



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS



**“Caracterización de comunidades microbianas  
formadoras de biopelículas del intermareal rocoso de la  
zona centro–sur de Chile”**

Paula Marcela Martínez Paulós

Seminario de Título presentado al  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA  
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de  
BIOLOGO MARINO

Concepción – Chile

2024

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía

---

Dr. Marcelo Gutiérrez

Ha sido aprobada por la  
Siguiete Comisión  
Evaluadora

---

Dr. Fabián Tapia

---

Dr. Fernando Cruzat

Jefe de Carrera

---

Dr. Ariel Valenzuela

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi más profundo agradecimiento a todas las personas que estuvieron presentes y fueron significativas en la culminación de esta etapa tan importante de mi vida.

En primer lugar, agradezco infinitamente a mi familia por su apoyo incondicional en cada paso que he dado en mi día a día. Son mi roca, mi sostén, quienes me han brindado palabras de aliento en los momentos difíciles y me han dado la fuerza necesaria para seguir adelante. A mis hermanos, quienes siempre han sabido sacarme una sonrisa en los días grises, por acompañarme en cada etapa y por su amor incondicional. Y no puedo evitar mencionar a mis queridos perros, cuya compañía ha hecho más llevaderos todos los desafíos.

En segundo lugar, quiero agradecer a mis amigas y amigos, quienes han sido mi segunda familia, acompañándome en mi día a día, brindándome su confianza y estando a mi lado en las buenas y en las malas, en las peores y las mejores.

Agradezco al Dr. Marcelo Gutiérrez por ser mi guía y mentor en este camino, por confiar en mí, por tomarse el tiempo para responder mis preguntas, compartir su vasto conocimiento y su incansable paciencia, siendo fundamental para el éxito de este proceso. También quiero expresar mi gratitud a las chicas del laboratorio, en particular a Karina, por su disposición constante ante mis dudas, por ayudarme, guiarme con paciencia y por compartir su valiosa experiencia en el mundo de la ciencia.

Por último, quiero agradecer al Financiamiento Centro de Oceanografía COPAS Coastal FB210021 por hacer posible la realización de este Seminario de Título, lo cual ha sido fundamental para mi desarrollo académico y profesional. Sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE ANEXO .....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
2.1. Área de estudio y obtención de muestras .....	18
2.2. Caracterización de los factores considerados para el muestreo de biopelículas .....	20
2.3 Extracción de ADN .....	24
2.4 Amplificación del gen 16S ARN ribosómico por PCR .....	24
2.5 Recuento celular mediante tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) .....	25
2.6 Análisis bioinformático .....	26
3. RESULTADOS .....	27
3.1 Diversidad de la comunidad microbiana .....	27
3.2 Composición de la comunidad microbiana .....	31
3.3. Abundancia microbiana .....	38
4. DISCUSIÓN .....	46
5. CONCLUSIONES .....	51
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Diagrama conceptual del ciclo de vida de una biopelícula en tres pasos: asentamiento, crecimiento, y desprendimiento en grupos o dispersión de células (Paul Stodey y Peg Dirckx Center for Biofilm Engineering (CBE), Montana State University (EE. UU.)).	13
Fig. 2: Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreos.	18
Fig. 3: Registro correspondiente a la localidad de Chome, se observan dos condiciones: A) Exposición alta al oleaje, B) Exposición baja al oleaje	21
Fig. 4: Registro fotográfico de la localidad de Cocholgue diferenciando los niveles de exposición al oleaje en una plataforma rocosa. A) Exposición alta al oleaje, ubicada delante la plataforma rocosa, B) Exposición baja al oleaje, situada detrás de la plataforma rocosa.	22
Fig. 5: Registro fotográfico de las propiedades macroscópicas observadas de los niveles de rugosidad presentes en diferentes sustratos. Las imágenes A) y B) corresponden al sustrato liso ubicado en las localidades de Mrquiche y Desembocadura, respectivamente. Por otro lado, las imágenes C) y D) muestran el sustrato rugoso encontrado en las localidades de Cocholgue y Chome, respectivamente.	23
Fig. 6: Curvas de rarefacción de la diversidad alfa creadas por Rstudio	27
Fig. 7: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para las cinco localidades. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana	28
Fig. 8: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para la exposición alta y baja al oleaje. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana	29
Fig. 9: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para el sustrato liso y rugoso. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana	30
Fig. 10: Composición taxonómica a nivel de filós en las cinco localidades muestreadas	32

Fig. 11: Composición taxonómica a nivel de clases en las muestras por el nivel de exposición al oleaje .....	33
Fig. 12: Composición taxonómica a nivel de clases en las muestras por el nivel de rugosidad del sustrato .....	34
Fig. 13: Composición taxonómica a nivel de órdenes en las muestras por el nivel de exposición al oleaje .....	35
Fig. 14: Composición taxonómica a nivel de órdenes en las muestras por el nivel de rugosidad del sustrato .....	36
Fig. 15: Ordenación Multidimensional No Métrica (NMDS) basada en el análisis de similitud de Bray-Curtis de las comunidades microbianas con relación a la variable de la exposición al oleaje .....	37
Fig. 16: Ordenación Multidimensional No Métrica (NMDS) basada en el análisis de similitud de Bray-Curtis de las comunidades microbianas con relación a la variable de la rugosidad del sustrato .....	37
Fig. 17: Fotografías digitales (100x) de bacterias de sustrato rocoso teñidas con DAPI. (A) y (B) misma muestra, sin dilución inicial, con fijador glutaraldehído eliminado y tinción directa a la muestra; (C) y (D) misma muestra, sin lavado de muestra y tinción directa al filtro. Manchas negras corresponde a un exceso de vaselina. ....	39
Fig. 18: Registro fotográfico de observaciones microscópicas (100x) con tinción DAPI de microorganismos de las biopelículas .....	40
Fig. 19: Valores promedios del total de bacterias visualizadas por microscopia de epifluorescencia de las cinco localidades separadas por los factores estudiados, A) por nivel de rugosidad del sustrato, y B) por nivel de exposición .....	42
Fig. 20: Gráfico de dispersión de las variables de abundancia y diversidad .....	43
Fig. 21: Gráfico de dispersión lineal de las variables de diversidad y abundancia ...	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros ambientales y descripción de cada muestra recolectada en el intermareal rocos de cinco playas ubicadas en la región del Biobío. ....	19
Tabla 2: Identificación de muestras para análisis moleculares de las cinco localidades con sus respectivas variables .....	23
Tabla 3: Valores de los índices Chao1 y Shannon en función a las características de los sitios y sustratos muestreados: exposición (alta y baja) y sustrato (rugoso y liso). Valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar .....	31
Tabla 4: PERMANOVA de los factores exposición al oleaje y rugosidad del sustrato .....	38
Tabla 5: Identificación de muestras que fueron analizadas por microscopía con tinción DAPI. ....	41
Tabla 6: Valores de Diversidad por el índice Shannon y de Abundancia por el promedio de los conteos celulares. ....	43

## ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1: Tabla de valores de índices Chao1 y Shannon de las muestras. ....	52
Anexo 2: Prevalencia de los ASVs (representado por puntos) identificados en los conjuntos de muestras de los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato, agrupados por filo bacteriano. En el eje x se indica a abundancia y en el eje y su prevalencia (expresado como fracción del total de las muestras) de cada ASV. ....	53

## RESUMEN

La supervivencia y reproducción microbiana están intrínsecamente ligadas a la capacidad de colonizar superficies y formar biopelículas. Este proceso implica varias etapas, como la adhesión reversible, la producción de matrices extracelulares y la maduración arquitectónica, las cuales están influenciadas por las condiciones ambientales predominantes. En el entorno marino, las biopelículas desempeñan funciones vitales como la adhesión de macroalgas e invertebrados, y sirven como base de redes tróficas. En el caso específico del litoral rocoso, factores como la rugosidad de la superficie y la exposición al oleaje influyen en la formación y estructura de las biopelículas marinas. Este estudio se enfocó en investigar el impacto de la rugosidad y la exposición al oleaje en la abundancia y composición de microorganismos procariontes en sustratos rocosos de diferentes playas de la región del Biobío. Se emplearon técnicas de PCR y secuenciación para estudiar la diversidad microbiana, así como microscopía de epifluorescencia para evaluar su abundancia. Los resultados revelaron mayores diferencias en la diversidad y composición entre algunas localidades que respecto a las variables estudiadas, con variaciones que sugieren que la variable rugosidad del sustrato tiene un mayor efecto sobre la estructura de las comunidades microbianas. En cuanto a la abundancia, consistentemente las muestras de sustrato rugoso mostraron un mayor número total de bacterias en comparación con las de sustrato liso. Además, se observó que la exposición baja al oleaje presentaba una menor variabilidad en el número total de bacterias entre las localidades, con Merquiche exhibiendo el mayor número y Cocholgué el menor. Por el contrario, para la exposición alta al oleaje, los resultados mostraron una inversión de esta tendencia, con Cocholgué presentando el mayor número total de bacterias y Merquiche el menor. Los resultados de esta investigación sugieren que las características del sustrato son un factor más determinante para la composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas a biopelículas que la exposición al oleaje, sin embargo, podría haber otros factores ambientales que contribuirían a explicar los patrones de diversidad. Por ejemplo, localidades como la desembocadura del Biobío y Merquiche se diferenciaron marcadamente en la composición microbiana de las otras

localidades. Estas playas están bajo la influencia directa de agua dulce, lo que sugiere un efecto importante de la salinidad en la estructura de las biopelículas.

## ABSTRACT

Microbial survival and reproduction are intrinsically linked to the ability to colonize surfaces and develop biofilms. This process involves several stages, such as reversible adhesion, extracellular matrix production, and architectural maturation, which are influenced by environmental conditions. In the marine environment, biofilms perform vital functions, such as the adhesion of macroalgae and invertebrates, and have an important role in the food webs. In the rocky coastlines, substrate roughness and wave exposure influence the formation and structure of marine biofilms. This study was focused on investigating the impact of roughness and wave exposure on the abundance and composition of prokaryotic microorganisms on rocky substrates of different beaches in the Biobío region. PCR-based sequencing techniques were used to study microbial diversity, and epifluorescence microscopy to evaluate their abundance. The results revealed higher differences in diversity and composition between some localities than between the categories of the variables studied, with variations that suggest that the substrate roughness has a higher effect on the structure of the microbial communities than the wave exposure. In terms of abundance, samples from the rough substrate showed a higher total number of bacteria than those from smooth substrates. In addition, it was observed that low wave exposure presented less variability in the total number of bacteria among locations, with Merquiche exhibiting the highest number and Cocholgüe the lowest. On the contrary, for high wave exposure, the results showed Cocholgüe having the highest total number of bacteria and Merquiche the lowest. The results of this research suggest that the characteristics of the substrate have a higher influence than wave exposure on the composition and abundance of microbial communities associated with biofilms. However, other environmental factors could contribute to explaining the diversity patterns. For example, locations such as the mouth of the Biobío and Merquiche differed markedly in microbial composition from the other places. These two beaches are directly influenced by fresh water, suggesting a potential effect of salinity on biofilm structure.

