cultivos puros, una parte de ellos se congeló a  $-20^{\circ}C$ , utilizando glicerol al 40% como crioprotector. Con este procedimiento se comenzó a formar un cepario de bacterias aisladas del suelo de las islas Socorro y Clarión. Cada UTO ya identificada se consideró una cepa que cuenta con información que incluye su caracterización morfológica y bioquímica, su secuencia de ADN, identificación molecular, y número de acceso de la secuencia al GenBank.

## Resultados

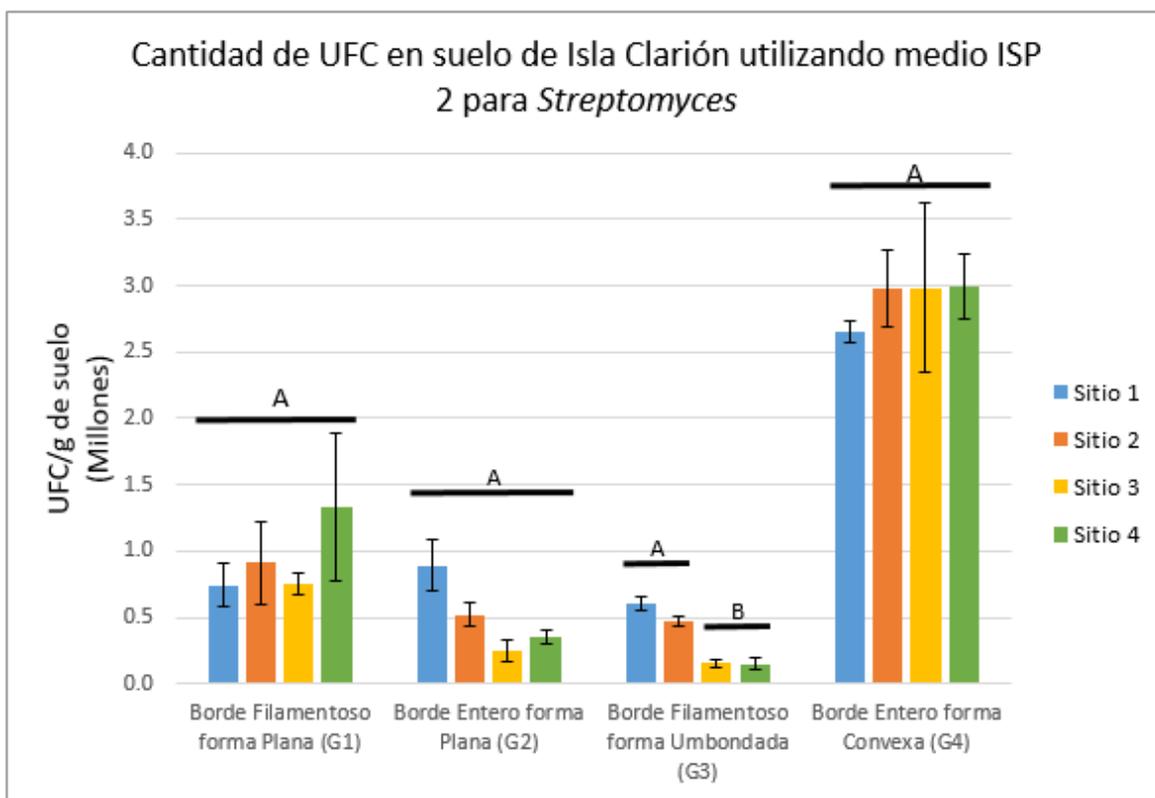
Los resultados obtenidos en esta investigación, se presentan en el mismo orden de los objetivos particulares.

### Resultados del conteo de UFC por isla y medio de cultivo

#### Isla Clarión medio ISP 2 para *Streptomyces*

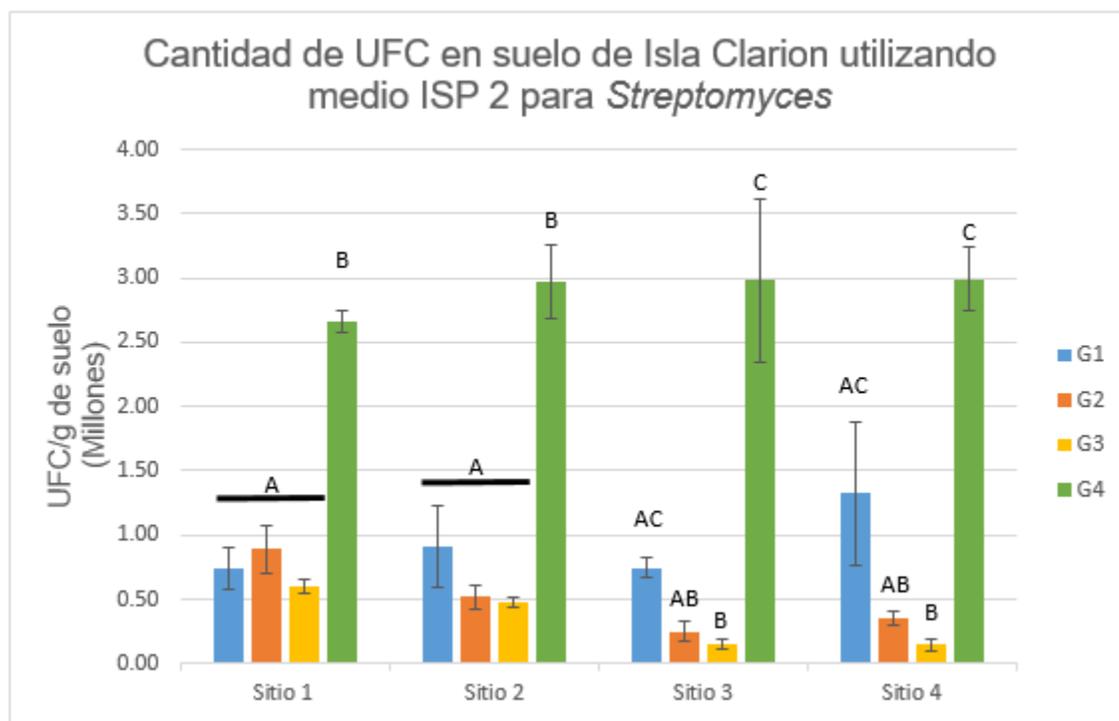
En el suelo de la isla Clarión, utilizando el medio ISP 2 para *Streptomyces*, el rango de los promedios de la cantidad de UFC de bacterias de borde filamentosos - forma plana (G1) se ubicó entre  $0.74 (\pm 0.32)$  a  $1.33 (\pm 1.11) \times 10^6$  g/suelo seco. Para el grupo de colonias con borde entero - forma plana (G2), la cantidad mínima de UFC se encontró en el sitio 3 con  $0.25 (\pm 0.15) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco y la máxima de  $0.89 (\pm 0.37) \times 10^6$  en el sitio 1. Para el grupo morfológico de colonias de borde filamentosos - forma umbonada (G3), el rango fue de  $0.15 (\pm 0.06)$  en los sitios 3 y 4, a  $0.60 (\pm 0.10) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco en el sitio 1. Finalmente, para el grupo de colonias con borde entero - forma convexa (G4), el rango fue de  $2.66 (\pm 0.16)$  (Sitio 1) a  $2.99 (\pm 0.50) \times 10^6$  de UFC/g suelo (Sitio 4). En cantidades netas, las colonias bacterianas que se encontraron en mayor cantidad fueron las de borde entero - forma convexa (G4) y las de menor cantidad las de borde filamentosos - forma umbonada (G3; **Figura 5**).

El ANOVA aplicado a cada uno de los grupos morfológicos para identificar posibles diferencias ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.002$ ) en la cantidad de UFC detectada en cada sitio, mostró que únicamente existían diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.002$ ) al interior del grupo morfológico de borde filamentosos - forma umbonada (G3). La prueba de Tukey mostró que estas diferencias se encontraban en el sitio 1 respecto de los sitios 3 y 4 ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.009$ ,  $p=0.006$  respectivamente), y el sitio 2 con los sitios 3 ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.025$ ) y 4 ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.016$ ; **Figura 5**).



**Figura 5.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio ISP 2 para *Streptomyces* por grupo morfológico para cada uno de los 4 puntos de muestreo en Isla Clarión. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) al interior de cada grupo morfológico entre los diferentes sitios de muestreo. El número junto a la letra G indica el grupo de bacterias de acuerdo con la tabla 2.

Los ANOVA aplicados entre la cantidad de UFC de los cuatro grupos morfológicos al interior de cada sitio de muestreo mostraron que en todos los casos (los cuatro sitios de muestreo), existían diferencias significativas entre ellos. Las pruebas de Tukey señalaron que en los sitios 1 y 2, las diferencias en la cantidad de UFC ( $\alpha=0.05$ ) se encontraban entre la morfología de borde entero-forma convexa (G4) con los otros tres grupos morfológicos (Sitio 1,  $p=0.012, 0.026, 0.007$ ; Sitio 2,  $p=0.041, 0.013, 0.010$ ). Para los sitios 3 y 4, las diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) se encontraron en diferentes combinaciones entre las distintas morfologías (Figura 6).



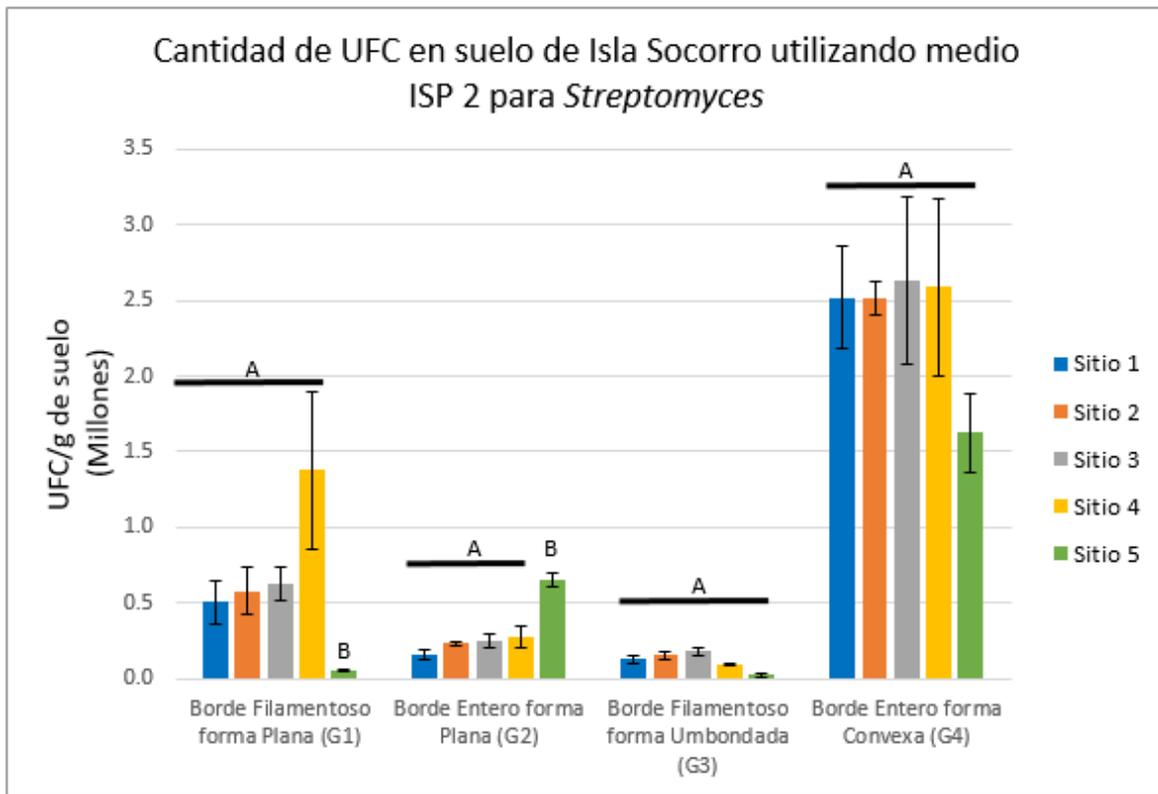
**Figura 6.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio ISP 2 para *Streptomyces* al interior de cada sitio para cada uno de los grupos morfológicos en Isla Clarión. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los grupos morfológicos por sitio de muestreo. La letra G indica las características de cada grupo: G1: borde filamentosos, forma plana; G2: borde entero, forma plana; G3: borde filamentosos, forma umbonada; G4: borde entero, forma convexa.

#### Isla Socorro medio ISP 2 para *Streptomyces*

Para el suelo de la isla Socorro sembrado en medio ISP 2 para *Streptomyces*, la cantidad de UFC/g suelo seco por grupo morfológico se ubicó de la siguiente manera: para las bacterias con borde filamentosos - forma plana (G1) el rango fue de  $0.05 (\pm 0.02; \text{Sitio 5})$  a  $1.38 (\pm 1.04 \times 10^6; \text{Sitio 4})$ , para las de borde entero - forma plana (G2); de  $0.16 (\pm 0.06; \text{Sitio 1})$  a  $0.65 (\pm 0.09; \text{Sitio 5}) \times 10^6$ ; para las UFC con borde filamentosos - forma umbonada (G3) fue de  $0.02 (\pm 0.02; \text{Sitio 5})$  a  $0.18 (\pm 0.05; \text{Sitio 3})$  y para las UFC de borde entero - forma convexa (G4) fue de  $1.63 (\pm 0.52; \text{Sitio 5})$  a  $2.63 (\pm 1.10) \times 10^6; \text{Sitio 3}$ . El grupo morfológico con mayor cantidad de UFC fue el de las colonias con borde entero – forma convexa (G4) y el de menor cantidad fueron las de borde filamentosos - forma umbonada (G3).

El ANOVA aplicado para buscar posibles diferencias significativas entre los diferentes sitios de muestreo para cada grupo morfológico de UFC indicó que estas diferencias ( $\alpha=0.05$ ) se encontraban en las morfologías de borde filamentososo - forma plana, (G1,  $p=0.001$ ) y borde entero - forma plana (G2;  $p=0.007$ ) (Figura 7).