## 1. INTRODUCCIÓN

La supervivencia y el éxito reproductivo de las bacterias en la mayoría de los entornos requieren la colonización en superficies y/o la integración en una comunidad de biopelículas, es por esto, que cuando las bacterias y las microalgas se asocian a las superficies segregan una matriz de polímeros extracelulares mucilaginosos (EPS) para formar una biopelícula microbiana (Decho, 2000). Esta matriz suele ser una mezcla de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos que unen las células (Madigan, 2018) y puede constituir aproximadamente el 75-95% del carbono orgánico total encontrado en la biopelícula, mientras que las células bacterianas representan solo el 5-25% (Costerton et al., 1994). Las EPS son secreciones mucosas de alto peso molecular (>100.000 daltons) de microorganismos y se secretan activamente en condiciones naturales como una adaptación al estrés ambiental (Muia et al., 2011).

Las interacciones entre microbios en una biopelícula permiten que una variedad de microorganismos coexista en entornos en los cuales un organismo individual no puede sobrevivir (Lawrence et al., 1996) ya que esta sirve de protección para los microorganismos frente a cambios rápidos en las condiciones ambientales como el pH, la salinidad, la desecación o los regímenes de nutrientes (Boyle & Reade, 1983). También, amortiguan los cambios en el suministro de sustrato orgánico (Freeman & Lock, 1995) debido a que la naturaleza polianiónica de los EPS los convierte en una matriz de intercambio iónico altamente adsorbente para metales catiónicos y moléculas orgánicas disueltas (Costerton et al., 1978).

La formación de una biopelícula se origina de manera integral a través de la interacción dinámica entre la biopelícula y su entorno, que implica procesos de transporte y transferencia, por un lado, y aumentos cuantitativos de los taxones componentes, así como la modificación y descomposición de la materia orgánica e inorgánica dentro de las biopelículas (Muia et al., 2011). En los sistemas marinos, las biopelículas tienen al menos tres roles claramente definidos: (1) como señales de asentamiento, adherencia y metamorfosis para diversas larvas de invertebrados marinos sésiles (Holmström et al., 1992; Thompson et al., 2005); (2) como sitios de adhesión primarios ya que facilitan el

asentamiento de propágulos de macroalgas e invertebrados (Hill & Hawkins, 1991), y (3) como base de las redes tróficas intermareales, siendo la principal fuente de producción primaria y la mayor biomasa consumida *in situ* (Thompson et al., 2005).

El proceso de formación de biopelículas puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento (Nazar, 2007).

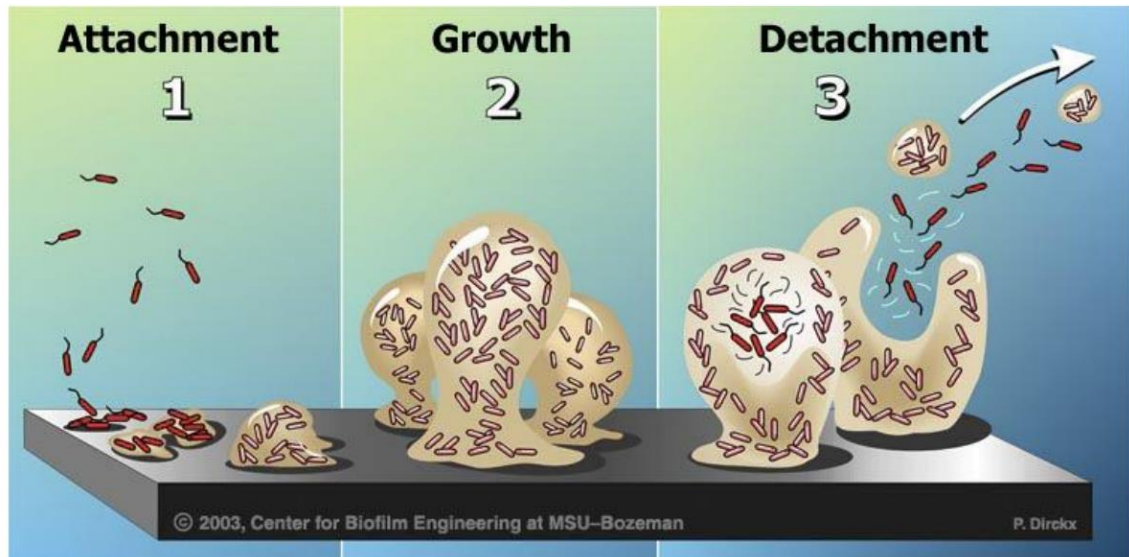


Fig. 1: Diagrama conceptual del ciclo de vida de una biopelícula en tres pasos: asentamiento, crecimiento, y desprendimiento en grupos o dispersión de células (Paul Stoodey & Peg Dirckx Center for Biofilm Engineering (CBE), Montana State University, EEUU).

La primera fase, comprende una adhesión inicialmente reversible de bacterias a una superficie, seguida por una adhesión irreversible mediante la secreción de exopolisacáridos (EPS). En la etapa inicial, las bacterias pueden desplazarse de manera independiente antes de comprometerse con la formación de la biopelícula. Una vez percibida una superficie, las bacterias proceden a formar una unión activa vía apéndices, como fimbrias, flagelos o pili (Nazar, 2007). A medida que las biopelículas evolucionan, desarrollan una arquitectura de microcolonias y canales de agua. Las microcolonias individuales pueden desprenderse de la superficie o revertirse a un estado planctónico que se alejan de estas estructuras encapsuladas en la matriz, dejando restos huecos o espacios vacíos que se incorporan a los canales de agua. Además, las microcolonias completas pueden liberarse naturalmente de la biopelícula, aunque los mecanismos

detrás de este fenómeno aún no se comprenden completamente. Estos procesos no están necesariamente sincronizados en toda la biopelícula, sino que a menudo son locales. Por lo tanto, en cualquier momento, una pequeña área de la superficie puede contener biopelículas en diferentes etapas de desarrollo. Este proceso de diferenciación implica cambios genéticos regulados, y diversos estudios han identificado genes relacionados con la adhesión y desarrollo de biopelículas (Stoodley et al., 2002).

La siguiente fase del desarrollo de la biopelícula, la maduración, resulta en la generación de una arquitectura compleja, canales, poros y una redistribución de bacterias lejos del sustrato (Davies et al., 1998).

Finalmente, en la tercera etapa, luego que la biopelícula ha alcanzado la madurez, algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación y desarrollo de la biopelícula. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas a la biopelícula, como factores ambientales o de procesos activos inducidos por éste (Costerton, 2001).

Estas etapas de desarrollo indican episodios significativos en la formación de una biopelícula bacteriana. Por lo general, se piensa que las bacterias en cada etapa del desarrollo de la biopelícula son fisiológicamente distintas de las células en otras etapas (Stoodley et al., 2002).

Los sistemas intermareales se ven afectados por diversos factores tanto físicos como biológicos, por ejemplo, la exposición al oleaje, el flujo de las mareas y el consumo herbívoro de fauna acompañante (Thompson et al., 2005). Según la literatura, los gradientes de exposición al oleaje afectan fuertemente la distribución y composición de la microbiota en el intermareal rocoso por lo cual la diversidad y estructura de estas comunidades dependería en un grado importante de la variación espacial de la exposición al oleaje (Smith & Simpson, 2002). Efectos indirectos de la exposición a las olas también se han demostrado en numerosos estudios como consecuencia de los cambios en la capacidad competitiva (Steffani & Branch, 2003) y la depredación (Robles & Desharnais, 2002), y a través de la modificación de factores físicos como el

estrés por emersión (Harley & Helmuth, 2003). Estos efectos indirectos de la acción del oleaje tienen un papel clave en la regulación de la estructura de las comunidades macrobióticas (Menge et al., 1994; Steffani & Branch, 2003). Por ejemplo, Thompson (2005) encontró que las diatomeas como *Achnanthes*, que están fuertemente adheridas al sustrato, pueden beneficiarse del aumento del flujo en lugares expuestos a las olas debido al aumento del suministro de nutrientes y el mayor potencial de actividad fotosintética en el agua, los cuales explicarían los patrones de abundancia microbiana. Por otro lado, para las cianobacterias describió un patrón estacional el cual es el causante de las variaciones en abundancia en las costas protegidas. Trabajos anteriores en costas moderadamente expuestas han indicado que los patrones estacionales en la abundancia de cianobacterias difieren entre niveles de marea, siendo máxima en un nivel inferior y superior de marea durante el invierno (Thompson et al., 2004).

Además de estos efectos físicos de la exposición al oleaje, la formación y estructura de una biopelícula depende también de las características del sustrato al cual se une (Nazar, 2007). La adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá más fácilmente en aquellas superficies más ásperas, más hidrofóbicas, y recubiertas por “films condicionantes”, ya que la micro- rugosidad de los sustratos puede aumentar la acumulación neta de células en las superficies al aumentar el área superficial para la adsorción celular y al resguardar las células adsorbidas de las fuerzas de corte; sin embargo, no se dispone de evidencia cuantitativa directa (Characklis, 1989). También se ha descrito que la colonización microbiana parece incrementar a medida que aumenta la aspereza de la superficie, esto sería debido a que están reducidas las fuerzas de deslizamiento, y el área de superficie se torna mayor (Thomas et al., 2006). Entre los factores abióticos, se ha demostrado que la naturaleza física de las superficies -en términos de rugosidad, capacidad térmica, color, carga, composición elemental y orgánica- afecta al asentamiento de una variedad de organismos marinos macro y microscópicos (Meadows & Campbell, 1972; Crisp, 1984; Little et al., 1986; Fletcher y Callow, 1992; Glasby, 2000; Terlizzi et al., 2000). Por ejemplo, las esporas de macro y microalgas y larvas de invertebrados, entre otros, pueden acumularse en las

irregularidades de la superficie de la roca y, según sus dimensiones, estas irregularidades superficiales pueden actuar como refugios para ciertas especies.

Otros factores como la química de la superficie (Railkin, 2003), el flujo de agua y los procesos de la capa límite (Santos et al., 1991), el tipo y estructura del sustrato, incluyendo la rugosidad de la superficie del sustrato (Stephenson, 1961; Harlin & Lindbergh, 1977; Faimali et al., 2004), son también importantes en el desarrollo de biopelículas en el intermareal.

Considerando los antecedentes antes planteados, este estudio busca evaluar el efecto de la variación en la rugosidad de la superficie de la roca y la exposición al oleaje sobre la abundancia y diversidad de microorganismos procariontes formadores de biopelículas en el litoral rocoso de la región del Biobío. Para llevar a cabo esta investigación, se utilizó un enfoque de análisis genómico para estudiar la diversidad microbiana. Además, se evaluó abundancia de estos microorganismos en las biopelículas a través de microscopía de epifluorescencia. La aplicación de un protocolo efectivo para la preparación de muestras y la posterior enumeración de bacterias es crucial para proporcionar una visualización consistente, ya que cada tipo de sedimento y/o sustrato presenta desafíos únicos. Por lo tanto, en esta investigación, la optimización de protocolos para muestras de sedimentos rocosos fue de primordial importancia.