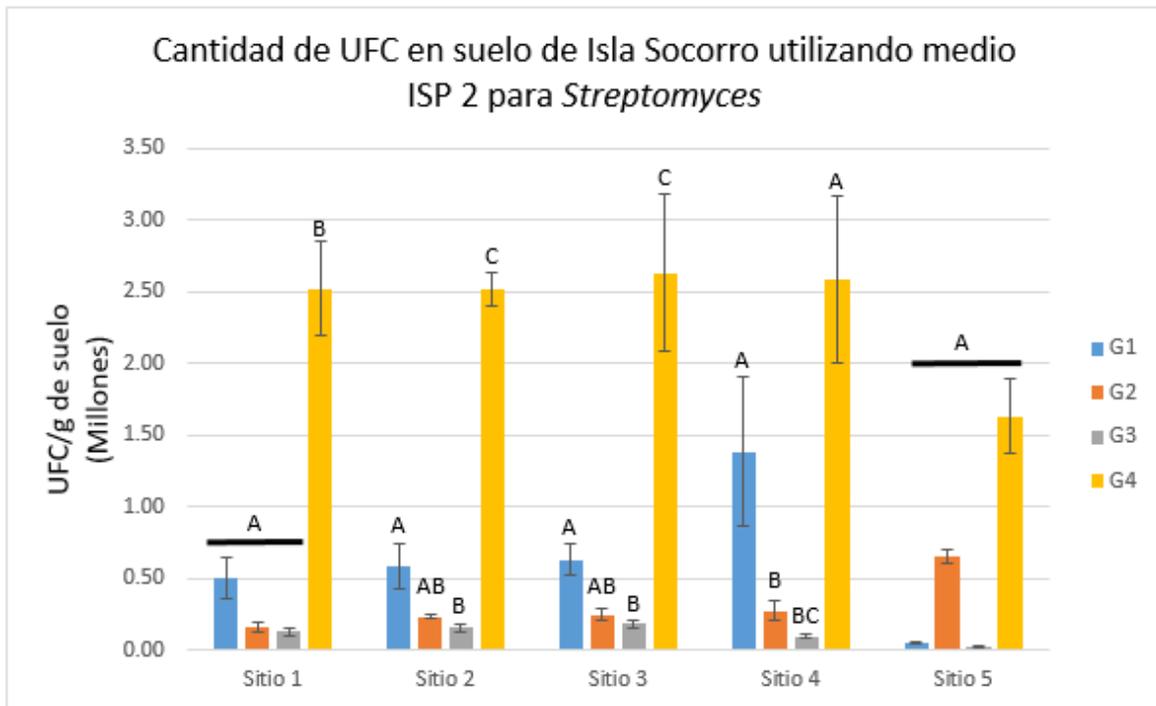
La prueba de Tukey aplicada al interior de los grupos morfológicos mostró que para el grupo de colonias con borde filamentososo - forma plana (G1), la cantidad de UFC del sitio 5 difirió significativamente ( $\alpha=0.05$ ) de los otros cuatro sitios (sitios 1,  $p=0.014$ ; 2,  $p=0.009$ ; 3,  $p=0.005$  y 4,  $p=0.001$ ). El promedio de la cantidad de bacterias encontradas en este sitio para este grupo morfológico fue de  $0.05 \pm 0.02 \times 10^6$ , mientras que el rango en que se encontró este mismo grupo de bacterias en los otros sitios fue de  $0.50 \pm 0.29 \times 10^6$  a  $1.38 \pm 1.04 \times 10^6$ . El mismo patrón de diferencias entre el sitio 5 y el resto de los sitios de muestreo se encontró en el grupo 2, que corresponde a las bacterias con borde entero - forma plana (sitios 1,  $p=0.004$ ; 2,  $p=0.034$ ; 3,  $p=0.036$  y 4,  $p=0.050$ ; Figura 7). En este caso, este grupo de bacterias presentó una mayor cantidad de UFC con una media de  $0.65 \pm 0.09 \times 10^6$  en el sitio 5 respecto de los otros sitios con una media que va de  $0.16 \pm 0.06$  a  $0.27 \times 10^6 \pm 0.15$ .



**Figura 7.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio ISP 2 para *Streptomyces* por grupo morfológico para cada uno de los 5 puntos de muestreo en Isla Socorro. Cada barra representa un punto de muestreo. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) al interior de los grupos morfológicos entre los diferentes sitios de muestreo. El número junto a la letra G indica el grupo de bacterias de acuerdo con la tabla 2.

Los ANOVA aplicados a la cantidad de UFC de los cuatro grupos morfológicos al interior de cada sitio de muestreo indicaron que las diferencias detectadas son altamente significativas ( $p < 0.001$ ) en los sitios 1, 2, 3 y 4. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey aplicada a cada uno de estos sitios mostró diferencias significativas entre la morfología de borde entero - forma convexa (G4) con los otros tres grupos de morfologías en los sitios 1 ( $p=0.014$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.000$ ), 2 ( $p=0.008$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.000$ ) y 3 ( $p=0.011$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ). En el sitio 4 se encontraron diferencias entre la morfología de borde filamentoso – forma plana (G1) y la morfología de borde entero – forma plana (G2;  $p=0.045$ ); y la morfología de borde entero – forma convexa (G4) con las morfologías de borde entero – forma plana (G2;  $p=0.005$ ) y borde filamentoso – forma umbonada (G3;  $p=0.000$ ).

Finalmente, dentro de los sitios 2, 3 y 4, la morfología de borde filamentosos - forma plana (G1) tuvo diferencias significativas ( $p=0.030$ ,  $p=0.023$  y  $p=0.003$ , respectivamente) con la morfología de borde filamentosos - forma umbonada (G3; **Figura 8**).



**Figura 8.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio ISP 2 para *Streptomyces* al interior de los sitios para cada uno de los grupos morfológicos en Isla Socorro. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los grupos morfológicos por sitio de muestreo. La letra G indica las características de cada grupo: G1: borde filamentosos, forma plana; G2: borde entero, forma plana; G3: borde filamentosos, forma umbonada; G4: borde entero, forma convexa.

El comportamiento de la cantidad de UFC de los diferentes grupos de bacterias en las dos islas usando medio de cultivo ISP 2 para *Streptomyces* fue similar en cuanto a los grupos morfológicos creados (cuatro grupos) y a otras características. Por ejemplo, la mayor cantidad de UFC en las dos islas correspondió al grupo de las bacterias con borde entero - forma convexa (G4), seguidas de las de borde filamentosos - forma plana (G1), y en menor

cantidad las bacterias con borde entero - forma plana (G2) y borde filamentososo - forma umbonada (G3). La prueba de T aplicada entre islas en medio ISP 2, no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 9).

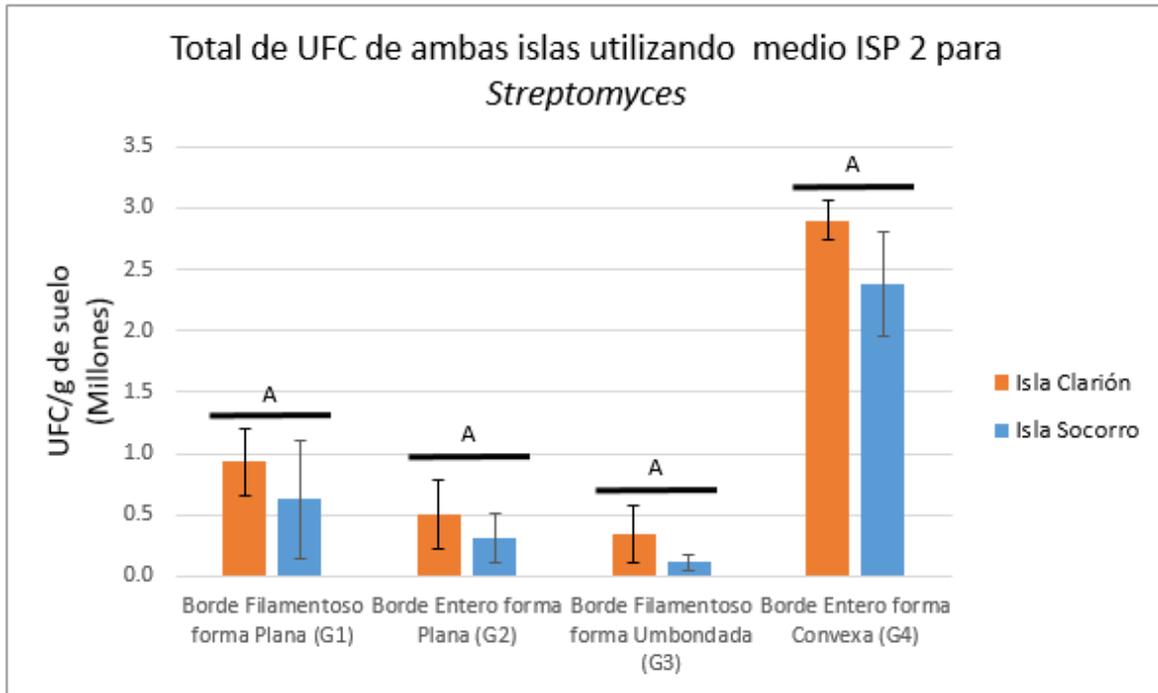
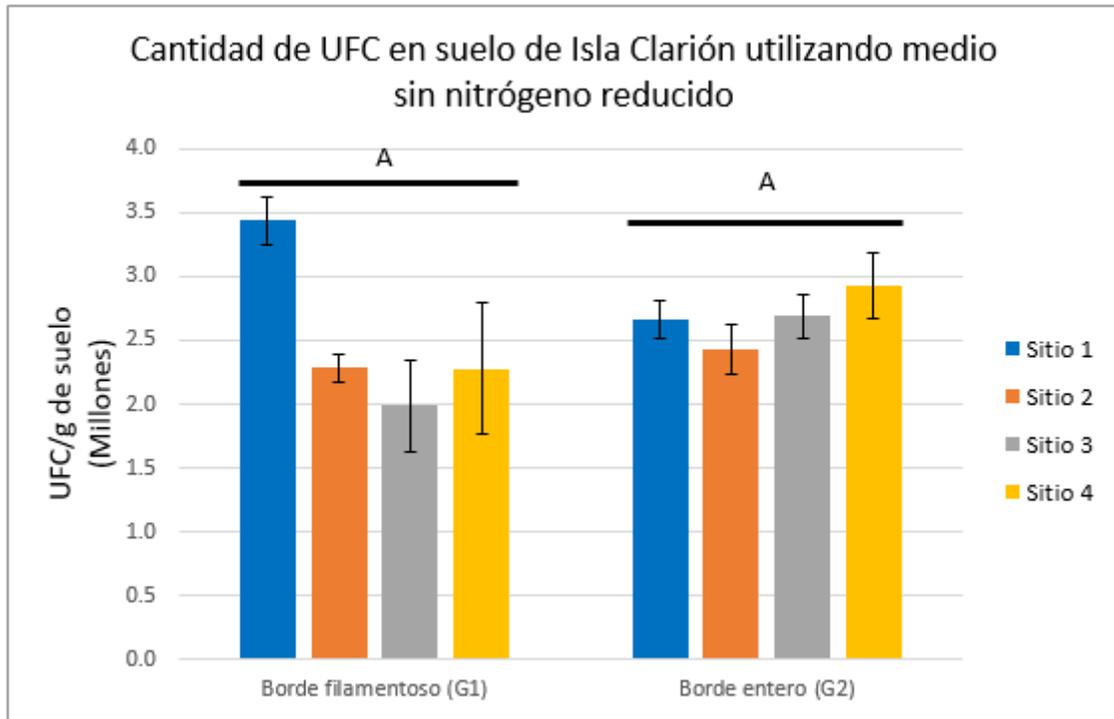


Figura 9. Conteo total de UFC normalizado por el número de puntos de muestreo para ambas islas en medio ISP 2 para *Streptomyces*.

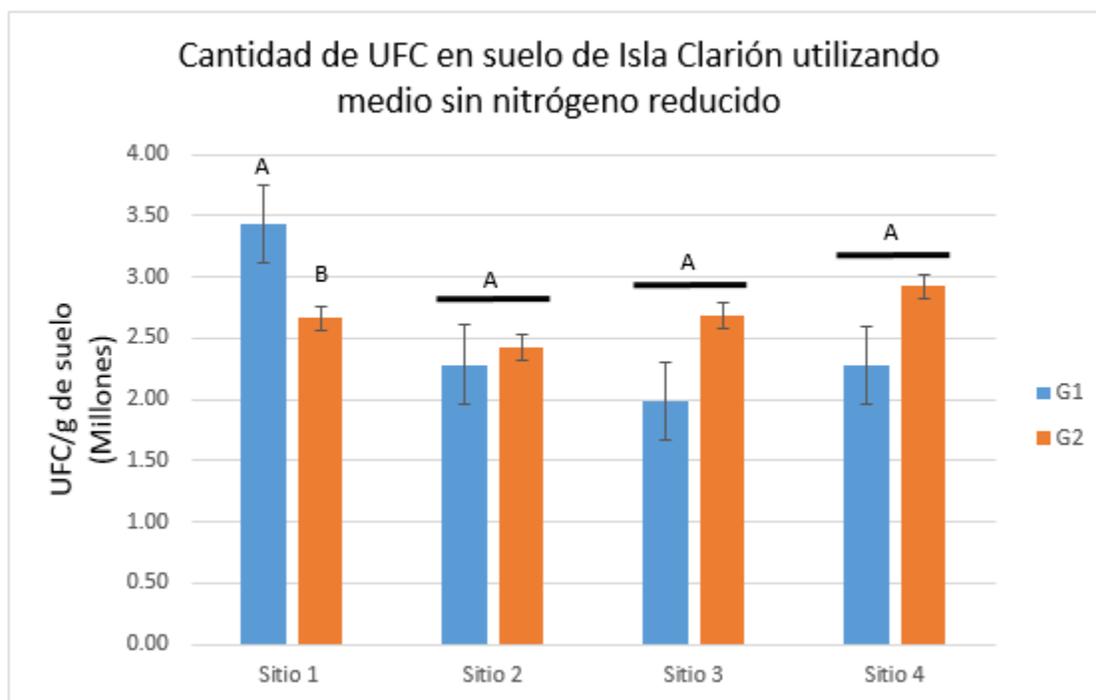
#### Isla Clarión en medio sin nitrógeno reducido

En el suelo de isla Clarión utilizando el medio sin nitrógeno reducido se obtuvo un rango del promedio de las UFC de bacterias con borde filamentososo (G1) de  $1.9 (\pm 0.72) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 3) a  $3.4 (\pm 0.38) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 1), mientras que para las bacterias con borde entero (G2) el rango fue de  $2.4 (\pm 0.38) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 2) a  $2.9 (\pm 0.52) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 4; Figura 10). El ANOVA aplicado entre los diferentes sitios de muestreo para cada grupo morfológico de UFC no detectó diferencias significativas en el número de UFC en ninguno de los grupos morfológicos (Figura 10).