## **Hipótesis de trabajo**

1. Las biopelículas presentes en el intermareal rocoso de ambientes con alta exposición al oleaje presentan mayor diversidad y abundancia microbiana
2. Sustratos de mayor rugosidad presentan mayor diversidad y abundancia de microorganismos presentes en las biopelículas del intermareal rocoso

## **Objetivo General**

Caracterizar la abundancia y diversidad de comunidades microbianas formadoras de biopelículas en el intermareal rocoso de la zona centro-sur de Chile.

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar la diversidad microbiana y su abundancia en biopelículas del intermareal rocoso expuestas a diferentes niveles de oleaje.
2. Caracterizar la composición y abundancia microbiana de las biopelículas provenientes de sustratos rugosos y lisos en la zona centro-sur de Chile.
3. Evaluar el efecto de la exposición al oleaje y la rugosidad del sustrato en la comunidad microbiana de las biopelículas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Área de estudio y obtención de muestras

Las muestras fueron recolectadas durante la marea baja en octubre de 2023 en el intermareal rocoso de la Región del Biobío, en 5 playas abarcando 45 km aproximadamente de costa en las siguientes localidades: Merquiche ( $36^{\circ}29'7\text{S}$ ,  $72^{\circ}54'\text{O}$ ), Cocholgue ( $36^{\circ}35'\text{S}$ ,  $72^{\circ}58'\text{O}$ ), Punta de Parra ( $36^{\circ}39'\text{S}$ ,  $72^{\circ}58'\text{O}$ ), Caleta Chome ( $36^{\circ}46'\text{S}$ ,  $73^{\circ}12'\text{O}$ ) y Desembocadura del Río Biobío ( $36^{\circ}48'\text{S}$ ,  $73^{\circ}10'\text{O}$ ).

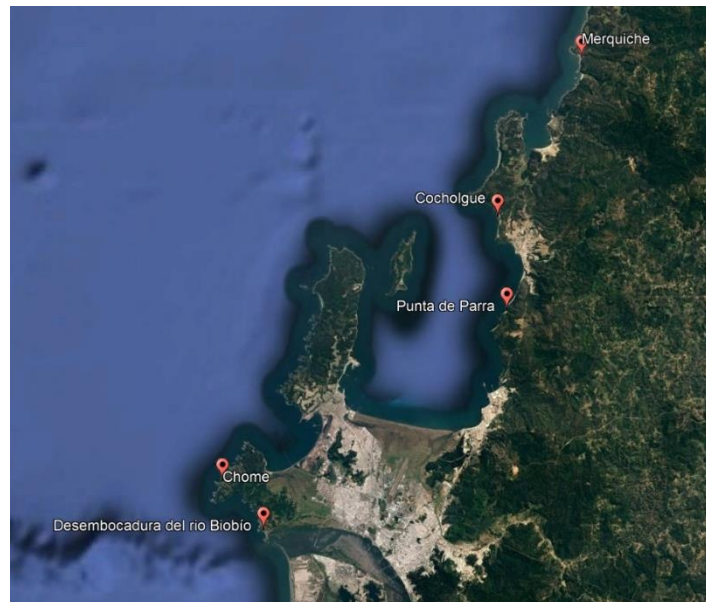


Fig. 2: Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreos

Se establecieron dos puntos de muestreo en cada playa (sitio 1 y sitio 2), en donde el sitio 1 se encontraba expuesto directamente al oleaje y el sitio 2 presentaba una exposición baja al oleaje. Cada sitio fue fotografiado antes de la extracción para documentar la rugosidad de la roca, la cual fue catalogada según sus características texturales evaluadas macroscópicamente. Se seleccionaron aleatoriamente las rocas a muestrear en cada sitio las cuales no debía contener invertebrados, ya que su presencia podría haber influido en los patrones de biomasa y diversidad de las comunidades de biopelículas epilíticas (Thompson et al., 2004). La obtención de muestras se llevó a cabo

mediante el uso de un cincel y martillo, ambos esterilizados previamente con alcohol para evitar contaminación. Se extrajeron cuatro muestras superficiales en cada sitio (dos para análisis moleculares y dos para análisis microscópicos) dando un total de ocho muestras por playa. Las muestras destinadas para análisis moleculares fueron recolectadas en tubos de centrifuga de 15 mL con 1 mL de ARN Later, esto con el fin de preservar mejor la muestra y poder ser transportadas en frío hasta el laboratorio donde fueron almacenadas inmediatamente a -20°C. Por otra parte, las muestras destinadas a análisis de abundancia mediante microscopía de epifluorescencia fueron recolectadas y colocadas en tubos de centrifuga Falcon de 15 mL. Estos tubos contenían 400 µL de glutaraldehído, junto con la adición de 9,6 mL de agua de mar filtrada in situ mediante el uso de filtros de 0,22, alcanzando así una concentración final del 1% v/v. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio

Tabla 1: Parámetros ambientales y descripción de cada muestra recolectada en el intermareal rocos de cinco playas ubicadas en la región del Biobío.

<b>MUESTRAS</b>	<b>LUGAR</b>	<b>EXPOSICION</b>	<b>RUGOSIDAD</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>ALTURA MAREA</b>
1	Chome	Alta	Liso	13,53 °C	0,6 m
2	Chome	Alta	Rugoso	13,53 °C	0,6 m
3	Chome	Baja	Rugoso	13,53 °C	0,6 m
4	Chome	Baja	Rugoso	13,53 °C	0,6 m
5	Desembocadura	Baja	Liso	13,69 °C	0,7 m
6	Desembocadura	Baja	Liso	13,69 °C	0,7 m
7	Desembocadura	Alta	Rugoso	13,69 °C	0,7 m
8	Desembocadura	Alta	Liso	13,69 °C	0,7 m
9	Merquiche	Baja	Rugoso	13,84 °C	0,6 m
10	Merquiche	Baja	Liso	13,84 °C	0,6 m
11	Merquiche	Alta	Liso	13,84 °C	0,6 m
12	Merquiche	Alta	Liso	13,84 °C	0,6 m
13	Punta de Parra	Baja	Rugoso	12,98 °C	0,7 m
14	Punta de Parra	Baja	Rugoso	12,98 °C	0,7 m

15	Punta de Parra	Alta	Liso	12,98 °C	0,7 m
16	Punta de Parra	Alta	Rugoso	12,98 °C	0,7 m
17	Cochohgüe	Alta	Rugoso	12,62 °C	0,5 m
18	Cochohgüe	Alta	Rugoso	12,62 °C	0,5 m
19	Cochohgüe	Baja	Liso	12,62 °C	0,5 m
20	Cochohgüe	Baja	Rugoso	12,62 °C	0,5 m

## 2.2. Caracterización de los factores considerados para el muestreo de biopelículas

Se recolectaron un total de 20 muestras del intermareal rocoso en cinco playas de la región del Biobío durante marea baja, con el propósito de realizar análisis de diversidad y abundancia de microorganismos. Durante la selección de las muestras, se consideraron dos factores principales: exposición al oleaje y rugosidad del sustrato.

Para el factor de exposición al oleaje, se categorizó como alta aquellas muestras en las que el oleaje impactaba directamente las biopelículas incluso durante marea baja. Estas áreas se caracterizan por una alta energía del mar, donde el impacto del oleaje es significativo y constante. En estas zonas, las biopelículas están directamente expuestas al oleaje fuerte y pueden experimentar una mayor turbulencia y erosión. Por otro lado, se consideró exposición baja a aquellas muestras ubicadas en áreas más protegidas o resguardadas del intermareal. Estas áreas, con baja energía del mar, pueden estar ubicadas detrás de rocas más grandes o en los laterales de las playas/bahías estando así menos expuestas, lo que resulta en un oleaje más calmado y menos turbulento para las biopelículas.

En la Figura 3, se presentan los parámetros utilizados para distinguir entre exposición alta y baja al oleaje en la localidad de Chome. Figura 3.A representa la exposición alta al oleaje, donde las olas llegan directamente sin obstáculos evidentes, y la Figura 3.B muestra la exposición baja al oleaje, donde se identifica una barrera rocosa que protege el área, impidiendo que las olas lleguen con fuerza y de manera directa. En la Figura 4, se observa la localidad de Cochohgüe, donde las muestras fueron recolectadas a lo largo

de una plataforma rocosa. En esta área, la diferencia en los niveles de exposición al oleaje está determinada por la ubicación en esta plataforma rocosa. La Figura 4.A corresponde a la exposición alta al oleaje, ubicada delante de la plataforma rocosa donde las olas impactan directamente. Por otro lado, la Figura 4.B muestra la exposición baja al oleaje, situada detrás de la plataforma rocosa, en una poza formada donde el agua de las olas llega sin romper, evitando el impacto directo de las mismas.



Fig 3: Registro correspondiente a la localidad de Chome, se observan dos condiciones: A) Exposición alta al oleaje, B) Exposición baja al oleaje.



Fig. 4: Registro fotográfico de la localidad de Cocholgue diferenciando los niveles de exposición al oleaje en una plataforma rocosa. A) Exposición alta al oleaje, ubicada delante la plataforma rocosa, B) Exposición baja al oleaje, situada detrás de la plataforma rocosa.

Para evaluar la rugosidad del sustrato, se realizó una observación macroscópica como se observa en la Fig.5. En este sentido, se consideraron rocas rugosas aquellas con prominencias notables y superficies irregulares, mientras que las rocas lisas presentaban una superficie más uniforme y sin destacadas irregularidades.



Fig. 5: Registro fotográfico de las propiedades macroscópicas observadas de los niveles de rugosidad presentes en diferentes sustratos. Las imágenes A) y B) corresponden al sustrato liso ubicado en las localidades de Mrquiche y Desembocadura, respectivamente. Por otro lado, las imágenes C) y D) muestran el sustrato rugoso encontrado en las localidades de Cocholgue y Chome, respectivamente .

Tabla 2: Identificación de muestras para análisis moleculares de las cinco localidades con sus respectivas variables

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Localidad</b>	<b>Exposición</b>
Muestra2	22-oct-23	Chome	alta
Replica1	22-oct-23	Chome	alta
Muestra4	22-oct-23	Chome	baja
Replica2	22-oct-23	Chome	baja
Muestra6	22-oct-23	Desembocadura	baja
Replica3	22-oct-23	Desembocadura	baja
Muestra14	22-oct-23	Merquiche	baja
Replica5	23-oct-23	Punta de Parra	alta
Muestra16	23-oct-23	Punta de Parra	alta
Replica6	24-oct-23	Cocholgue	alta

Muestra18	24-oct-23	Cocholgue	alta
Replica7	24-oct-23	Cocholgue	baja
Muestra20	24-oct-23	Cocholgue	baja
Replica9	22-oct-23	Merquiche	baja

### 2.3. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de cada muestra mediante el uso del kit de extracción de ADN de sedimento DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante para lograr rendimientos óptimos (se utilizó un protocolo alternativo con un volumen final de 50 µL). En primer lugar, fue necesario separar la biopelícula de la muestra mediante la molienda de los fragmentos en un molidor de cerámica durante 5 minutos y se agregó 500 mL de agua de mar filtrada. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a los tubos indicados por las instrucciones del kit y se prosiguió con el protocolo. Las concentraciones y calidad de ADN extraído se determinaron por fluorescencia con un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, Inc.).

### 2.4. Amplificación del gen 16S ARN ribosómico por PCR

Posteriormente se procedió a amplificar el gen 16S ARNr a partir del ADN extraído anteriormente mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El máster mix constó de partidores universales 341F-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGGCCCGCCGCCCCCCCCCCCCCTACGGGAGGCAG-3') con abrazaderas GC en su extremo 5') y 907r (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Muyzer et al., 1993).

La PCR de las biopelículas constó con un paso inicial de incubación a 95°C durante 2 minutos para lisar las células, seguido de la amplificación por PCR (35 ciclos de 30 s a 95°C, 40 s a 57°C, 40 s a 72°C, seguidos de 5 min a 72°C). Se visualizaron los productos de la PCR tras electroforesis a 400 mV durante 40 min en geles de agarosa al 1% preparados en tampón TAE 1X con tinción de gel de ADN 6X Load Dye EXP09/17. Finalmente, se procedió a la secuenciación del fragmento del gen 16 S a partir de los productos PCR obtenidos con partidores Bakt\_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y

Bakt\_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC en el laboratorio comercial Macrogen Inc.

## **2.5. Recuento celular mediante tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)**

El protocolo para la enumeración de bacterias en sedimentos rocosos utilizado fue el descrito por Epstein & Rossel (1995) modificado por Hymel & Plante (1998), cabe recalcar que dicho método era específicamente para sedimento arenoso por lo que fue necesario añadir modificaciones.

Para comenzar, se realizó una dilución inicial la cual consiste en agregar 5 mL de la muestra en un tubo Falcon de 50 mL y adicionar 45 mL de agua MilliQ. Posteriormente, se sometió la muestra a sonicación durante 10 minutos, intercalando períodos de enfriamiento cada 5 minutos para evitar el mayor daño celular. Tras la sonicación, se dejó reposar la muestra un mínimo de 30 segundos para llevar a cabo el lavado de la muestra, en donde se extrajo el sobrenadante, se trasladó a un vaso precipitado y se reservó. Posteriormente, se agregó 7 mL de agua MiliQ a la muestra, se agitó vigorosamente el sedimento, tras 30 segundos en que se deja reposar la muestra, se extrajo y agregó al vaso precipitado. Dicho lavado se repitió 6 veces más teniendo un total de 8 sobrenadantes. Las fracciones de sobrenadante se combinaron, se diluyeron con 100 mL de agua MilliQ para así tener una dilución final 1:20. Posteriormente, se filtraron 3 mL de la muestra sobre filtros de membrana de policarbonato negro de 0.2  $\mu\text{m}$  soportados por filtros de 0.8  $\mu\text{m}$  en el sistema de filtrado. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de tinción 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Porter & Feig, 1980) directamente al filtro y se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad. Finalmente se lava el filtro con agua MiliQ para eliminar el exceso de tinción, se extrae el filtro y se montó sobre un portaobjeto, se añadió una gota de vaselina filtrada ( $<0.2\mu\text{m}$ ) a el filtro y se cubrieron con cubreobjetos. Las bacterias fueron enumeradas a 100x de magnificación mediante un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss Axioskop 2 integrado con una cámara Carl Zeiss AxioCam MRm utilizando un juego de filtros DAPI de Zeiss, y se visualizaron veinte campos microscópicos.

## 2.6. Análisis bioinformático

Las muestras fueron secuenciadas mediante la plataforma MiSeq Illumina. Las lecturas fueron procesadas utilizando el paquete de software de QIIME versión 1.9.1 (Caporaso et al., 2011). Luego, por medio de Rstudio, se utilizó el paquete DADA2 para obtener Variantes de Secuencia de Amplicón (ASVs), los cuales sirvieron como indicadores de Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs). Se generaron curvas de rarefacción con el paquete R phyloseq, permitiendo identificar la eficiencia del muestreo. Se definió un esfuerzo de muestreo de 6.859 lecturas por muestra (menor número de lecturas por muestra) para el submuestreo por rarefacción para las comparaciones de diversidad microbiana entre los factores de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato.

Posteriormente se realizó el análisis de diversidad alfa (índices Shannon y Chao1). Se estimó la similitud a nivel ASV con la matriz de distancia de Bray-Curtis para luego poder llevar a cabo el análisis de ordenación de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) y un análisis de variación permutacional (PERMANOVA) para caracterizar las diferencias en la composición de las biopelículas. Todos los análisis multivariados fueron llevados a cabo con el paquete R vegan. Finalmente, se realizó un análisis bivalente con el fin de estudiar la correlación lineal entre las diversidades dadas por el índice de Shannon y la abundancia de las muestras con los datos de los promedios de los conteos celulares, calculándose para ello los coeficientes de Pearson y Spearman para datos que no presentaron distribución normal.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Diversidad de la comunidad microbiana

Se identificaron un total de 282.604 secuencias de alta calidad en 14 muestras luego de la eliminación de secuencias identificadas como cloroplastos y quimeras.

Se realizaron curvas de rarefacción (Figura 6) para evaluar el esfuerzo de muestreo, los resultados indican que todas alcanzan el plató sugiriendo un muestreo representativo en cada caso.

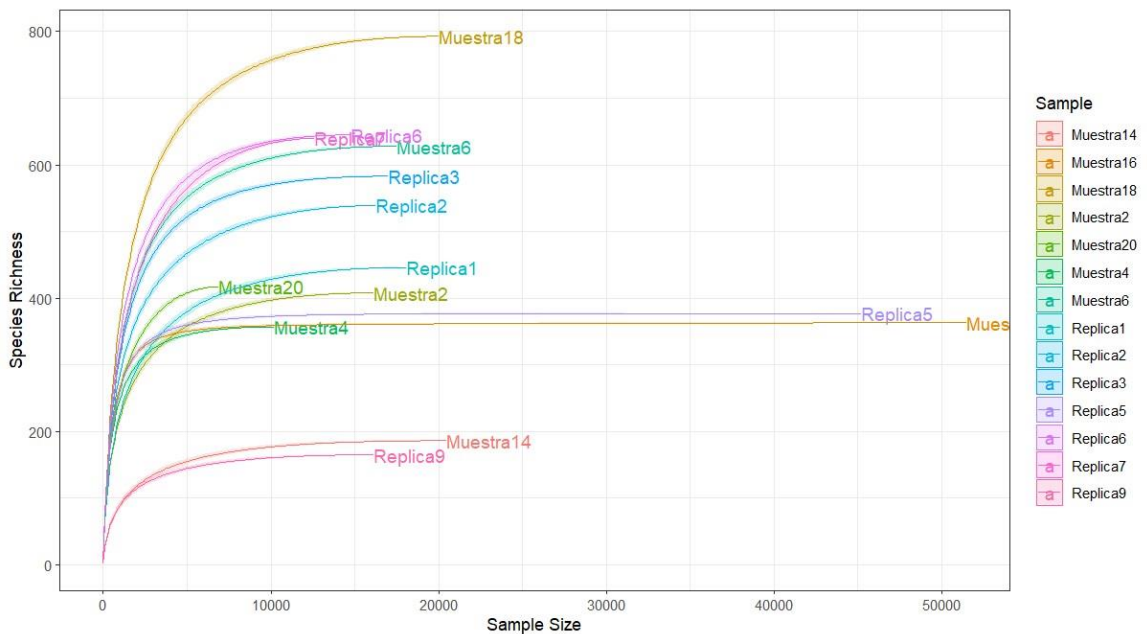


Fig. 6: Curvas de rarefacción de la diversidad alfa de cada muestra creadas en Rstudio

Después de realizar el submuestreo por rarefacción de las muestras, se obtuvo un total de 96.026 secuencias utilizando un mínimo de 6.859 secuencias por muestra, valor correspondiente a la muestra con menos secuencias. De esta manera, se logró estandarizar el número de secuencias por muestra y contrastar la diversidad en las muestras de manera equitativa, independiente de diferencias en número de secuencias de cada muestra (Nervi, 2020).

Se procedió a un análisis de la diversidad alfa la cual hace referencia a la variabilidad de especies dentro de una comunidad específica. Para medirla, se utilizaron los índices de Shannon y Chao1. El primero considera tanto la riqueza de especies como la equidad de su distribución, mientras que el índice Chao1 estima la riqueza total de especies.

La Figura 7 representa una comparación de la diversidad (Chao1 y Shannon) de todas las muestras agrupadas según su localidad sin diferenciar por factor. Se observa fuertes variaciones entre las localidades para ambos índices. Por ejemplo, en Cocholegüe y Desembocadura, se encontraron los valores más altos en ambos índices, mientras que Merquiche exhibió la más baja diversidad y riqueza. Por otra parte, las localidades de Punta de parra y Chome presentaron una alta diversidad Shannon con una riqueza relativamente baja. En cuanto a la variabilidad de los índices de diversidad, Chome y Cocholegüe muestran un mayor rango de variabilidad en relación con Merquiche, Desembocadura y Punta de parra.