**Figura 10.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio sin nitrógeno reducido por grupo morfológico para cada uno de los 4 puntos de muestreo en Isla Clarión. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los diferentes sitios de muestreo por grupo morfológico.

La prueba de t que se realizó entre la cantidad de UFC de los dos grupos morfológicos en cada uno de los sitios de muestreo indicó que solo existen diferencias significativas en el sitio 1 ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.047$ ), entre los dos grupos de bacterias (Figura 11).



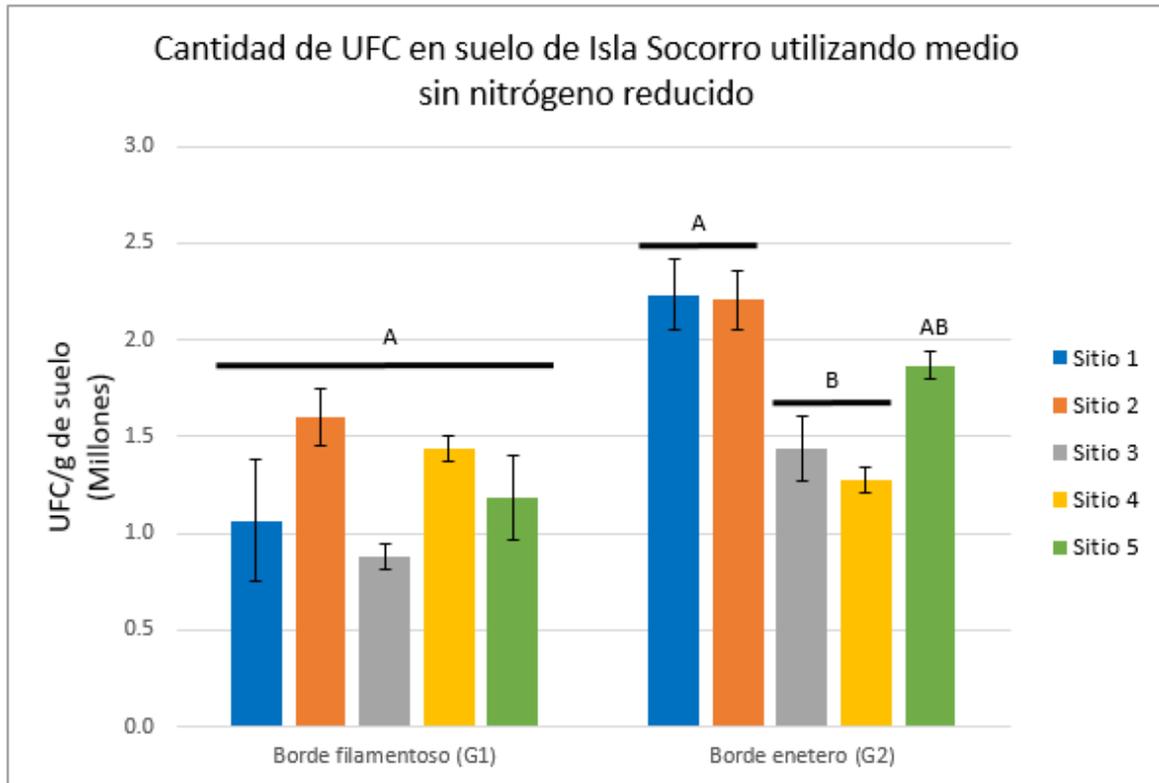
**Figura 11.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio sin nitrógeno reducido por sitio para los dos grupos morfológicos en Isla Clarión. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los grupos morfológicos por sitio de muestreo.

#### Isla Socorro en medio sin nitrógeno reducido

Para isla Socorro en medio sin nitrógeno reducido se obtuvo un rango del promedio de las bacterias con borde filamentososo (G1) que va de  $0.8 (\pm 0.13) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 3) a  $1.6 (\pm 0.30) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 2) y para las bacterias con borde entero (G2) un rango de  $1.2 (\pm 0.13) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 4) a  $2.2 (\pm 0.37) \times 10^6$  de UFC/g suelo seco (Sitio 1) donde claramente el mayor número se presentó en las bacterias con borde entero (Figura 12).

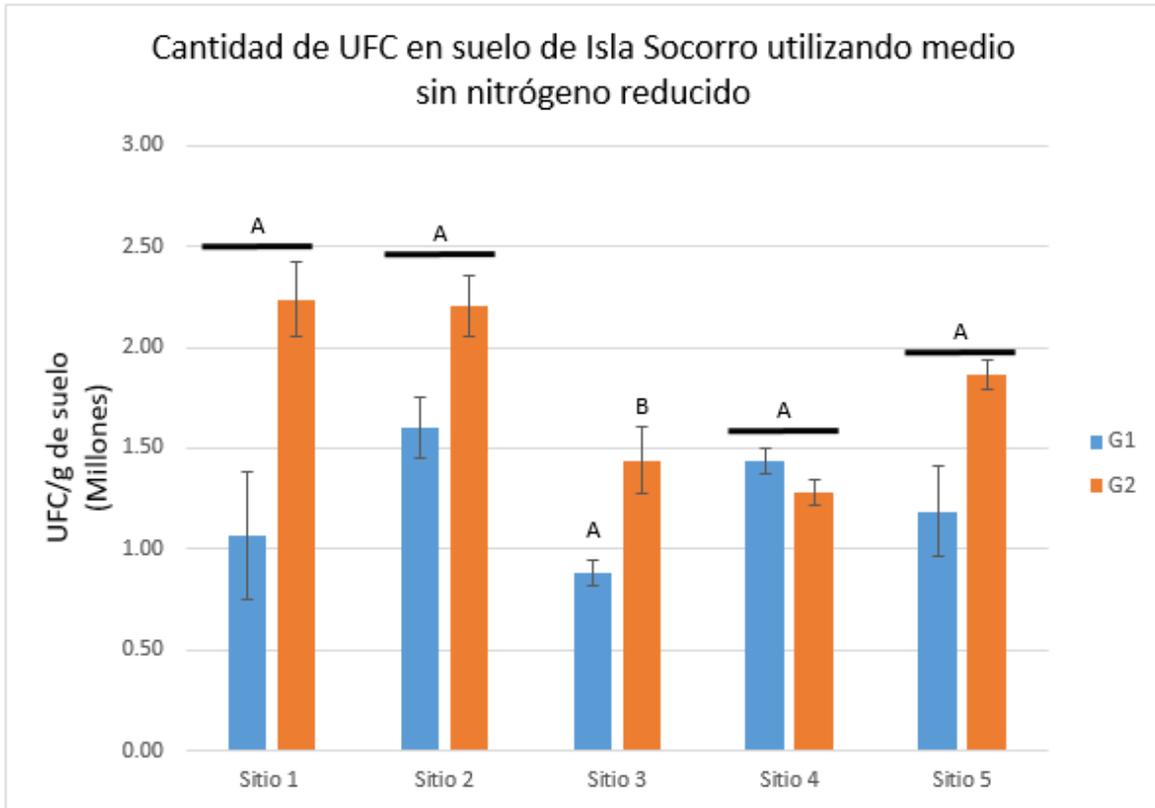
El ANOVA aplicado a los diferentes grupos de bacterias mostró diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.004$ ) en el número de UFC de la morfología de borde entero (G2) entre los diferentes sitios de muestreo. La prueba de Tukey aplicada entre los sitios para este grupo de bacterias mostró que los sitios 1 y 2 no son significativamente diferentes, lo mismo sucedió entre los grupos 3 y 4. Pero, los sitios 1 y 2 fueron significativamente diferentes de los sitios 3 ( $p=0.036$  y  $p=0.040$  respectivamente) y 4 ( $p=0.011$  y  $p=0.012$  respectivamente)

para este grupo de bacterias, mientras que el sitio 5 no mostró diferencias con los otros 4 sitios (Figura 12).



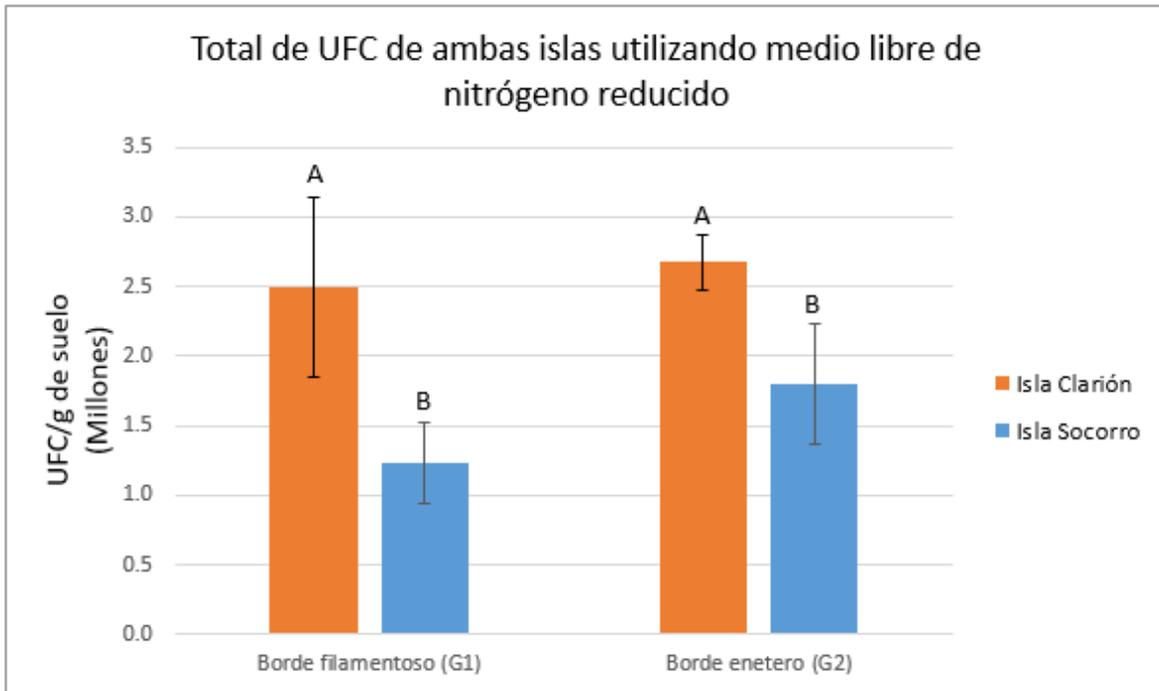
**Figura 12.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio sin nitrógeno reducido por grupo morfológico para cada uno de los 5 puntos de muestreo en Isla Socorro. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los diferentes sitios de muestreo por grupo morfológico.

La prueba de t aplicada entre la cantidad de UFC de los dos grupos morfológicos al interior de cada sitio de muestreo indicó que solo existían diferencias significativas al interior del sitio 3, donde las bacterias de borde entero presentaron mayor cantidad ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.043$ ; Figura 13).



**Figura 13.** Promedio del número de UFC ( $N=3 \pm DE$ ) en medio sin nitrógeno reducido por sitio para los dos grupos morfológicos en Isla Socorro. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los grupos morfológicos por sitio de muestreo.

Al igual que en el caso del medio ISP 2 para *Streptomyces*, con el medio sin nitrógeno reducido, la mayor cantidad de UFC para ambas islas correspondió al grupo de borde entero (grupo 2). La prueba de t aplicada entre islas en medio Rennie (medio sin nitrógeno reducido), mostró que existen diferencias altamente significativas entre la cantidad de UFC de los dos grupos morfológicos considerados ( $\alpha=0.05$ ,  $p \leq 0.001$  y  $p \leq 0.001$  para borde filamentosos y borde entero respectivamente; **Figura 14**).



**Figura 14.** Conteo total de UFC normalizado por el número de puntos de muestreo para ambas islas respectivamente, en medio Rennie (medio sin nitrógeno reducido)

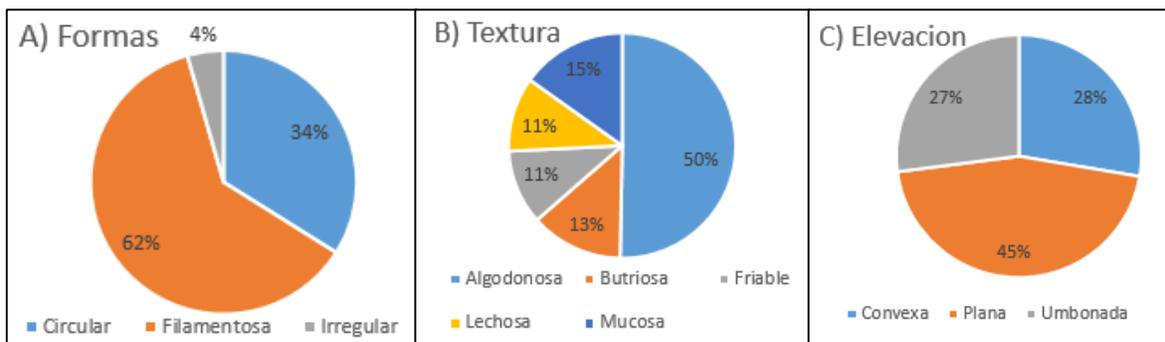
### Caracterización bioquímica de las UTO para cada isla y conformación de colección de UTO y cepas

De manera simultánea al conteo de las UFC, de cada morfología descrita en el apartado anterior se realizaron aislamientos hasta la purificación de diferentes colonias. De esta manera se obtuvieron 159 aislamientos provenientes de ambas islas y de los dos medios de cultivo (Tabla 4). Una vez que se comprobó la pureza de estos aislamientos a través de resiembras y observaciones microscópicas, tanto de las colonias como de las células, fueron denominados como Unidades Taxonómicas Operativas (UTO), las cuales fueron numeradas de manera secuencial para dar seguimiento a algunas de sus características morfológicas y bioquímicas y a su identificación taxonómica. Todas las UTO fueron criopreservadas con glicerol al 40% a -20°C.