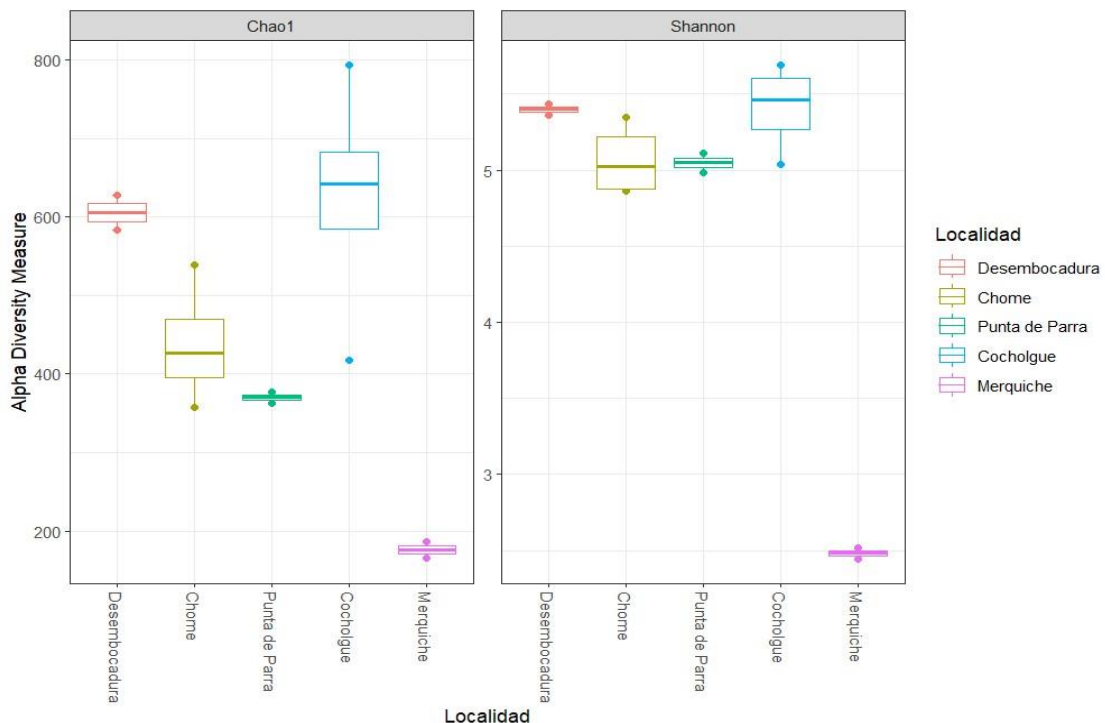


Fig. 7: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para las cinco localidades. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana.

incluyendo los datos provenientes de todas las localidades. Se aprecia valores similares en los índices entre ambos niveles de exposición. El índice de Shannon y Chao1 para los datos agrupados según su factor de rugosidad del sustrato (rugoso y liso; Figura 9), mostró una mayor variabilidad, en comparación con el factor de exposición al oleaje, siendo el índice Shannon el cual muestra un rango de variabilidad notoriamente mayor, no apreciándose claras diferencias entre ambas categorías.

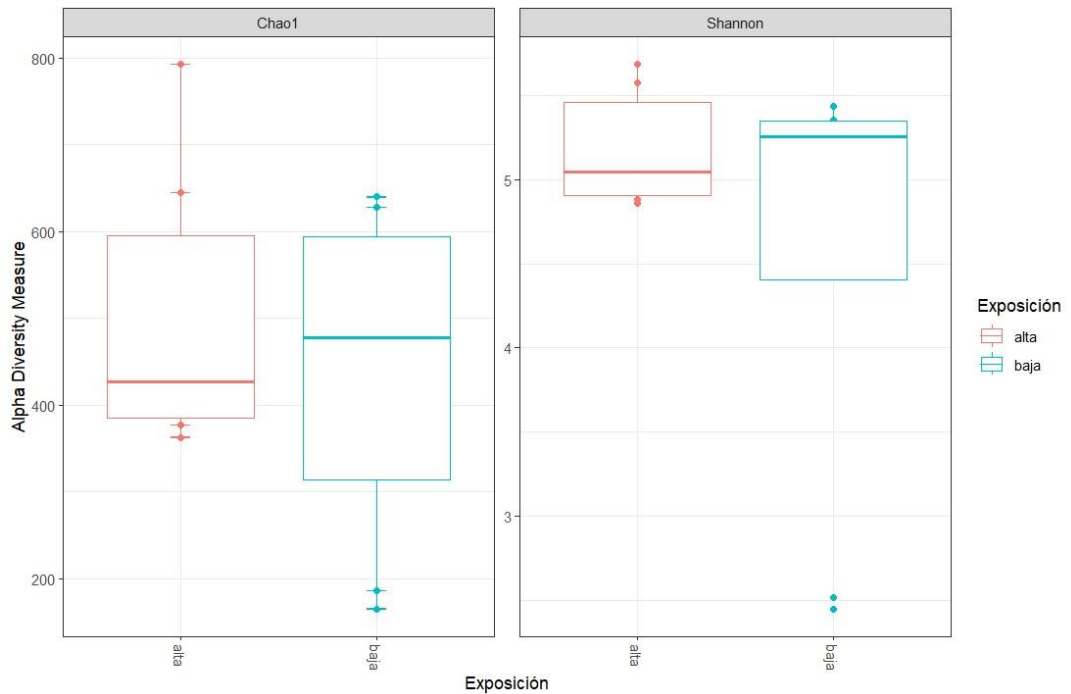


Fig. 8: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para la exposición alta y baja al oleaje. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana.

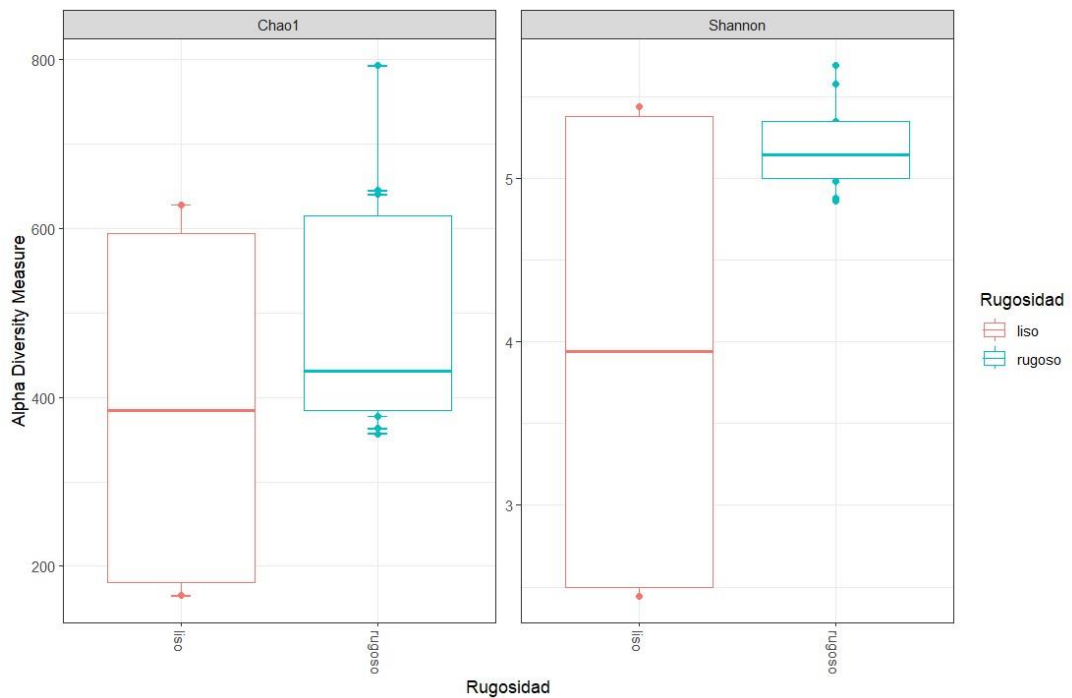


Fig. 9: Boxplot de la diversidad alfa según las métricas de Shannon y Chao1 para el sustrato liso y rugoso. Los extremos de la caja presentan el primer y tercer cuartil de los datos y la línea central representa la mediana.

Al no cumplir con los supuestos de normalidad en la distribución de los datos, confirmado con una prueba de Shapiro, se procedió a comprobar diferencias mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis con los índices Shannon de cada factor. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en la diversidad alfa para la exposición al oleaje ( $p\text{-value} = 0,89$ ) y para la rugosidad del sustrato ( $p\text{-value} = 0,57$ ). También se realizó el test Mann-Whitney, el cual compara las medias de los datos no paramétricos con ambos índices (Chao1 y Shannon) para los factores de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato, dando como resultado, con el índice Chao1 para la exposición al oleaje un valor  $p$  de 0,57 y para la rugosidad del sustrato  $p = 0,45$ , de igual manera con el índice Shannon para la exposición al oleaje entregó un valor  $p$  de 0,95 y para la rugosidad del sustrato  $p = 0,64$ , dejando en evidencia que no existían diferencias significativas en la diversidad alfa para los factores estudiados.

Tabla 3: Valores de los índices Chao1 y Shannon en función a las características de los sitios y sustratos muestreados: exposición (alta y baja) y sustrato (rugoso y liso). Valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.

	<b>Chao1</b>	<b>Shannon</b>
Exposición alta	505,35 $\pm$ 174,35	5,18 $\pm$ 0,37
Exposición baja	439,44 $\pm$ 190,21	4,58 $\pm$ 1,30
Sustrato rugoso	498,56 $\pm$ 149,323	5,20 $\pm$ 0,28
Sustrato liso	390,516 $\pm$ 249,08	3,94 $\pm$ 1,68

### 3.2. Composición de la comunidad microbiana

El análisis de la composición microbiana de las biopelículas se realizó mediante la clasificación taxonómica a nivel de filos, clases y órdenes. Es necesario destacar que algunas muestras no amplificaron, posiblemente por la calidad del ADN, por lo que no se contó con un análisis de composición para los factores probados en todas las localidades y se tuvieron que agrupar las muestras. Por lo tanto, el análisis se centró en la evaluación de la composición taxonómica de los factores de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato de manera independiente a la localidad, con el fin de identificar patrones significativos y determinar posibles relaciones con la composición.

Al analizar los datos a nivel de filo, se identificó un total de 35 filos en las cinco localidades estudiadas siendo Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y Proteobacteria, los más abundantes representando más de un 50% de las secuencias recuperadas según el gráfico de prevalencia (Ver Anexo 2).

En la Figura 10 se puede apreciar la composición taxonómica a nivel de filo de las muestras en las diferentes localidades. Los filos más abundantes fueron Proteobacteria representando un 41,5% del total de las muestras, seguido por Bacteroidetes con un 27,7%, Cyanobacteria 5,7% y por último Actinobacteria con un 3,9%. Se puede observar una similitud en la composición taxonómica de las localidades de Chome y Cocholgüe. Por otro lado, Desembocadura y Merquiche fueron las localidades que presentaron diferencia en su composición, aumentando considerablemente la presencia de Actinobacteria en la primera y de Bacteroidetes en la segunda. En cuanto al filo Cyanobacteria, se observó la mínima proporción en la localidad de Merquiche.