	Isla Clarión	Isla Socorro
Medio <i>Streptomyces</i>	47	43
Medio sin nitrógeno reducido	36	33
Total	83	76

**Tabla 4.** Distribución del número de UTO obtenidas por isla de origen y medio de cultivo

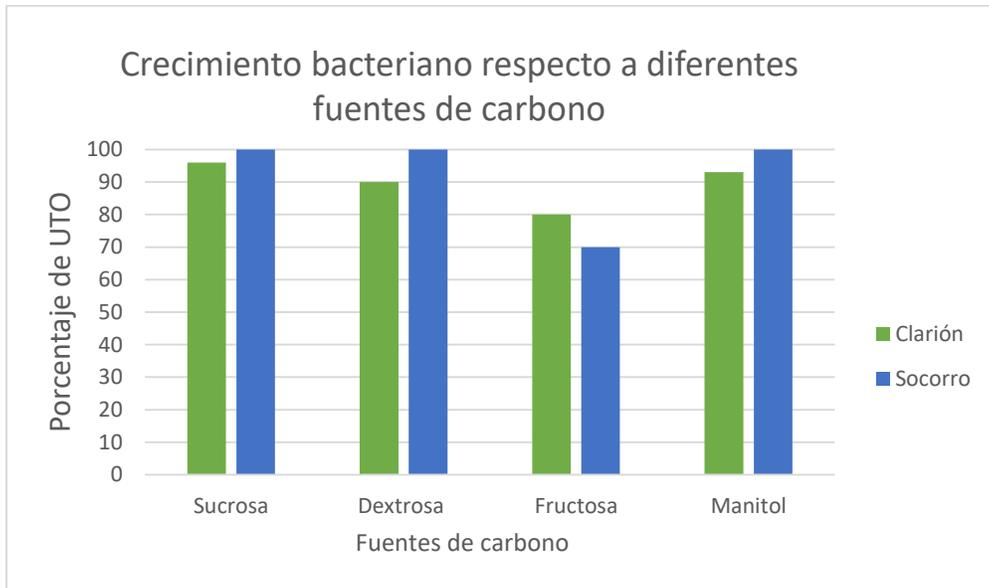
Las características morfológicas más comunes observadas en todas las UTO fueron: forma filamentososa (Figura 15A), textura algodonosa (Figura 15B) y sin elevación evidente (Figura 15C).



**Figura 15.** Distribución de las características morfológicas de las UTO obtenidas de los suelos de ambas islas (N= 159 UTO).

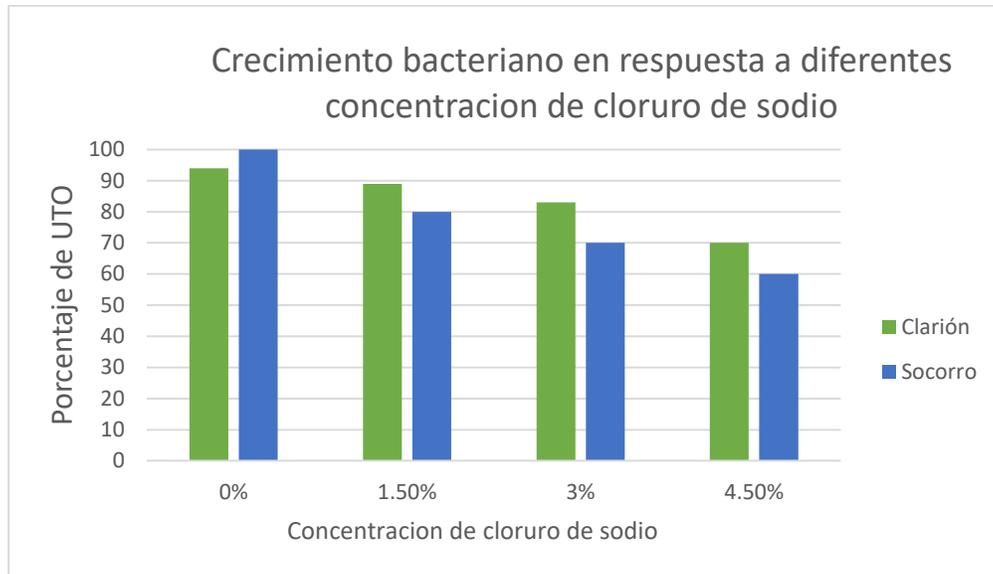
Debido a la contingencia sanitaria por COVID-19, no fue posible caracterizar bioquímicamente la totalidad de los 159 aislamientos. Sin embargo, se logró caracterizar 70 UTO para isla Clarión y 10 UTO para isla Socorro, cuyos resultados se presentan a continuación:

De las 70 UTO de isla Clarión, el 96% tuvo la capacidad de crecer en medio con sucrosa, siendo la fuente de carbono más utilizada; mientras que la menos ocupada fue la fructosa con el 80% de las UTO con capacidad para metabolizarla y crecer a partir de ella. El 76% de las UTO tuvieron la capacidad de crecer en las 4 fuentes de carbono. Para las 10 UTO de isla Socorro, el 100% crecieron en la sucrosa, dextrosa y manitol; y solo el 70% tuvo la capacidad de crecer en la fructosa (Figura 16).



**Figura 16.** Proporción de UTO que utilizan diferentes fuentes de carbono para isla Clarión (N = 70) y para isla Socorro (N = 10).

En cuanto a la capacidad para crecer en diferentes concentraciones de cloruro de sodio, se encontró que, en ausencia de esta sal, el 100% de las UTO de isla Socorro lograron crecer, mientras que para isla Clarión sólo el 94% de las UTO pudieron hacerlo. Conforme se incrementó la concentración de NaCl en el medio de cultivo, se observó una clara tendencia a disminuir la cantidad de UTO que crecían en cada concentración, esto para ambas islas (Figura 17). En términos generales, de las 70 UTO caracterizadas para isla Clarión, el 76% pudieron crecer en todas las concentraciones de cloruro de sodio mientras que para isla Socorro esta proporción bajó a 70%.



**Figura 17.** Proporción de UTO utilizando diferentes concentraciones de cloruro de sodio para isla Clarión (N = 70) y para isla Socorro (N = 10).

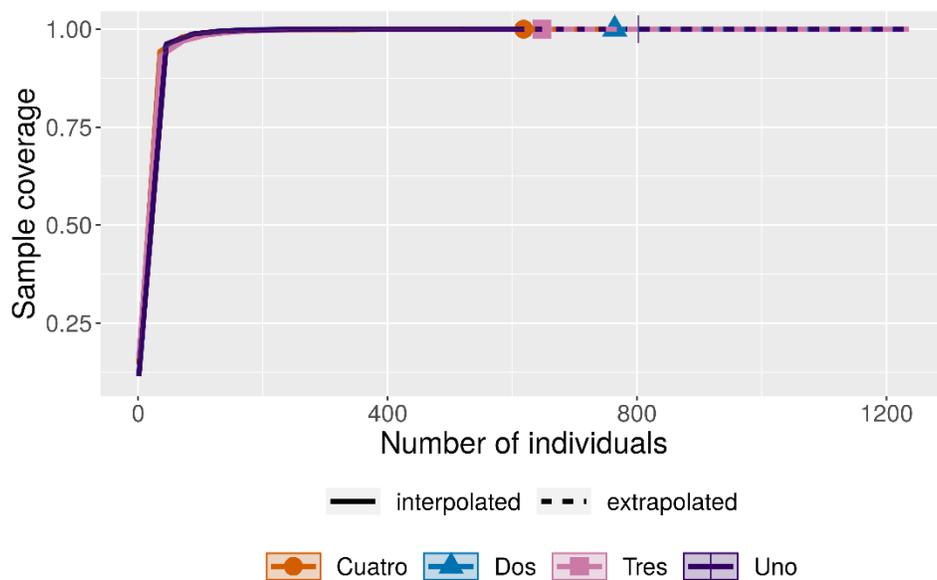
### Cobertura de muestreo y riqueza efectiva por curvas de rarefacción

Para todos los casos en que utilizaron curvas de rarefacción, los resultados se presentan en dos partes. En la primera, se hace una comparación entre el número de UFC calculado por la curva de rarefacción y el número real de UFC que se encontró. Si el número de UFC calculado es menor que el número real, se consideró que hubo un sobremuestreo de UFC. Esto significa que se contaron más UFC que las necesarias para tener completamente representada a la comunidad de bacterias cultivables bajo las condiciones específicas utilizadas. En cambio, si el número de UFC calculado era mayor que el real, se consideró que hubo un submuestreo de las UFC, lo cual implica que no fueron suficientes para tener representada a la comunidad de bacterias cultivables en este medio de cultivo. En todas las curvas de rarefacción presentadas, la cobertura de muestreo se representa en el eje vertical (Y), y el número real de UFC (número de individuos), en el horizontal (X). La asíntota de la curva para cada sitio de muestreo se forma cuando se alcanza la cobertura total del muestreo, es decir, cuando ya contó la cantidad de UFC suficientes para representar a la comunidad cultivable de bacterias, en las condiciones específicas utilizadas para este trabajo.

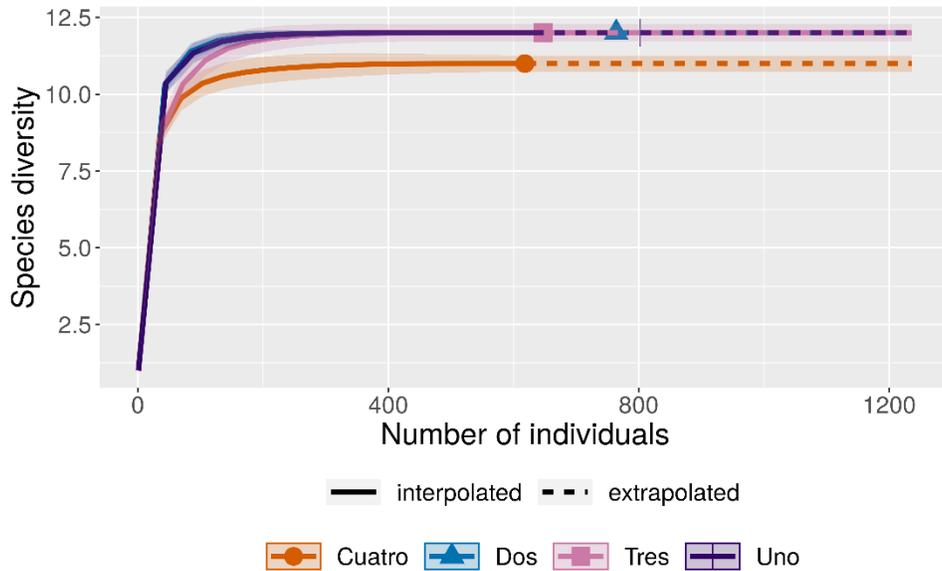
En la segunda parte del análisis de rarefacción, se genera una relación entre el número de UFC encontrado y la diversidad de UTO. Para este trabajo se utilizó la riqueza efectiva de

UTO. Esta relación calcula el número de UTO diferentes (número de especies) que se encontrarían en el suelo, en función del número de UFC (número de individuos) que fueron contabilizadas.

Para el suelo de isla Clarión que fue cultivado en medio para *Streptomyces*, el análisis de rarefacción mostró que la comunidad se encontraba totalmente representada con 267 UFC para el sitio 1, 255 UFC para el sitio 2, 359 UFC para el sitio 3 y 377 UFC para el sitio 4. En todos los sitios, el número de UFC real fue mayor que el que provenía de la rarefacción (Figura 18), lo que denota el sobremuestreo de las UFC en las muestras de suelo. Esto significa que se contaron más UFC que las necesarias para tener representada a la comunidad de bacterias cultivables en este medio de cultivo específico. Con estos resultados, el análisis calculó la presencia de 12 UTO diferentes para los sitios 1, 2 y 3, a diferencia del sitio 4, que se quedó en 11 UTO con esta cobertura del muestreo (Figura 19).

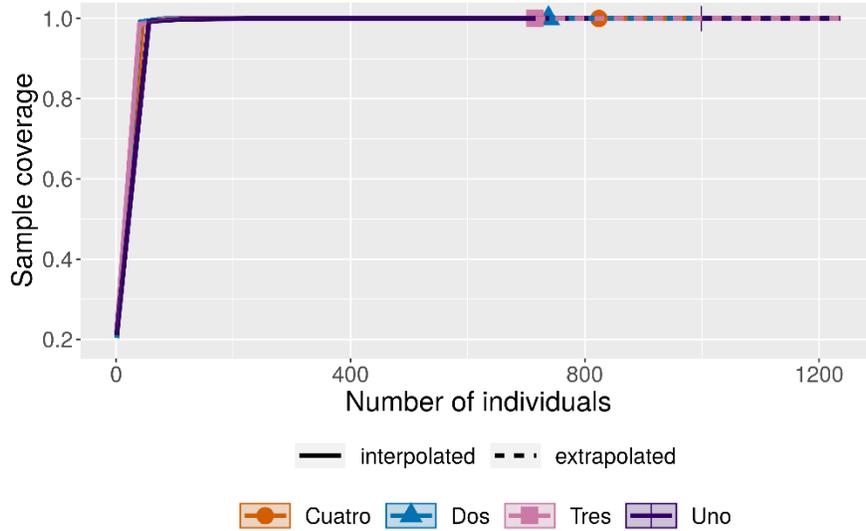


**Figura 18.** Cobertura de muestra por rarefacción para isla Clarión en medio ISP 2. Cada icono representa un punto de muestreo, y su ubicación particular en la curva cuando se proyecta hacia el eje X, indica la cantidad real de UFC que se obtuvo durante el conteo en cada sitio en particular.

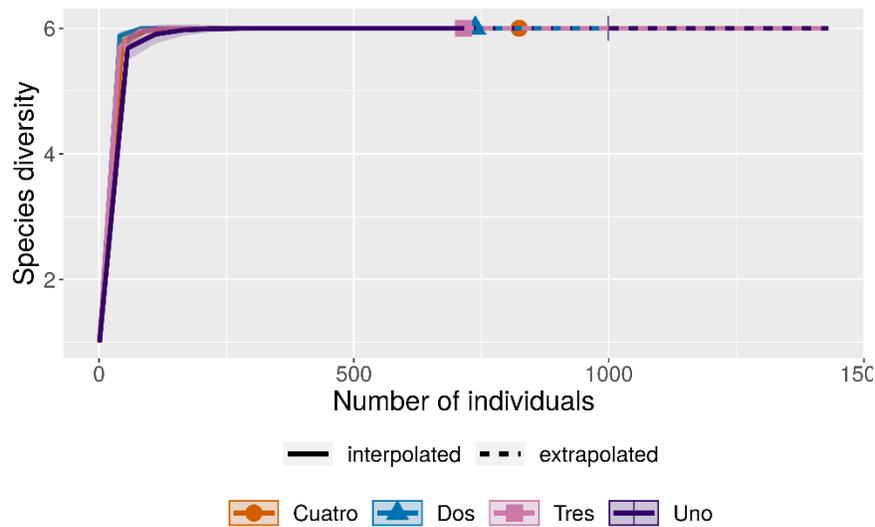


**Figura 19.** Riqueza efectiva de UTO por número de UFC para isla Clarión en medio ISP 2. La asíntota para cada sitio se forma en el valor de riqueza específica calculada para la cobertura de muestreo alcanzada en cada sitio.

Para isla Clarión en medio Rennie (medio libre de nitrógeno) la comunidad se encontró representada con 111 UFC para el sitio 1, 82 UFC para el sitio 2, 119 UFC para el sitio 3 y 138 UFC para el sitio 4 (Figura 20). De igual manera que en el caso de medio ISP 2 para *Streptomyces*, en este medio también se detectó un sobremuestreo, pues los valores de UFC reales sobrepasaron los valores necesarios para tener representada a la comunidad bacteriana cultivable en este medio. Con esta cobertura de muestreo, se calcularon 6 UTOs diferentes en cada uno de los sitios (Figura 21).

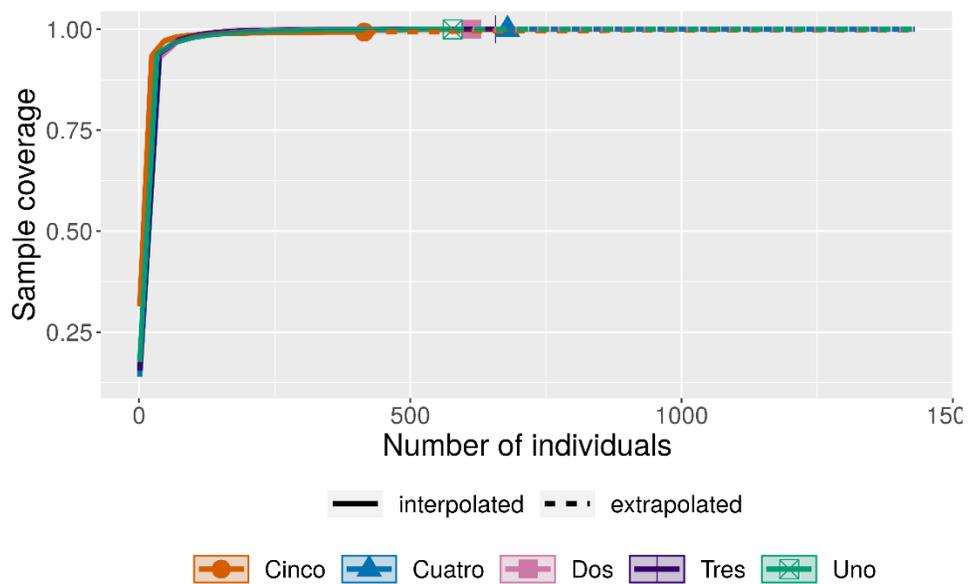


**Figura 20.** Cobertura de muestra por rarefacción para isla Clarión en medio Rennie. Cada icono representa un punto de muestreo, y su ubicación particular en la curva cuando se proyecta hacia el eje X, indica la cantidad real de UFC que se obtuvo durante el conteo en cada sitio en particular.

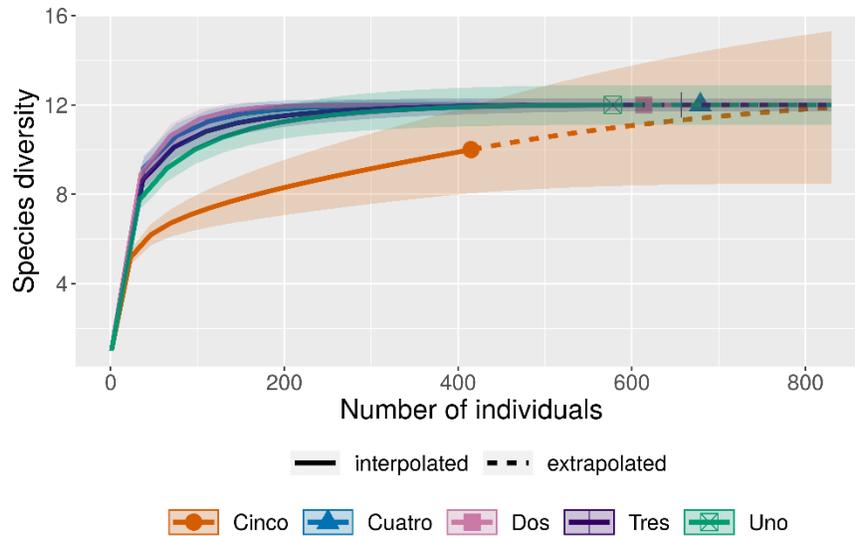


**Figura 21.** Riqueza efectiva de UTO por número de UFC para isla Clarión en medio sin nitrógeno reducido. La asíntota para cada sitio se forma en el valor de riqueza específica calculada para la cobertura de muestreo alcanzada en cada sitio.

Para isla Socorro en el medio ISP 2 para *Streptomyces*, la comunidad se encontraba representada con 257 UFC para el sitio 1, 171 para el sitio 2, 219 UFC para el sitio 3 y 189 UFC para el sitio 4. Para los cuatro primeros puntos se detectó un sobremuestreo de UFC; mientras que en el caso particular del sitio 5, hubo submuestreo ya que necesitarían 612 UFC para tener representada al menos a 90% de la comunidad de bacterias cultivables (Figura 22). Con la cantidad de UFC contabilizadas y la cobertura de muestreo alcanzada, la rarefacción calculó 12 UTO diferentes para los sitios 1, 2, 3 y 4, y 10 para el sitio 5. En este último caso del sitio 5, se requerirían al menos 830 UFC para llegar a las 12 UTO que calcularon para el resto de los sitios. (Figura 23).

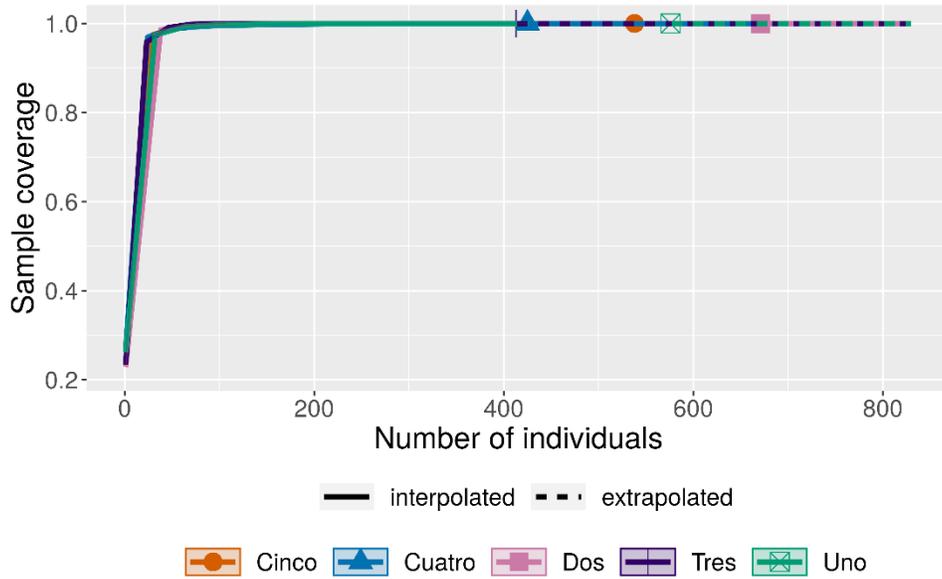


**Figura 22.** Cobertura de muestra por rarefacción para isla Socorro en medio ISP 2. Cada icono representa un punto de muestreo, y su ubicación particular en la curva cuando se proyecta hacia el eje X, indica la cantidad real de UFC que se obtuvo durante el conteo en cada sitio en particular.

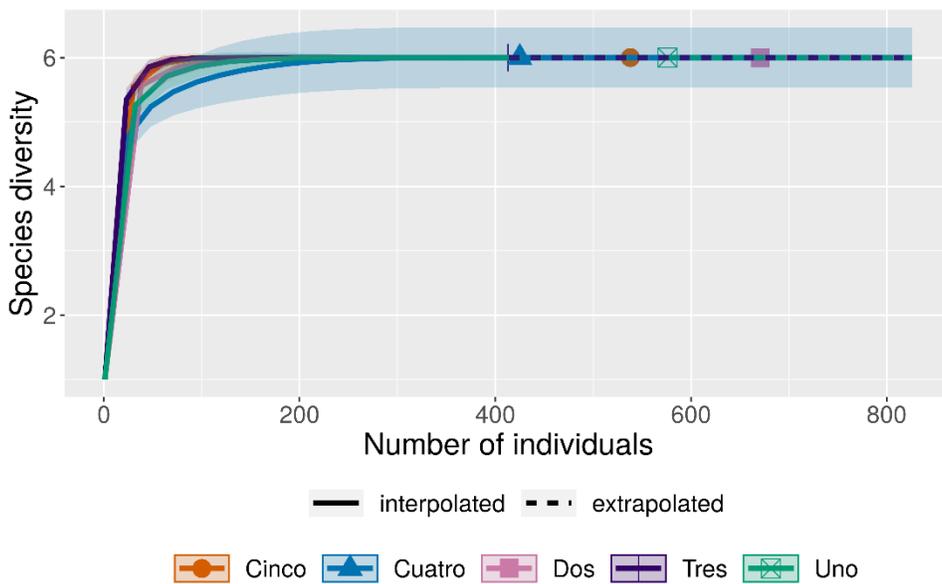


**Figura 23.** Riqueza efectiva de UTO por número de UFC para isla Clarión en medio sin nitrógeno reducido. La asíntota para cada sitio se forma en el valor de riqueza específica calculada para la cobertura de muestreo alcanzada en cada sitio.

Para isla Socorro en medio libre de nitrógeno, la comunidad se encuentra representada con 96 UFC para el sitio 1, 75 UFC para el sitio 2, 69 UFC para el sitio 3, 118 UFC para el sitio 4 y 90 para el sitio 5, lo cual denotó un sobremuestreo, pues los valores de UFC reales sobrepasaron los valores necesarios para tener representada a la comunidad bacteriana cultivable en este medio (Figura 24); encontrando en todos los sitios 6 UTO (Figura 25).



**Figura 24.** Cobertura de muestra por rarefacción para isla Socorro en medio Rennie. Cada icono representa un punto de muestreo, y su ubicación particular en la curva cuando se proyecta hacia el eje X, indica la cantidad real de UFC que se obtuvo durante el conteo en cada sitio en particular.



**Figura 25.** Riqueza efectiva de UTO por número de UFC para isla Socorro en medio Rennie. La asíntota para cada sitio se forma en el valor de riqueza específica calculada para la cobertura de muestreo alcanzada en cada sitio.

### Diversidad de UTOs: por índices de Shannon y Simpson

Respecto del análisis de la diversidad de UTOs, el índice Shannon (H) para las UTO del suelo de isla Clarión en medio ISP 2 para *Streptomyces* fue de 2.237 y para el suelo de isla Socorro, en el mismo medio de cultivo, fue de 2.061. El valor de este mismo índice, pero con el medio Rennie libre de nitrógeno reducido fue de 1.642 para isla Clarión y de 1.561 para isla Socorro, lo cual denota una diversidad similar en ambas islas al interior de cada medio de cultivo, pero al comparar entre ambos medios se observa que, la diversidad en medio libre de nitrógeno reducido fue menor que la diversidad en el medio ISP 2 para *Streptomyces* en ambas islas.

De igual manera, los valores obtenidos con el Inverso de Simpson para isla Clarión en medio ISP 2 fue de 8.1321 y para isla Socorro de 6.3213, mientras que el valor para el medio libre de nitrógeno reducido en isla Clarión fue de 4.7688 y en isla Socorro fue de 4.2068, lo cual sugiere una diversidad similar de UTOs con capacidad para crecer en el medio libre de nitrógeno reducido en ambas islas; mientras que para el medio ISP 2 para *Streptomyces* se obtuvo un valor mayor de diversidad en Isla Clarión. De igual manera, la diversidad obtenida fue mayor en medio ISP 2 en comparación a la diversidad obtenida en el medio libre de nitrógeno reducido.