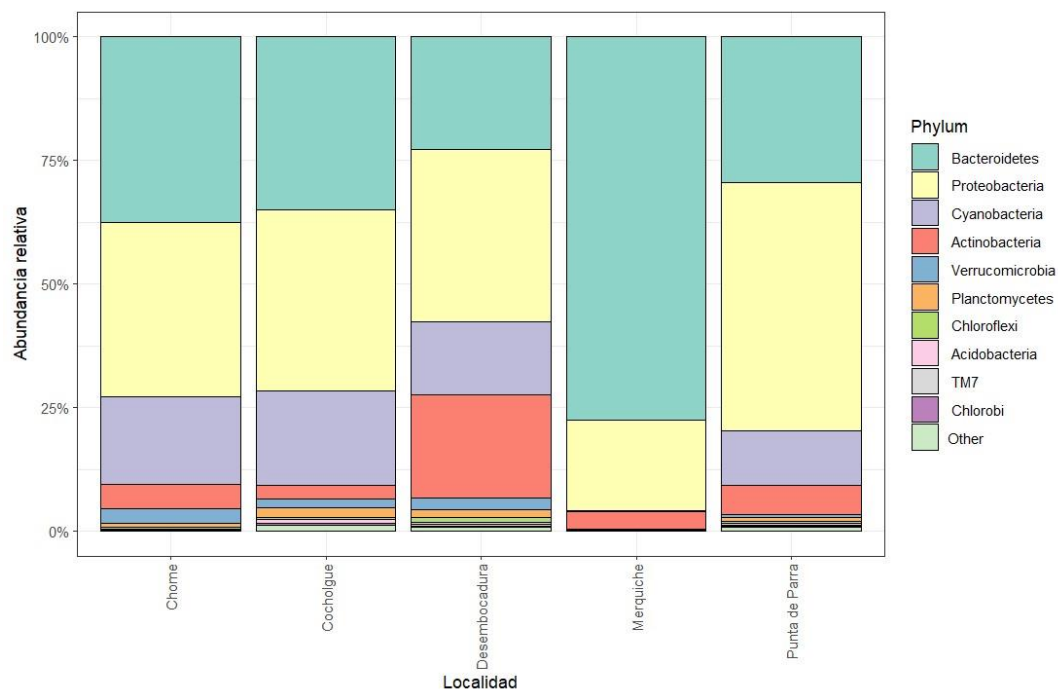


Fig. 10: Abundancia relativa de la composición taxonómica a nivel de filos en las cinco localidades muestreadas

En cuanto al análisis taxonómico de la composición microbiana a nivel de clases, se encontró un total de 88 clases siendo las más representativas Flavobacteriia (Bacteroidetes), Oscillatoriothycideade (Cyanobacteria) y Alphaproteobacteria (Proteobacteria). En las Figuras 11 y 12, se presentaron las 11 clases más representativas en los conjuntos de muestras de los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato. Se observó que aquellas muestras pertenecientes a nivel de exposición alta al oleaje presentaron una mayor similitud en relación con la composición taxonómica en comparación a la exposición baja, en donde se puede apreciar la ausencia de Betaproteobacteria, así como la ausencia de Deltaproteobacteria y una menor proporción de Acidimicrobiia, Nitriliruptoria y Gammaproteobacteria en las muestras de exposición alta (Figura 11). En el caso del tipo de sustrato, se evidenció baja proporción de Cytophagia, Betaproteobacteria y Synechococcophycidae en las muestras de sustrato liso, mientras que las muestras del sustrato rugoso exhibieron una baja proporción de las clases Rubrobacteria y Nitriliruptoria (Figura 12).

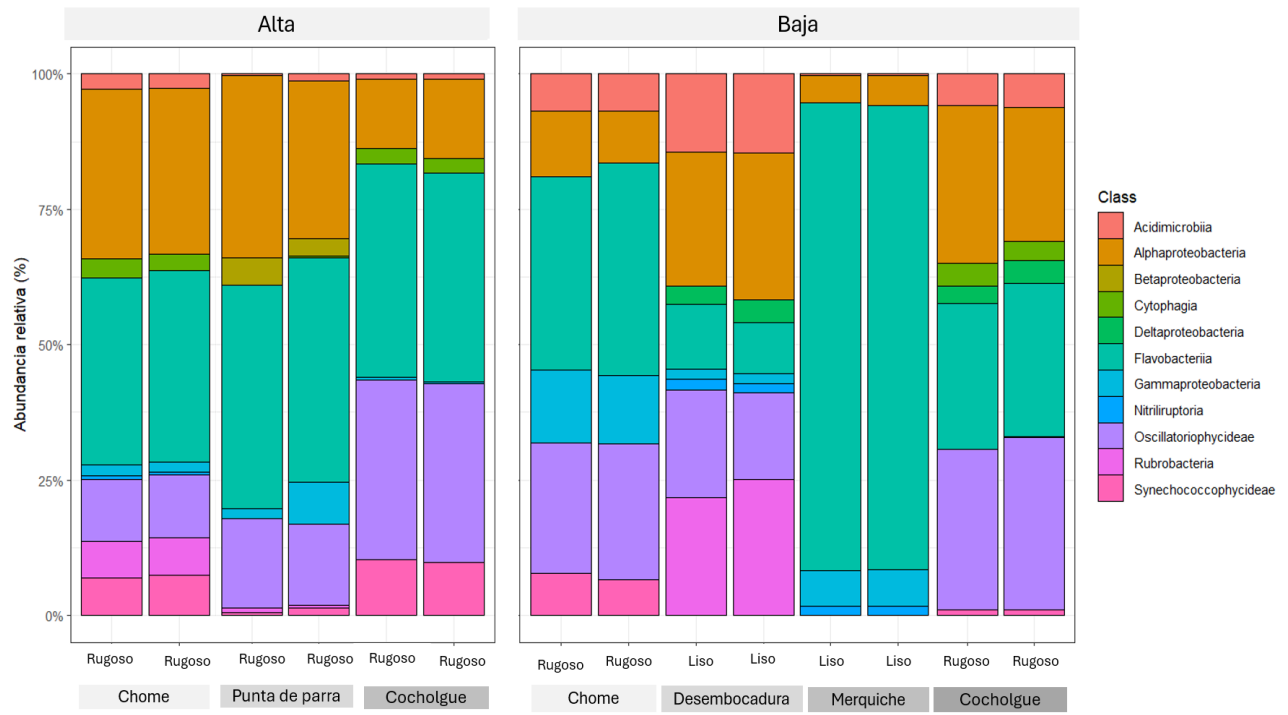


Fig. 11: Composición taxonómica a nivel de clases en las muestras por el nivel de exposición al oleaje

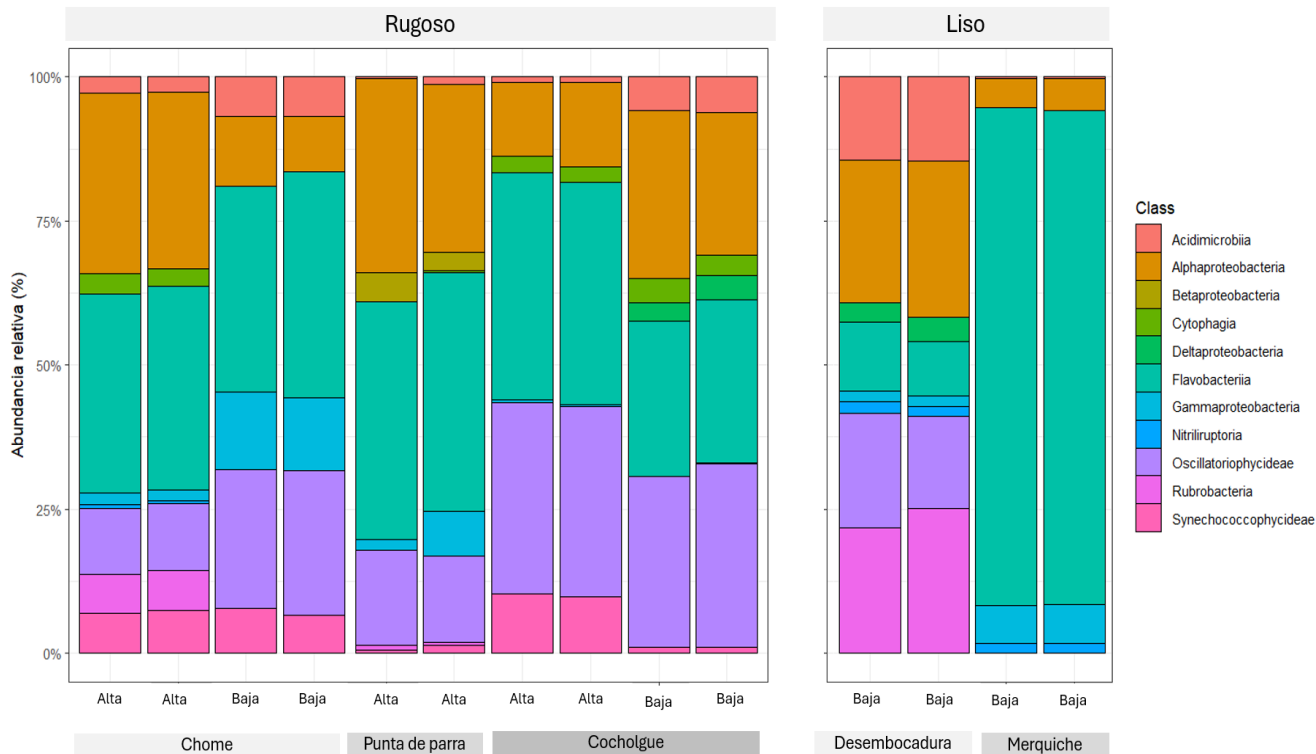


Fig. 12: Composición taxonómica a nivel de clases en las muestras por el nivel de rugosidad del sustrato.

La composición taxonómica a nivel de órdenes reveló la presencia de un total de 117 órdenes. En las Figuras 13 y 14 se presentaron los 17 órdenes más abundantes en los conjuntos de muestras de los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato respectivamente, siendo los órdenes más representativos Flavobacteriales (Bacteroidetes) y Chroococcales (Cyanobacteria) en ambos conjuntos de muestras de los distintos factores. En la Figura 13, se representó al conjunto de muestras con diferentes niveles de exposición al oleaje (alta y baja), en donde se especifica también la rugosidad del sustrato (eje x) que representan y su respectiva localidad. Se destacó una tendencia hacia la uniformidad en la composición taxonómica. En las muestras expuestas a un oleaje bajo, se observa una mayor variabilidad en la composición taxonómica. Se pudo observar la ausencia del orden Chromatiales y Desulfobacterales en los conjuntos de muestras del nivel de exposición alta al oleaje. En cuanto a los conjuntos de muestras del

nivel de exposición baja, se evidenció una baja proporción de los órdenes Burkholderiales, y Cytophagales.

En la Figura 14, se muestra la distribución taxonómica entre los conjuntos de muestras de los niveles de rugosidad del sustrato (rugoso y liso), especificando su nivel de exposición al oleaje en el eje x (alta y baja) y su respectiva localidad. El sustrato rugoso se destacó una mayor proporción de los órdenes Alteromonadales, Chroococcales y Rhodobacterales en comparación con aquellas del sustrato liso.