### Identificación taxonómica de UTO

De los 159 UTO aisladas y criopreservadas, se obtuvieron 121 extracciones de ADN, de las cuales se secuenciaron 36: 15 provenientes de isla Clarión (todas forman parte del filo Actinobacteria) y 21 de la isla Socorro (16 pertenecientes al Filo Actinobacteria y 5 al Filo Firmicutes). En total, se identificaron 31 UTO pertenecientes al filo Actinobacteria y 5 UTO al Filo Firmicutes (**Figura 26**). Las 85 UTO que no pudieron ser secuenciadas permanecen congeladas con glicerol para ser utilizadas en futuros proyectos de investigación en el Laboratorio de Ecología de Microbiana de la UBIPRO. De las 36 secuencias obtenidas, 17 secuencias fueron agregadas al NCBI con los siguientes números de acceso:

SUB8583488 O\_-\_16\_Cla MW281027; SUB8583488 O\_-\_18a\_Cla MW281028; SUB8583488 O\_-\_29\_Cla MW281029; SUB8583488 O\_-\_31\_Cla MW281030; SUB8583488 O\_-\_32a\_Cla MW281031; SUB8583488 O\_-\_39\_Cla MW281032; SUB8583488 O\_-\_79\_Cla MW281033; SUB8583488 O\_-\_80\_Soc MW281034; SUB8583488 O\_-\_81\_Soc MW281035; SUB8583488 O\_-\_85\_Soc MW281036; SUB8583488 O\_-\_

\_88\_Soc MW281037; SUB8583488 O\_-\_115\_Soc MW281038; SUB8583488 O\_-  
 \_119\_Soc MW281039; SUB8583488 O\_-\_120\_Soc MW281040;  
 SUB8583488 O\_-\_126\_Soc MW281041; SUB8583488 O\_-\_134\_Soc MW281042; SUB8583488 O\_-  
 \_136\_Soc MW281043

<b>Etiquetas de fila</b>	<b>Cuenta de Especie</b>
<b>Clarión</b>	<b>15</b>
<b>Actinobacteria</b>	<b>15</b>
Actinobacteria	15
<b>Streptomycetales</b>	<b>15</b>
Streptomycetaceae	15
Streptomyces	15
<b>Socorro</b>	<b>21</b>
<b>Actinobacteria</b>	<b>16</b>
Actinobacteria	16
<b>Micrococcales</b>	<b>1</b>
Microbacteriaceae	1
Agromyces	1
<b>Streptomycetales</b>	<b>14</b>
Streptomycetaceae	14
Streptomyces	14
<b>Streptosporangiales</b>	<b>1</b>
Streptosporangiaceae	1
Nonomuraea	1
<b>Firmicutes</b>	<b>5</b>
Bacilli	5
<b>Bacillales</b>	<b>5</b>
Bacillaceae	2
Bacillus	1
Falsibacillus	1
Paenibacillaceae	3
Brevibacillus	3
<b>Total general</b>	<b>36</b>

**Figura 26.** Taxonomía y cantidad UTO obtenidas a partir de las secuenciaciones de 16S ARN de bacterias aisladas del suelo de las islas Socorro y Clarión

En términos generales, sin considerar la isla de origen, las UTO pertenecientes al Filo Actinobacteria se clasificaron en 1 clase, 3 órdenes, 3 familias, 3 géneros y 16 especies (Tabla 5).

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	<i>Agromyces ulmi</i>
		Streptosporangiales	Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea</i>	<i>Nonomuraea guangzhouensis</i>
		Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces antioxidans</i>
					<i>Streptomyces arcticus</i>
					<i>Streptomyces bambusae</i>
					<i>Streptomyces drozdowiczii</i>
					<i>Streptomyces ferralitis</i>
					<i>Streptomyces glauciniger</i>
					<i>Streptomyces krungchingensis</i>
					<i>Streptomyces luteus</i>
					<i>Streptomyces lutosisoli</i>
					<i>Streptomyces shaanxiensis</i>
					<i>Streptomyces sp.</i>
					<i>Streptomyces thinghirensis</i>
					<i>Streptomyces tritici</i>
					<i>Streptomyces zagrosensis</i>

**Tabla 5.** Taxonomía de las especies identificadas por secuenciación del 16S ARN pertenecientes al filo Actinobacteria sin considerar la isla de origen del suelo muestreado

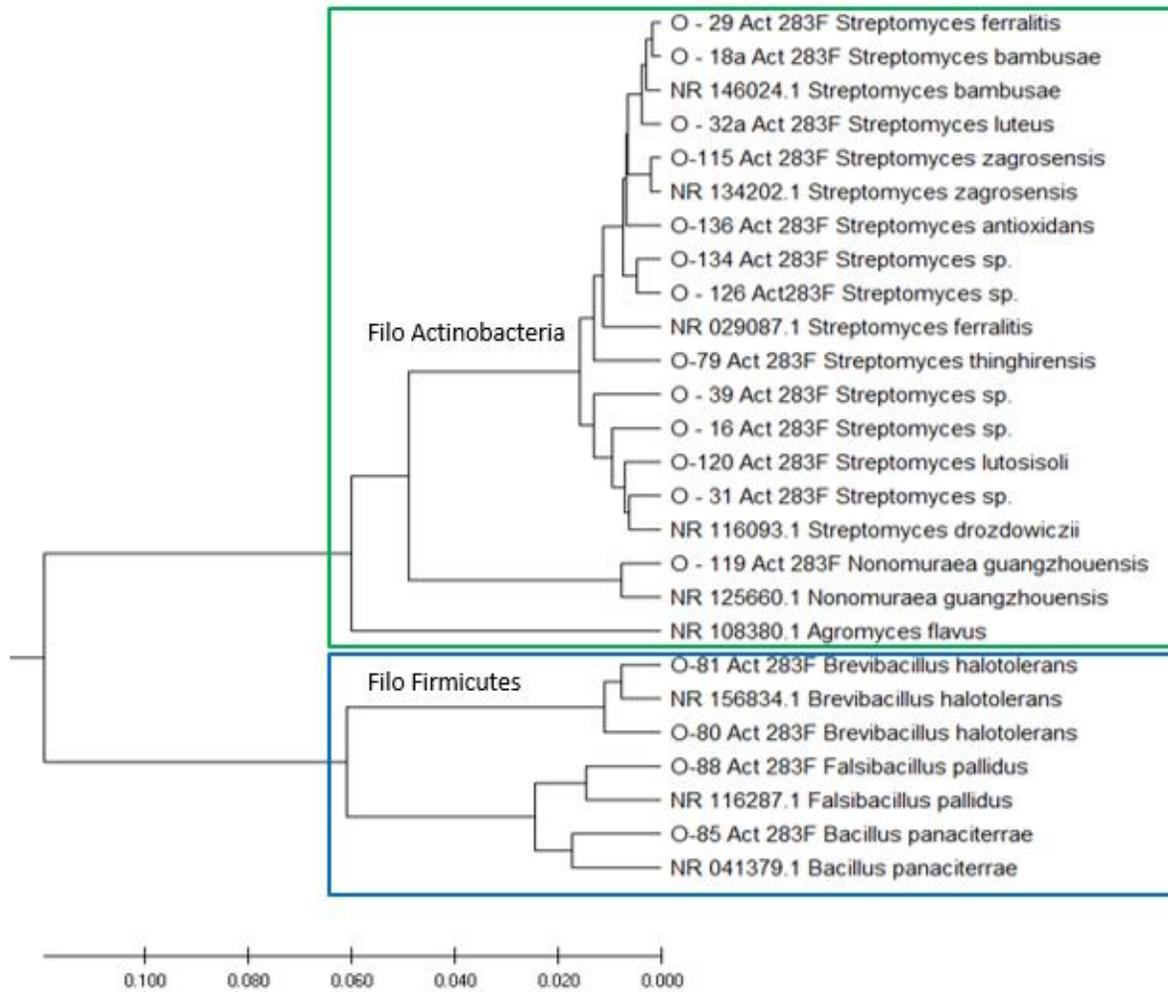
Para las bacterias ubicadas en el Filo Firmicutes, se identificó 1 clase, 1 orden, 2 familias, 3 géneros y 4 especies (Tabla 6).

Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus halotolerans</i>
					<i>Brevibacillus antibioticus</i>
			Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus panaciterrae</i>
				<i>Falsibacillus</i>	<i>Falsibacillus pallidus</i>

**Tabla 6.** Taxonomía de las especies identificadas por secuenciación del 16S RNA pertenecientes al filo Firmicutes sin considerar la isla de origen del suelo muestreado

### Construcción de árbol filogenético

Utilizando las 17 secuencias agregadas al NCBI se realizó un árbol filogenético con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) y con algunas secuencias de referencia obtenidas del GenBank del NCBI. Con este árbol se pudieron observar las relaciones de cercanía entre las especies obtenidas en las islas. De igual manera el árbol mostró dos grandes grupos: el primero conformado a partir de *Streptomyces ferralitis*, hasta *Agromyces flavus* siendo este grupo perteneciente al Filo Actinobacteria. En contraste, el segundo grupo se conformó desde la especie *Brevibacillus halotolerans* hasta *Bacillus panaciterrae* el cual conforma el grupo perteneciente al Filo Firmicutes (Figura 27).



**Figura 27:** Árbol filogenético construido con secuencias de genes de 16S ARN utilizando el método UPGMA. Este análisis involucró 17 secuencias de nucleótidos obtenidas en esta investigación marcadas con la inicial O y 9 secuencias de nucleótidos de cepas de Genbank marcadas con las iniciales NR

## Discusión

Los ecosistemas insulares poseen características particulares que los distinguen de los continentales debido al aislamiento geográfico en el que se encuentran. Entre estas características están la comunicación biológica que puede existir entre una isla y otra, y con las masas continentales a través de las corrientes de agua y viento, o bien directamente por la migración natural de diferentes organismos, y la inducida por la actividad humana. Si bien existen numerosos estudios sobre diversidad biológica realizados en islas, éstos se han centrado en algunos grupos de macroorganismos, principalmente de vertebrados, dejando de lado a los otros grupos biológicos, incluidos los microorganismos ([Ortiz-Alcaraz et al., 2017](#); [González-Zamora et al., 2016](#); [Mulcahy et al., 2014](#); [Fourrière et al., 2016](#); [Schaefer et al., 2014](#)).

La propia dinámica insular en términos de la biomasa establecida, y de las importaciones y exportaciones hace necesario el estudio de los microorganismos de los suelos insulares en diferentes aspectos, entre ellos, el estudio de la funcionalidad e identidad de los microorganismos es fundamental para entender diferentes aspectos de procesos tan importantes como los ciclos biogeoquímicos o el reciclaje de la materia orgánica. Para el archipiélago de Revillagigedo sólo existe un estudio relacionado con la identidad de las actinobacterias cultivables ([Quintar et al., 2022](#)), pero sin considerar ningún aspecto ecológico.

Las condiciones físicas y químicas del hábitat afectan el metabolismo y el crecimiento microbiano. En el suelo, la materia orgánica, la humedad, y la propia disponibilidad de nutrientes, la temperatura y la aireación influyen de manera determinante en la distribución y abundancia de los microorganismos ([Tate, 2000](#)). La zona de muestreo en Isla Socorro está ubicada en una región con mayor heterogeneidad ambiental comparada con la zona de muestreo seleccionada en isla Clarión ([Tabla 1](#)), evidenciada a partir de los diferentes tipos de cobertura vegetal. En isla Socorro, los puntos de muestreo 1 y 2 se encontraban ubicados en manchones de bosque de *Ficus* y *Croton* respectivamente; mientras que los sitios 3, 4, y 5, se ubican dentro del bosque mesófilo de montaña. Para isla Clarión, los muestreos se realizaron en una menor extensión geográfica y con cobertura casi uniforme de arbustos del género *Karwinskia*, y de una leguminosa rastrera, mismos que servían de refugio a una colonia de pájaros bobo. Esta situación no fue reportada para isla Socorro

(Matías, 2018, com. pers). El guano de aves marinas es una vía de ingreso muy importante de nitrógeno, fósforo, potasio y otros nutrimentos hacia el suelo de las islas, por lo que incluso se le considera como un potente fertilizante orgánico (Ríos-Campos *et al.*, 2014). Este aporte extra de nutrimentos, podría estar relacionado con las diferentes cantidades de UFC que pudieron contabilizarse en el suelo de cada isla. Se observó que en todos los grupos de morfologías coloniales en los dos medios de cultivo utilizados y puntos de muestreo (Figura 9, y 14), la cantidad de UFC fue mayor en isla Clarión respecto de isla Socorro.

También se observó que, al interior de cada isla, dependiendo del medio de cultivo utilizado y del punto particular de colecta, se presentaron diferentes patrones de abundancia de morfologías coloniales. En las dos islas, en todos los sitios de muestreo, en el medio para *Streptomyces* la morfología más abundante fue la de borde entero y forma convexa (G4) (Figura 5, 6, 7 y 8). Con el medio sin nitrógeno reducido sólo se formaron dos grupos morfológicos de colonias (borde filamentosos y borde entero). En Clarión sólo en el sitio 1 se presentaron diferencias significativas entre la cantidad de UFC de cada uno de estos grupos morfológicos; mientras que en isla Socorro estas diferencias se presentaron al interior del sitio 3 (Figuras 10, 11, 12 y 13).

La cantidad diferente de UFC en cada medio de cultivo para una misma muestra de suelo puede explicarse desde la perspectiva funcional. En este trabajo, por lo regular, en el medio sin nitrógeno adicionado (medio Rennie) crecía menor cantidad de UFC en comparación con el medio ISP 2 para *Streptomyces*. Debido a la metodología utilizada, en donde se mezcló la muestra de suelo con agua y después se hizo una dilución que se siembra en las cajas con medio de cultivo, se obtuvo una gran cantidad de actinobacterias del género *Streptomyces*. Estas bacterias producen esporas, las cuales incrementan la probabilidad de supervivencia a los cambios ambientales. Las esporas funcionaron como mecanismos de resistencia y dispersión, que al encontrar las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y nutrimentos en las cajas de cultivo, germinaron y permitieron apreciar su diversidad durante el conteo de sus UFC y posteriormente con su identidad taxonómica.

Aunque las bacterias son un grupo extremadamente versátil, con capacidad para utilizar una amplia gama de compuestos inorgánicos y orgánicos simples y complejos, presentan un uso diferencial de los recursos disponibles en función de sus características y

necesidades metabólicas (Lucena 2012; Romero *et al.*, 2012). Las bacterias que crecieron en el medio sin nitrógeno adicionado en forma de sales nitrogenadas (medio Rennie), deben tener al menos la capacidad de extraer del medio de cultivo, las cantidades traza de nitrógeno provenientes del extracto de levadura, ya que éste contiene péptidos que podrían funcionar como fuente de este elemento esencial o incluso, algunos de estos microorganismos podrían pertenecer al grupo funcional bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Estas condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno limitan la cantidad de bacterias que pueden crecer, a pesar de que éstas tienen varias fuentes de carbono (lactato de sodio, manitol, sacarosa y el propio extracto de levadura) que potencialmente pueden ser utilizadas en los procesos metabólicos de las propias bacterias. En el caso contrario, el medio ISP 2 para *Streptomyces* es considerado un medio rico ya que contiene tres fuentes de carbono (glucosa, extracto de levadura, y extracto de malta) y otros nutrientes. El extracto de levadura contiene vitaminas, glúcidos, y péptidos; mientras que el extracto de malta incluye disacáridos como maltosa y otros polisacáridos, además de nitrógeno en forma de proteínas. Este medio se seleccionó por estas características nutrimentales, además de estar reportado para el aislamiento y mantenimiento para el grupo de las actinobacterias del género *Streptomyces*, el más abundante dentro del Filo Actinobacteria (Wink, 2020). Como parte de la exploración de las bacterias cultivables de las islas Socorro y Clarión, se consideró que este grupo microbiano podría estar presentes en sus suelos, hipótesis que se confirmó con el análisis de las características morfológicas de las colonias bacterianas (filamentos aéreos y filamentosos, conformando colonias definidas) y de la extracción de ADN para su secuenciación.

A pesar de las limitaciones impuestas por la contingencia sanitaria de COVID-19 en los años 2020 y 2021, los datos generados mostraron que en ambas islas están presentes las actinobacterias del género *Streptomyces* (Figura 26), lo cual es coincidente con los datos publicados por Quintanar *et al.* (2022) para el suelo de isla Socorro. El Filo Actinobacteria se considera cosmopolita en la naturaleza, perteneciente a la clasificación de bacterias Gram+, y con una elevada proporción de guanina-citosina. El interés principal es su capacidad para producir moléculas bioactivas con aplicaciones médicas, agrícolas o biotecnológicas. Particularmente, el género *Streptomyces* es el más abundante de las actinobacterias. Son bacterias filamentosas de crecimiento micelar, que producen esporas que pueden permanecer inactivas por largo tiempo. Este género ha sido aislado de múltiples ambientes edáficos, por lo que su presencia en los suelos de ambas islas es un

reflejo de su amplia distribución. Este género es ampliamente estudiado principalmente por su producción de antibióticos, como la estreptomicina (Hamedi y Wink, 2017).

Para isla Socorro, en las actinobacterias, además del *Streptomyces*, en el presente trabajo también se reporta una secuencia de ADN para el género *Agromyces* y una secuencia para el género *Nanomuraea*. El género *Agromyces*, también se ha reportado en sustratos extraídos de las catacumbas de la antigua Roma (Jurado *et al.*, 2005), en la rizosfera de *Salix caprea* creciendo en suelos contaminados (Coretto *et al.*, 2016) y en sedimentos de lagos salinos (Yi *et al.*, 2022); mientras que *Nanomuraea*, ha sido aislado de ambientes tan diferentes como el suelo de una isla en Tailandia (Nakaew *et al.*, 2012), el suelo de la rizosfera de la lechuga (Cao *et al.*, 2019), o el suelo del desierto de Karakum, en Turkmenistán (Saygin *et al.*, 2020). En el caso del Filo Firmicutes, las cinco secuencias obtenidas pertenecen al orden Bacillales, que son bacterias Gram+, aerobias o anaerobias facultativas y productoras de endosporas. Este grupo de bacterias que también tiene la capacidad de producir compuestos secundarios bioactivos con aplicaciones biotecnológicas (Acuario *et al.*, 2020).

El presente trabajo es un estudio exploratorio de la diversidad de bacterias cultivables de los suelos de las islas Clarión y Socorro, por lo cual no se tenían antecedentes directos sobre la cantidad de bacterias que se encontraban en el suelo, y su relación con la cobertura y composición vegetal y las condiciones nutrimentales derivadas de la presencia de aves marinas.

Los resultados del análisis de las curvas de rarefacción indicaron que en términos generales, la cobertura de muestreo (Figuras 18 a 25) para ambos medios de cultivo en ambas islas, respecto del número de UFC contabilizadas y su relación con la diversidad de UTO, mostró que el muestreo estuvo por arriba del necesario para representar al menos al 90% de la diversidad de UTO cultivables en los medios de cultivo utilizados; con excepción del sitio 5 de isla Socorro en el medio *Streptomyces*, en el cual la curva calculó un submuestreo (Figura 23). Este sitio se encuentra ubicado en la localidad denominada *Campamento Pericos*, en el cual la vegetación dominante es el bosque mesófilo de montaña (Tabla 1). Este submuestreo podría ser explicado por múltiples factores, entre los que se encontraría la heterogeneidad física y química de los microambientes del suelo, misma que probablemente no fue capturada con la estrategia de sembrado utilizada en esta

investigación, así como también la presencia de otros organismos que no eran de interés y que no permitieron el correcto desarrollo de los grupos bacterianos.

Respecto de la diversidad de UTO, las curvas de rarefacción calcularon a partir de la cantidad de UFC que, en las dos islas, la riqueza efectiva de UTO, es decir, la cantidad de unidades taxonómicas operativas que son diferentes entre sí, es muy similar. En isla Clarión se calcularon 12 UTOs para los sitios 1, 2 y 3 para el medio *Streptomyces*, y 11 UTOs para el sitio 4. En isla Socorro se calcularon 12 UTO para los sitios 1 a 4, y 10 UTOs para el sitio 5. En el medio Rennie, la rarefacción calculó 6 UTO para todos los sitios de ambas islas. Aunque en primera instancia estas riquezas efectivas son similares, existen diferencias en cuanto a la cantidad de UFC que se requirieron para llegar a este número. Las curvas de rarefacción mostraron que se requiere mayor cantidad de UFC para representar al menos al 90% de la comunidad cuando se utiliza un medio rico como el *Streptomyces*, y que esta cantidad de UFC necesarias disminuye cuando se utiliza un medio pobre como el Rennie. Este comportamiento podría explicarse por las propias características nutrimentales de los medios de cultivo que promueven (medio *Streptomyces*) o limitan (medio Rennie) el crecimiento de los microorganismos.

Las diferencias descritas en las condiciones nutrimentales de los dos medios de cultivo utilizados también se reflejan en el valor de los índices de diversidad de Shannon y el inverso de Simpson. El valor del índice de Shannon utilizando el medio ISP 2 para *Streptomyces* en la isla Clarión fue de 2.23, mientras que para isla Socorro fue de 2.061; pero en el medio Rennie disminuyeron a 1.642 para isla Clarión y de 1.561 para isla Socorro. Con el índice del inverso de Simpson utilizando el medio ISP 2 para *Streptomyces*, el valor fue de 8.1321 para isla Clarión, y 6.3213 para isla Socorro. Con el medio Rennie, nuevamente los valores disminuyeron a 4.7688 para isla Clarión y 4.2068 para isla Socorro. Estas tendencias son consistentes con el comportamiento de la cantidad de UFC reportadas, y el comportamiento de la riqueza efectiva calculada por las curvas de rarefacción.

Los resultados obtenidos en esta investigación representan la primera aproximación al estudio de la ecología microbiana de los suelos de las islas Clarión y Socorro en el Archipiélago de las Revillagigedo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que están acotados al periodo de muestreo, el cual se realizó en noviembre de 2017 en isla Clarión y en diciembre de 2016 y enero de 2017 en isla Socorro. Esto es importante porque las fechas de colecta del suelo están fuera de la temporada de lluvias y de la influencia de los ciclones

en el Pacífico Mexicano (julio a octubre). Es por ello, que, para tener un panorama más completo de la dinámica microbiana en los mismos sitios, sería importante incluir en un nuevo estudio al menos un muestreo cuando la disponibilidad de agua en el suelo sea mayor y compararlo con los resultados reportados en esta tesis. La cantidad de humedad en el suelo tiene un papel fundamental en la dinámica microbiana de los ecosistemas estacionales e influye de manera directa en la abundancia de bacterias cultivables (González *et al.*, 2008). La disponibilidad del agua en el suelo permite el desplazamiento de las bacterias en la matriz del suelo, aumenta la actividad microbiana al facilitar el ingreso de sustratos oxidables, induce la hidratación intracelular microbiana, fomenta la liberación de nutrientes por mineralización, y también desencadena la lisis microbiana debida a los cambios en el potencial hídrico y el aumento y disminución de enzimas extracelulares en respuesta a sustratos orgánicos disponibles (Ramos y Zuñiga, 2008). Otro aspecto que se debe considerar en el estudio de la ecología microbiana del suelo de las islas es la dinámica del fuego. Se ha reportado que en la parte sur de isla Socorro se han presentado algunos incendios de origen natural (ocasionados por rayos o actividad volcánica) y otros por causas humanas, lo cual ha dado como resultado la pérdida de una extensión considerable de pastos y matorrales. Para la isla Clarión, en 1984 los incendios devastaron una porción importante de la vegetación (CONANP, 2004). El fuego produce una disminución de la biomasa microbiana, la reducción de su diversidad y de sus capacidades metabólicas lo cual impacta de manera directa a los ciclos biogeoquímicos y a la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Li *et al.*, 2019).

El presente estudio abre múltiples interrogantes en términos de la ecología microbiana en las islas Socorro y Clarión, por ejemplo: ¿Cuál es la dinámica estacional de las bacterias cultivables? ¿La riqueza efectiva calculada por las curvas de rarefacción qué tanto se refleja en la identificación y caracterización de diferentes UTOs? ¿Cuáles son las interacciones en las que participan las bacterias cultivables con otros microorganismos presentes en estos microambientes? ¿Cuál es la diversidad de bacterias de isla Socorro y Clarión, utilizando técnicas de metagenómica? ¿Cuáles son los factores físicos, químicos y nutrimentales que influyen en el desarrollo de los diversos grupos bacterianos? ¿Cuál es la diversidad beta de bacterias cultivables entre todas las islas que conforman el archipiélago de las Revillagigedo? ¿Qué cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser aisladas de los suelos de las islas que conforman el archipiélago de las Revillagigedo?

## Conclusiones

Ante la pregunta de investigación planteada en esta tesis sobre la diversidad de bacterias cultivables en los suelos de isla Clarión y Socorro en el archipiélago de Revillagigedo, se puede mencionar lo siguiente: este estudio es pionero en cuanto a la exploración de la diversidad de bacterias cultivables en suelos de estas islas, y en general para la ecología microbiota de los suelos de islas de México. La presencia de Actinobacterias indica una amplia distribución de este grupo biológico. En términos generales, la cobertura de muestreo utilizada para el trabajo microbiológico fue superior a la necesaria para contabilizar las UFC del suelo y estimar la riqueza efectiva de las UTOs. Esta información sienta las bases para un uso más eficiente de los recursos económicos, mismos que podrían ser invertidos en incrementar los puntos de muestreo dentro de cada isla. La diferente cantidad y diversidad de UFC detectada en cada medio de cultivo mostró aspectos funcionales diferentes de la comunidad microbiana cultivable lo que permite sugerir nuevas investigaciones que permitan comparar la diversidad beta de ambas islas. El uso combinado de técnicas tradicionales de cultivo e identificación molecular permitió generar información de tipo funcional y de identificación de especies, que en su conjunto proporcionan un panorama más integral de la diversidad de bacterias cultivables.

Finalmente, las investigaciones sobre la diversidad biológica de México, particularmente en las islas, no debe restringirse a organismos superiores, ya que, en la dinámica nutrimental de todos los ecosistemas, la diversidad de especies y la diversidad funcional de los microorganismos permiten el sostenimiento de la biota superior.

## Bibliografía

- Acuario, V. R. D., Tenorio, M. E. M., Medrano, J. K. A., Chiluisa-Utreras, V. P. (2020). Identificación molecular de cepas de *Bacillus spp.* y su uso como rizobacteria promotora del crecimiento en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 575 – 581.
- Aguirre-Muñoz, A., J.E., Bezaury-Creel, H. de la Cueva, I.J. March-Mifsut, E. Peters-Recagno, S. Rojas-González de Castilla y K. Santos-del Prado Gasca (Compiladores). (2010). *Islas de México, Un recurso estratégico*. Instituto Nacional de Ecología (INE), The Nature Conservancy (TNC), Grupo de Ecología y Conservación de Islas, A.C. (GECI), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).
- Almaguer, L. J., Ortiz, P. Y., Nicot, T. R., Reyes, H. A. (2009). Características microbiológicas de sustratos obtenidos a partir de cachaza y el residuo del beneficio húmedo del café en un suelo ferralítico rojo típico. *Centro Agrícola*, 36(2), 11-14.
- Álvarez, C. R. (2017). Evaluación de la diversidad metagenómica de una fuente termal del Santuario de Ampay-Apurímac, mediante el uso de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Tesis de licenciatura, Universidad Agraria La Molina. Biblioteca Agrícola Nacional.
- Baptista, L. F., Martínez, G. J. E. (2002). La investigación bioacústica de las aves del Archipiélago de Revillagigedo: un reporte de avance. Huitzil, *Revista Mexicana de Ornitología*, 3(2), 33-41
- Bennington, J.L. (1999). *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*. Madrid: Médica Panamericana.
- Bravo-Nuñez, E. (1991). Sobre la cuantificación de la diversidad ecológica. *Hidrobiológica*, 1, 87-93
- Bowman, W. D., Hacker, S. D., Cain, M. L. (2017). *Ecology* 4 edition: Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Calvo, V. P., Reymundo M. L. Zúñiga D. D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 141-148.
- Cadena-Zamudio, J. D., Martínez-Peña, M. D., Guzmán-Rodríguez, L. F., Arteaga-Garibay, R. I. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*. 9(2), 70-83.