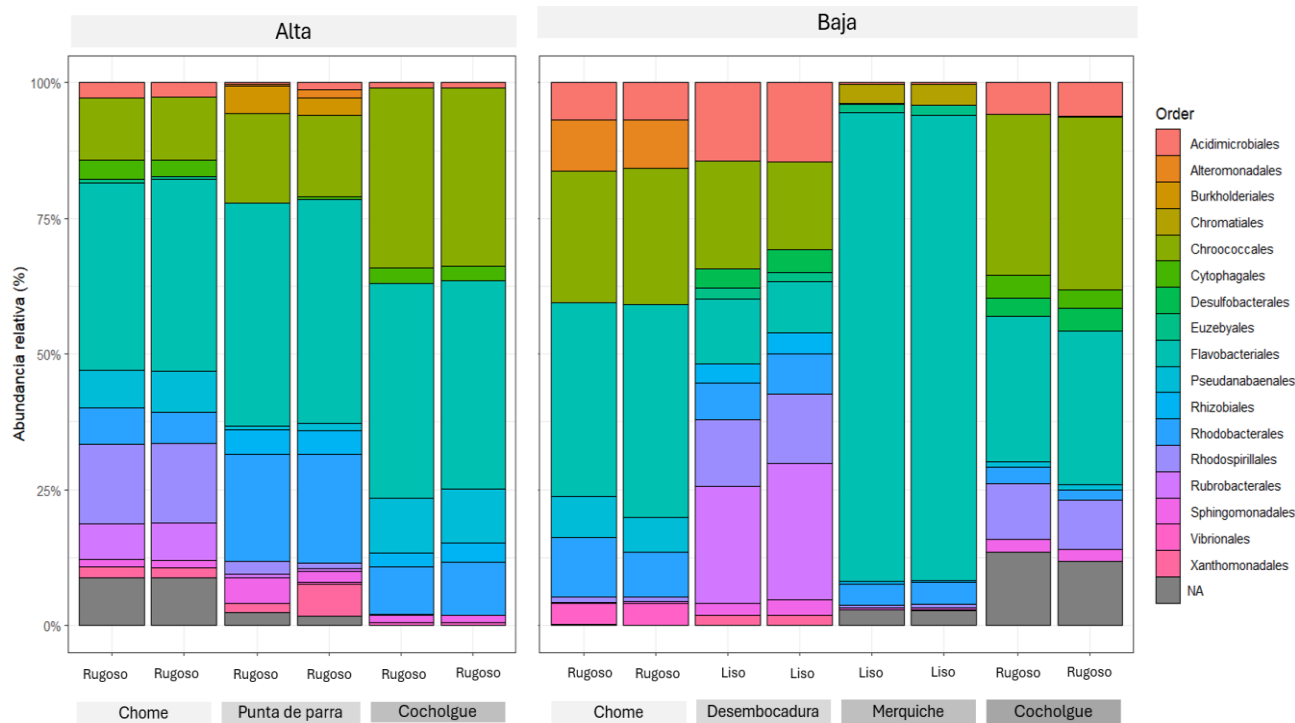


Fig. 13: Composición taxonómica a nivel de órdenes en las muestras por el nivel de exposición al oleaje.

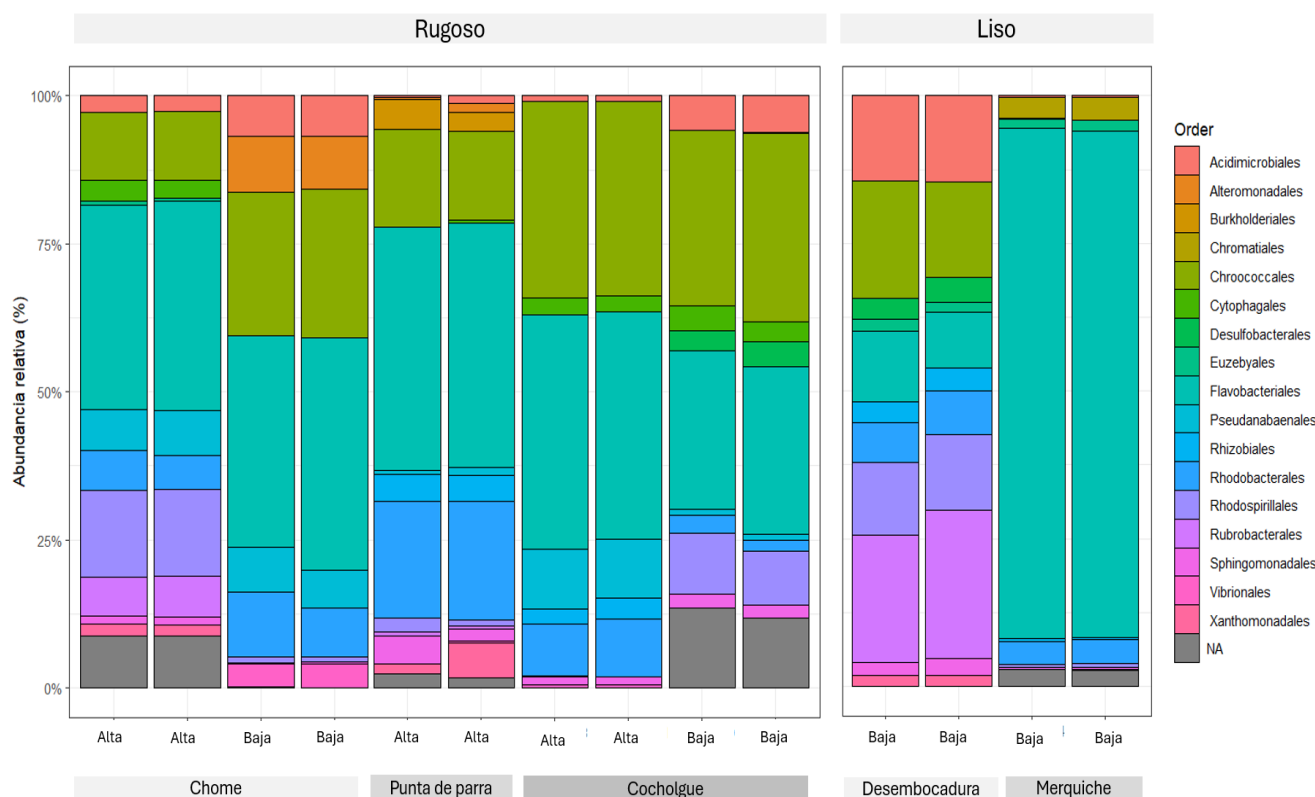


Fig. 14: Composición taxonómica a nivel de órdenes en las muestras por el nivel de rugosidad del sustrato.

Los resultados del análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS), una técnica para resumir información de datos multidimensionales en una representación bidimensional, se basan en la matriz de distancia de Bray-Curtis. Este enfoque se centra en datos de ocurrencia (abundancia) a nivel de los ASVs de los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato. El NMDS alcanzó una solución convergente alrededor de 20 iteraciones y el estrés resultó de 0,15 lo que significó que 2 ejes eran suficientes para visualizar el ordenamiento de los datos. En análisis de NMDS considerando como categorías la exposición al oleaje y el tipo de sustrato (Figura 15 y 16, respectivamente) mostró una superposición entre las comunidades microbianas, lo que sugiere cierta similitud entre ellas, independiente de los factores analizados. Sin embargo, se destaca una mayor diferencia (menor superposición) entre los tipos de sustrato que entre los niveles de exposición.

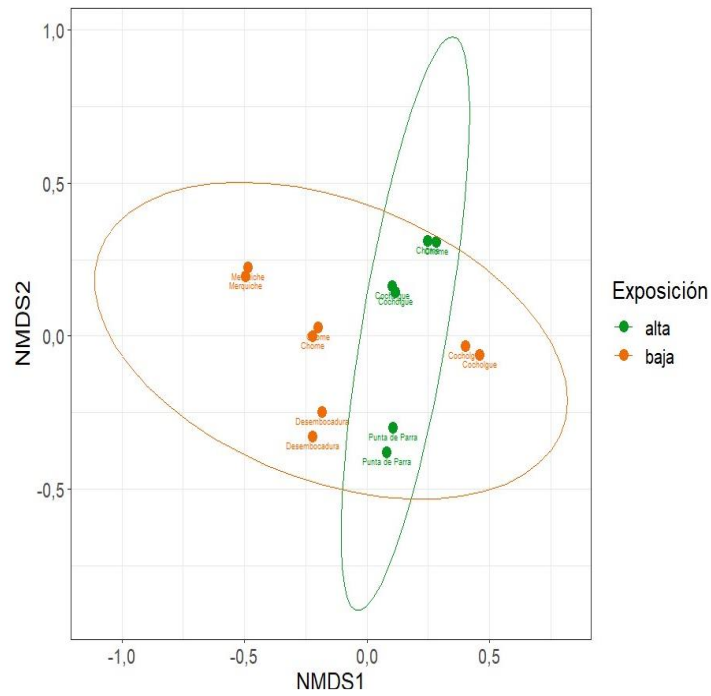


Fig. 15: Ordenación Multidimensional No Métrica (NMDS) basada en el análisis de similitud de Bray-Curtis de las comunidades microbianas con relación a la variable de exposición al oleaje.

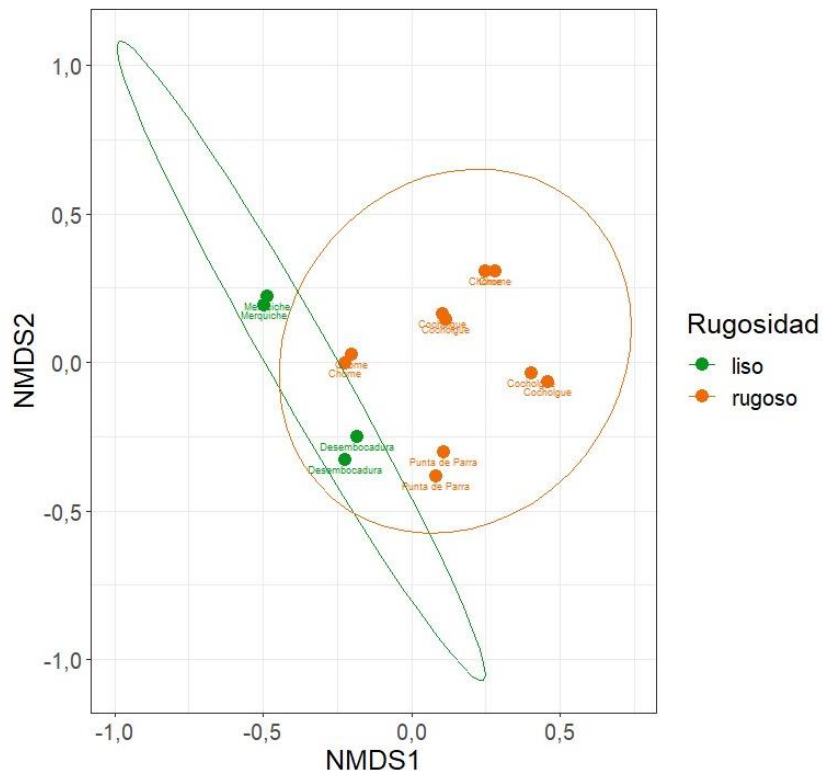


Fig. 16: Ordenación Multidimensional No Métrica (NMDS) basada en el análisis de similitud de Bray-Curtis de las comunidades microbianas con relación a la variable de la rugosidad del sustrato.