- Cao, P., Wang, Y., Sun, P., Li C., Zhao, J., Jiang, S., Zhang, Y., Wang, X., Xiang, W. (2019). *Nonomuraea lactucae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of lettuce (*Lactuca sativa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 316-321
- Capello, R., Donovarros, C. Giono, S. (2000). La diversidad microbiana en México. CONABIO. *Biodiversitas*, 32, 6-10
- Carlson, J. S., Martínez-Gómez, J. E., Valkiūnas, G., Loiseau, C., Bell, D. A., Sehgal, R. N. M. (2013). Diversity and Phylogenetic Relationships of Hemosporidian Parasites in Birds of Socorro Island, México, and Their Role in the Re-Introduction of the Socorro Dove (*Zenaida graysoni*). *Journal of Parasitology*, 99(2), 270-276
- Chaves-Bedoya, G., Ortíz-Moreno, M. L., Ortiz-Rojas, L. Y. (2013). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*, 62(1), 66-72.
- Chao, A. y Chiu, C. H. (2016). Species Richness: Estimation and Comparison. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1-26
- Chao, A., Ma, K. H., Hsieh, T. C., Chiu, C. H. (2015). Online Program SpadeR (Species-richness Prediction And Diversity Estimation in R). Program and User's Guide published at [http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software\\_download/](http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/)
- CONABIO, (2021). ¿Cuántas especies hay? Consultado el 2021 en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp>
- CONANP. (2004). Programa de Conservación y Manejo Reserva de La Biosfera Archipiélago de Revillagigedo. México, D. F. Dirección General de Manejo para la Conservación, CONANP
- CONANP. (2019). Decretos, Programas de Manejo Consultado el 2021 en: <https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=82&reg=1>
- Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Compant, S., Gorfer, M., Kuffner, M., Brader, G. (2016). *Agromyces aureus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Salix caprea* L. grown in a heavy-metal-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3749-4754.
- Custodio, M., Huaraca-Meza, F., Peñaloza, R., Alvarado-Ibañez, J. C., De la Cruz-Solano, H. (2021). Bacterial composition in maca (*Lepidium meyenii* Walp) crop soils analyzed by metagenomics: a study in the central Andes of Peru. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 175-183

- De la Mora-Estrada, L. F., Ruiz-Montoya, L., Ramírez-Marcial, N., Morón-Ríos, A., Mayorga-Martínez M. C. (2017). Diversidad de chinches (Hemiptera: Heteroptera) en bosques secundarios de pino-encino de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 86-105
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical. Bulletin*, 19, 11-15.
- Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., Zhou, J. (2019). Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*. 9: 12000-12016
- Ferrera, C. R., Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2), 175-183.
- Fernández-Rendón, C. L., Barrera-Escorcia, G. (2013). Comparación de técnicas para la extracción de bacterias coliformes del sedimento del lago de Xochimilco, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(3), 180-184
- Fierer, N., Lennon, J. T. (2011). The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany*, 98(3), 439-448.
- Flores-Palacios, A., Martínez-Gómez, J. E., Curry, R. L. (2009). La vegetación de isla socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 84, 13-23.
- Fourrière, M., Reyes-Bonilla, H., Ayala-Bocos, A., Ketchum, J., Chávez-Comparan, J. C. (2016). Checklist and analysis of completeness of the reef fish fauna of the Revillagigedo Archipelago, Mexico. *Zootaxa*, (4), 436–466.
- Gárate-Lizárraga, I., González-Armas, R., Okolodkov, Y. B. (2018). Occurrence of *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae: Gonyaulacales) from the Archipiélago de Revillagigedo, Mexican Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 128, 390–395.
- García B. I. S. (2016). Caracterización metagenómica de sedimentos marinos para la identificación de bacterias con capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. CICY Repositorio
- González-Ruiz, T., Zaragoza, S. R., Cerrato, R. F. (2008). Fertility Islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands Zapotitlán Salinas, México. *Journal of Arid Environments*, 72, 1202-1212.
- González-Zamora, D. A., Angulo-Castellanos, L. F., Hernández-Vázquez, S., Almanza-Rodríguez, H., Aguilar, N. L. A. (2016). Presencia de la paloma turca

(*Streptopelia decaocto*) en el archipiélago de Revillagigedo, México. Huitzil, *Revista Mexicana de Ornitología*, 17, 151-154.

- Gutiérrez, R. A. L., Arellano, P. B. E., Gutiérrez, I. C., Escalera, Z. E., Romero, D. G. A., Saucedo, C. J., González, M. J. O., Zamudio, D. M. de la M., Martínez, F. M. G., Ortiz, de M. M. G., Flores, C. Y. (2020). Manual de Microbiología General I. 1a Edición. México. UNAM
- Halffter, G. (1994). ¿Qué es la biodiversidad? *Butlletí de la Institució Catalana d'Historia Natural*, 62, 5-14.
- Halffter, G. y Moreno, C. E. (2005). Significado biológico de las diversidades Alfa, beta y gamma. *M3M: Monografías Tercer Milenio*, 4, 5-18.
- Hamedi, J., Wink, J. (2017). Capítulo 1. Introduction 1. Biology and Biotechnology of Actinobacteria, En: Wink, J., Mohammadipanah, F., Hamedi, J. Switzerland: Editors. Springer.
- INECC. SEMARNAT. (2007). Reserva de la Biosfera Archipiélago de Revillagigedo. Consultado el 2021 en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/2/revill.html>
- Jurado, V., Groth, I., Gonzalez, J. M., Laiz, L., Schuetze, B., Saiz-Jimenez, C. (2005). *Agromyces italicus* sp. nov., *Agromyces humatus* sp. nov. and *Agromyces lapidis* sp. nov., isolated from Roman catacombs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 871–875
- Ketchum, J. T., Reyes, B. H. (2001). Taxonomía y distribución de los corales hermatípicos (Scleractinia) del Archipiélago de Revillagigedo, México. *Revista de Biología Tropical*, 49 (3-4), 803-848.
- Krebs, C. (2008). The Ecological World View. Australia. CSIRO.
- Lara-Lara, J. R., Arreola, L. J. A., Calderón, A. L. E, Camacho, I. V. F., de la Lanza, E. G., Escofet, G. A., Espejel, C. M. I., Guzmán, A. M., Ladah, L. B., López, H. M., Meling, L. E. A., Casasola, V. P. M., Reyes, B. H., Ríos, J. E., Zertuche, G. J. A. (2008). Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, 109-134.
- Li, W., Niu, S., Liu, X. (2019). Short-term response of the soil bacterial community to differing wildfire severity in *Pinus tabulaeformis* stands. *Scientific Reports*, 9, 1148
- Lucena R. T. (2012). Biodiversidad bacteriana marina: nuevos taxones cultivables. Tesis de doctorado, Universidad de Valencia.

- McVeigh, H. P., Munro, J., Embley T. M. 1996. Molecular evidence for the presence of novel actinomycete lineages in a temperate forest soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 17(3-4), 197-204
- Milton, J. S. (2001) Estadística Para Biología Y Ciencias De La Salud. 3ra Edición. España. McGRAW-HILL
- Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E. Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1249-1261
- Montaña, N. M., Sandoval-Pérez, A. L., Nava-Mendoza, M., Sánchez-Yañez, J. M., Garcá-Olivia, F. (2012). Variación espacial y estacional de grupos funcionales de bacterias cultivables del suelo de un bosque tropical seco en México. *Biología Tropical*, 61(1), 439-453
- Mulcahy, D. G., Martínez-Gómez, J. E., Aguirre-León, G., Cervantes-Pasqualli, J. A., Zug, G. R. (2014). Rediscovery of an Endemic Vertebrate from the Remote Islas Revillagigedo in the Eastern Pacific Ocean: The Clarión Nightsnake Lost and Found. *Plos One*, 9(2), 1-8.
- Nakaew, N., Sungthong, R., Yokota, A., Lumyong, S. (2012). *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 3007-3012.
- Núñez, I., González-Gaudiano, É., Barahona, A. (2003). La biodiversidad: historia y contexto de un concepto. *Interciencia*, 28(7), 387-393.
- Ospino, B. K. A., Castilla, P. M. G., Sánchez-Mora, R. M. (2017). Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. *NOVA*, 16(29), 91-100
- Ortega, T. (2020). La biodiversidad y su importancia. Consultado el 2020 en: [http://www.aragon.unam.mx/fes-aragon/public\\_html/documents/vida\\_universitaria/yomiplaneta/la-biodeversidad-y-su-importancia.pdf](http://www.aragon.unam.mx/fes-aragon/public_html/documents/vida_universitaria/yomiplaneta/la-biodeversidad-y-su-importancia.pdf)
- Ortiz-Alcaraz, A., Aguirre-Muñoz, A., Méndez-Sánchez, F., Rojas-Mayoral, E., Solís-Carlos, F., Rojas-Mayoral, B., Benavides-Ríos, E., Hall, S., Nevins, H., Ortega-Rubio, A. (2019). Ecological restoration of Socorro Island, Revillagigedo Archipelago, Mexico: the eradication of feral sheep and cats. Pp. 267–273. En:

Island Invasives: scaling up to meet the challenge. *Occasional Paper SSC*. Gland, Switzerland: IUCN.

- Ortiz-Alcaraz, A., Aguirre-Muñoz, A., Arnaud, G., Galina-Tessaro, P., Rojas-Mayoral, E., Méndez-Sánchez F., Ortega-Rubio, A. (2017). Progress in the eradication of the feral cat (*Felis catus*) and recovery of the native fauna on Socorro Island, Revillagigedo Archipelago, Mexico. *Therya*, 8(1), 3-9.
- Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-46.
- Parera-Valadez, Y., Yam-Puc, A., López-Aguilar, L. K., Borges-Argáez, R., Figueroa-Saldivar, M. A., Cáceres-Farfán, M., Márquez-Velázquez, N. A., Prieto-Davó, A. (2019). Ecological Strategies Behind the Selection of Cultivable Actinomycete Strains from the Yucatan Peninsula for the Discovery of Secondary Metabolites with Antibiotic Activity. *Microbial Ecology*, 77, 839–851
- Pérez-Mesa, M. R. (2013). Concepciones de biodiversidad: una mirada desde la diversidad cultural. *Magis Revista Internacional de Investigación en Educación*, 6 (12), 133-151.
- Quintanar, E. T., Maldonado, L. A., Contreras-Castro, L., Alejo-Viderique, A., García, M. E. E., Hernández-Guerrero, C. J., Cancino-Díaz, J. C., Sánchez, C., Ladino, L. A., Martínez-Gómez, J. E., Matías-Ferrer, N. (2022). On the Selective Isolation of Actinobacteria from Different Mexican Ecosystems. In (Ed.), *Actinobacteria - Diversity, Applications and Medical Aspects*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104699>
- Radulovich, R. (2009). Método gravimétrico para determinar in situ la humedad volumétrica del suelo. *Agronomía Costarricense*, 33(1), 121-124
- Ramos, V. E., Zúñiga, D.D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 123-130
- Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixation) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 8–14.
- Rillig, M. C., Kiessling, W., Borsch, T., Gessler, A., Greenwood, A. D., Hofer, H., Joshi, J., Schröder, B., Thonicke, K., Tockner, K., Weisshuhn, K., Jeltsch, F. (2015) Biodiversity research: data without theory –theory without data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 20

- Ríos-Campos, N., Luján-Salvatierra, Á., Benites-Castañeda, C., Ríos-Núñez, C. (2014). Efecto de tres dosis de guano de las islas en el rendimiento de *Solanum tuberosum* l. var. huayro en el zuro, Santiago de Chuco. *Sciendo*, 17(1), 81- 88
- Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Fernández-Linare, L., Rodríguez-Vázquez, R. (2002). Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia*, 36, 149-160
- Romero, M. A. A., Vásquez, J. A., Lugo, G. A. (2012). Bacterias, fuentes de energía para el futuro. *Tecnura*, 16(32), 118-143
- Sanvicente-Añorve, L., Hermoso-Salazar, M., Solís-Weiss, V., Salgado-Ugarte, I. H. (2010). Carapace relative growth of trapezia latreille, 1828 (Decapoda, Brachyura), crabs that are symbionts of hard corals, from clipperton atoll and the revillagigedo islands: ecological and zoogeographical implications. *Crustaceana*, 83(11), 1371-1383.
- Saygin, H., Nouioui I., Ay, H., Guven, K., Cetin, D., Hans-Peter, K., Goodfellow, M., Sahin, N. (2020). Polyphasic classification of *Nonomuraea* strains isolated from the Karakum Desert and description of *Nonomuraea deserti* sp. nov., *Nonomuraea diastatica* sp. nov., *Nonomuraea longispora* sp. nov. and *Nonomuraea mesophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 636-647.
- Scervino, J. M., Messuti, M. I., Solans, M., Vobis, G. (2014). Actinomicetes cultivables asociados a microecosistemas liquénicos de la selva templada valdiviana, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(4), 441-445.
- Schaefer, K. M., Fuller, D. W., Aldana, G. (2014). Movements, behavior, and habitat utilization of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in waters surrounding the Revillagigedo Islands Archipelago Biosphere Reserve, Mexico. *Fisheries Oceanography*, 23, 65–82.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16:313–340.
- Sofía, U. M. (2013). Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional De La Plata Facultad De Ciencias Exactas Departamento De Química. Argentina.
- Smith, T. M., Smith, R. L. (2007). Ecología 6ª edición. Madrid. Pearson Educación

- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bull, A. T., (2003). New primers for the class Actinobacteria: Application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 5(10), 828–841
- Tate, R.L. (2000). *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons. 2da Edición. 536 pgs.
- UNESCO World Heritage Center. (2019). Consultado el 2020 en: <http://whc.unesco.org/en/list/1510>
- Vargas-Flores, T., Kuno-Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594 – 2598
- Vivó, J. A., Camacho, J., Reyna, S. (1977). “Clarión: La Isla Mexicana más Lejana del Pacífico”. Anuario de Geografía 1975. Año XV. México: Facultad de Filosofía y Letras, *Colegio de Geografía, UNAM*, 11-49.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697–703.
- Wink, J. M. (2020). Methods for the taxonomic description of the Actinobacteria. DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Consultado el 2020 en: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/special-groups-of-organisms/compendium-of-actinobacteria>
- Yanez-Montalvo, A., Gómez-Acata, S., Águila, B., Hernández-Arana, H., Falcón, L. I. (2020). The microbiome of modern microbialites in Bacalar Lagoon, Mexico. *Plos One*, 15(3), 1-22
- Yanga, S., Martínez-Gómez, J. E., Sehgal, R. N. M., Escalante, P., Camacho, F. C. Douglas, A. B. (2011). A preliminary survey for avian pathogens in Columbiform birds on Socorro Island, Mexico. *Pacific Conservation Biology*, 17, 11–21
- Yi, B.F., Xia, T.T., Niu, M.M., Zhao, Z.Y., Su, Q.Y., Ming, H., Nie, G.X. (2020). *Agromyces agglutinans* sp. nov., isolated from saline lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72, 5208
- Zinger, L., Lique-Gobet, A., Pommier, T. (2012). Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*, 21, 1878–1896.