Para probar si las comunidades microbianas difieren según la exposición al oleaje y la rugosidad del sustrato se utilizó el análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) el cual no asume normalidad y prueba la hipótesis de diversidad beta igual entre grupos.

Tabla 4: PERMANOVA de los factores exposición al oleaje y rugosidad del sustrato.

	<b>Df</b>	<b>SumsOfSqs</b>	<b>R2</b>	<b>F</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
Exposición	1	0,7327	0,13401	1,857	0,023	*
Residual	12	4,7345	0,86599			
Total	13	5,4672	1			
Rugosidad	1	0,9615	0,17587	2,5607	0,004	**
Residual	12	4,5057	0,82413			
Total	13	5,4672	1			

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la prueba PERMANOVA, los cuales revelan que tanto la exposición al oleaje (p-value= 0,023) como la rugosidad del sustrato (p-value = 0,004) ejercen un efecto significativo en la composición de las comunidades microbianas. Sin embargo, se puede observar que las diferencias observadas son más pronunciadas en el caso del tipo de sustrato. Esto sugiere que la variabilidad en la rugosidad del sustrato tiene un impacto más significativo en la composición de las comunidades microbianas en comparación con los niveles de exposición al oleaje.

### 3.3. Abundancia microbiana

La obtención de imágenes microscópicas mediante la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se ha revelado como una técnica esencial en la investigación de comunidades bacterianas en muestras sedimentarias. En este contexto, la Figura 17 muestra una comparación entre dos métodos de tinción, resaltando la importancia de optimizar el protocolo para obtener imágenes nítidas y libres de artefactos (Figura 18).

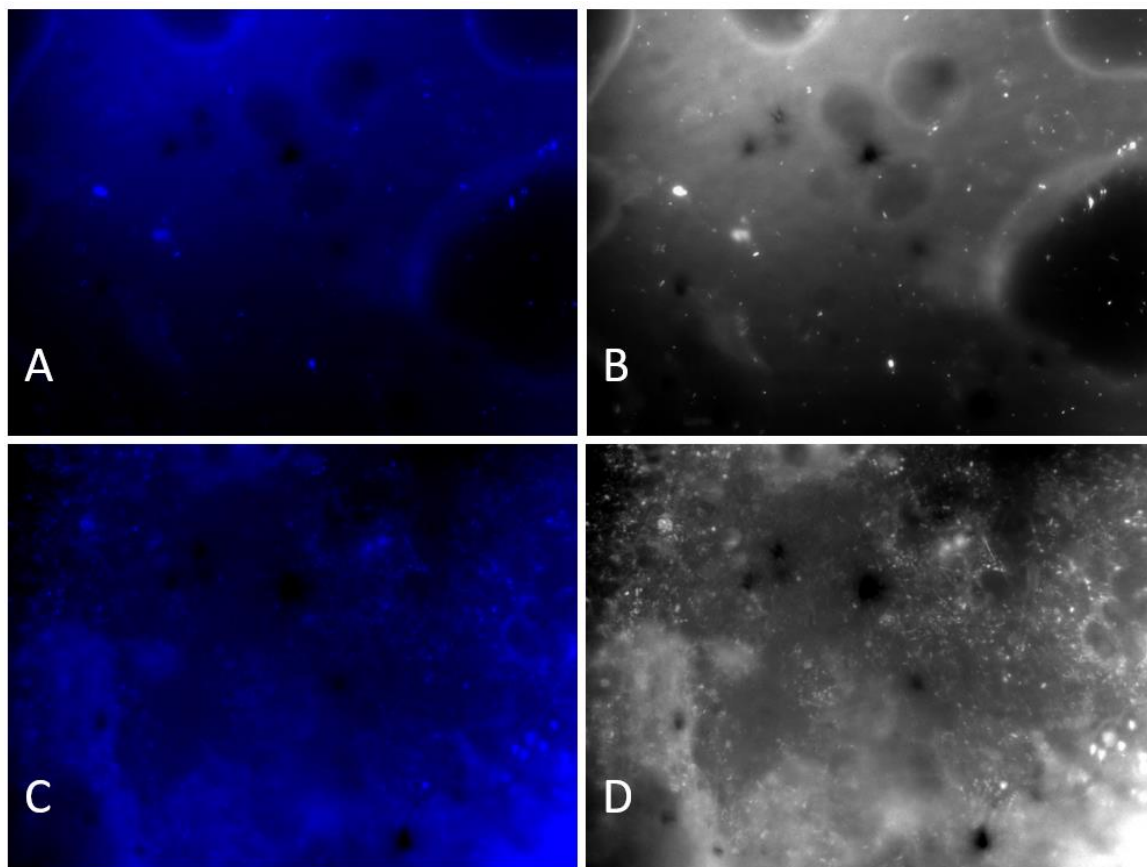


Fig. 17: Fotografías digitales (100x) de bacterias de sustrato rocoso teñidas con DAPI. (A) y (B) misma muestra, sin dilución inicial, con fijador glutaraldehído eliminado y tinción directa a la muestra; (C) y (D) misma muestra, sin lavado de muestra y tinción directa al filtro. Manchas negras corresponde a un exceso de vaselina.

Se llevaron a cabo tinciones con DAPI en dos conjuntos de muestras, variando el momento de la adición de la tinción, la dilución inicial y el lavado del sustrato para así poder estandarizar el protocolo para su óptima ejecución.

En las Figuras 17.A y 17.B, la tinción fue directa a la muestra y no se realizó un lavado del sustrato posterior, lo que resultó en un exceso de fijador y la incapacidad para desprender la mayoría de las bacterias de las biopelículas. Además, este exceso de fijador pudo haber agregado una mayor opacidad en las imágenes. En contraste, en las Figuras 17.C y 17.D, la tinción fue directa al filtro y no se realizó una dilución inicial, lo que pudo haber reflejado un mayor ruido visual en las imágenes reflejando así una saturación de la señal de fluorescencia, lo que dificultó la visualización clara y precisa

de las bacterias presentes en las muestras. En el protocolo final, las muestras se diluyeron en una proporción de 1:20 y se sometieron a cuatro pasos importantes: 1) Dilución inicial, 2) Sonicado, 3) Lavado, y 4) Tinción descritos anteriormente. Con este método se obtuvieron resultados más satisfactorios con células microbianas definidas, lográndose identificar células individuales y filamentos atribuibles a cianobacterias (Figura 18).

En la tabla 5 se presentan los valores de los recuentos celulares obtenidos junto con los promedios y desviación estándar, donde se analizaron un total de 10 muestras de las cinco localidades. Se fotografiaron 20 campos visuales por muestra obteniéndose imágenes como las que se observan en la Figura 18.

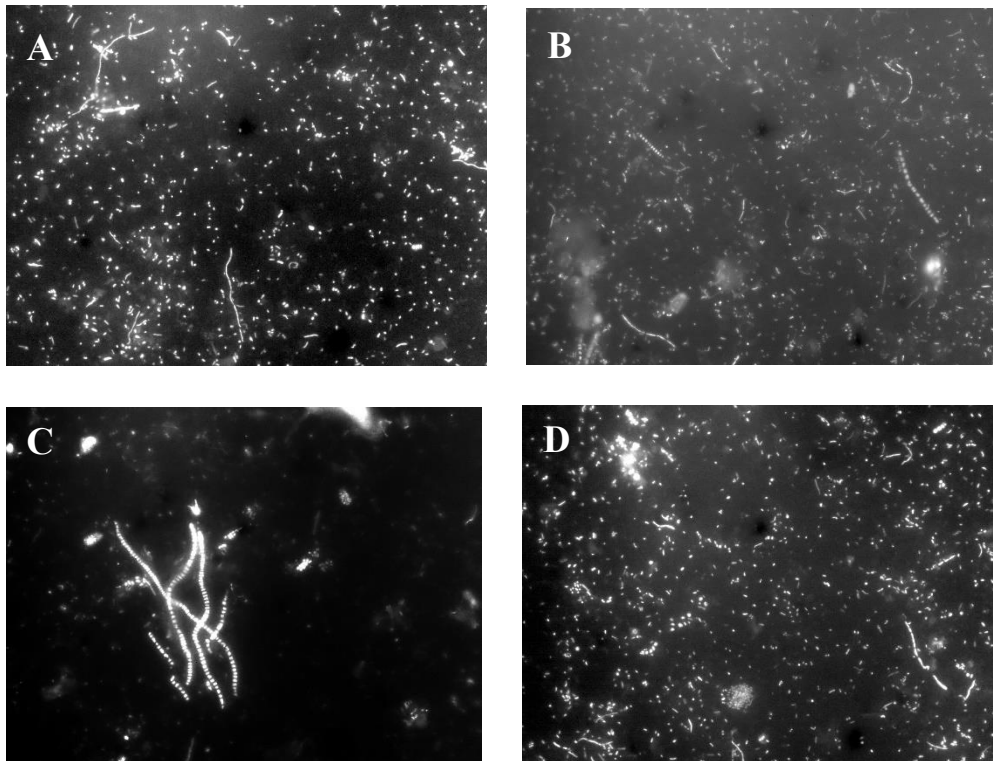


Fig. 18: Registro fotográfico de observaciones microscópicas (100x) con tinción DAPI de microorganismos de las biopelículas.

Tabla 5: Identificación de muestras que fueron analizadas por microscopía con tinción DAPI.

MUESTRA	LOCALIDAD	EXPOSICIÓN	RUGOSIDAD	N° TOTAL DE BACTERIAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
G2	Chome	alta	liso	8373	443,8	133,97
G4	Chome	baja	rugoso	10998	676,25	86,82
G5	Desembocadura	alta	rugoso	10138	610,5	168,34
G6	Desembocadura	baja	liso	9450	345,95	120,93
G13	Merquiche	baja	rugoso	11490	671,3	127,29
G14	Merquiche	alta	liso	6645	263,9	98,72
G15	Punta de parra	baja	rugoso	11145	561,1	159,57
G16	Punta de parra	alta	liso	10266	469,2	183,15
G18	Cochoigue	baja	liso	8133	496,6	69,54
G20	Cochoigue	alta	rugoso	12663	700,5	124,18

Como se observa en la Tabla 5, respaldado por la Figura 19, los recuentos más altos se observaron en la muestra de Cochoigue, con exposición alta y sustrato rugoso, alcanzando un valor de  $700,5 \pm 124,18$  células. Por el contrario, el recuento bacteriano mínimo se encontró en la muestra de Merquiche, con exposición baja y sustrato liso, con un valor de  $263,9 \pm 98,72$  células.

Al comparar los valores mínimos y máximos de los recuentos celulares con los índices de diversidad alfa (Tabla 6), se observa una relación en su variabilidad. Por ejemplo, la muestra con el índice de Shannon más alto (5,6887), que corresponde a Cochoigue, exposición al oleaje alta y sustrato rugoso, también presentó el recuento celular más alto (muestra G20). De manera similar, la muestra con el menor recuento celular (G14) también mostró el menor índice de Shannon (2,4462).

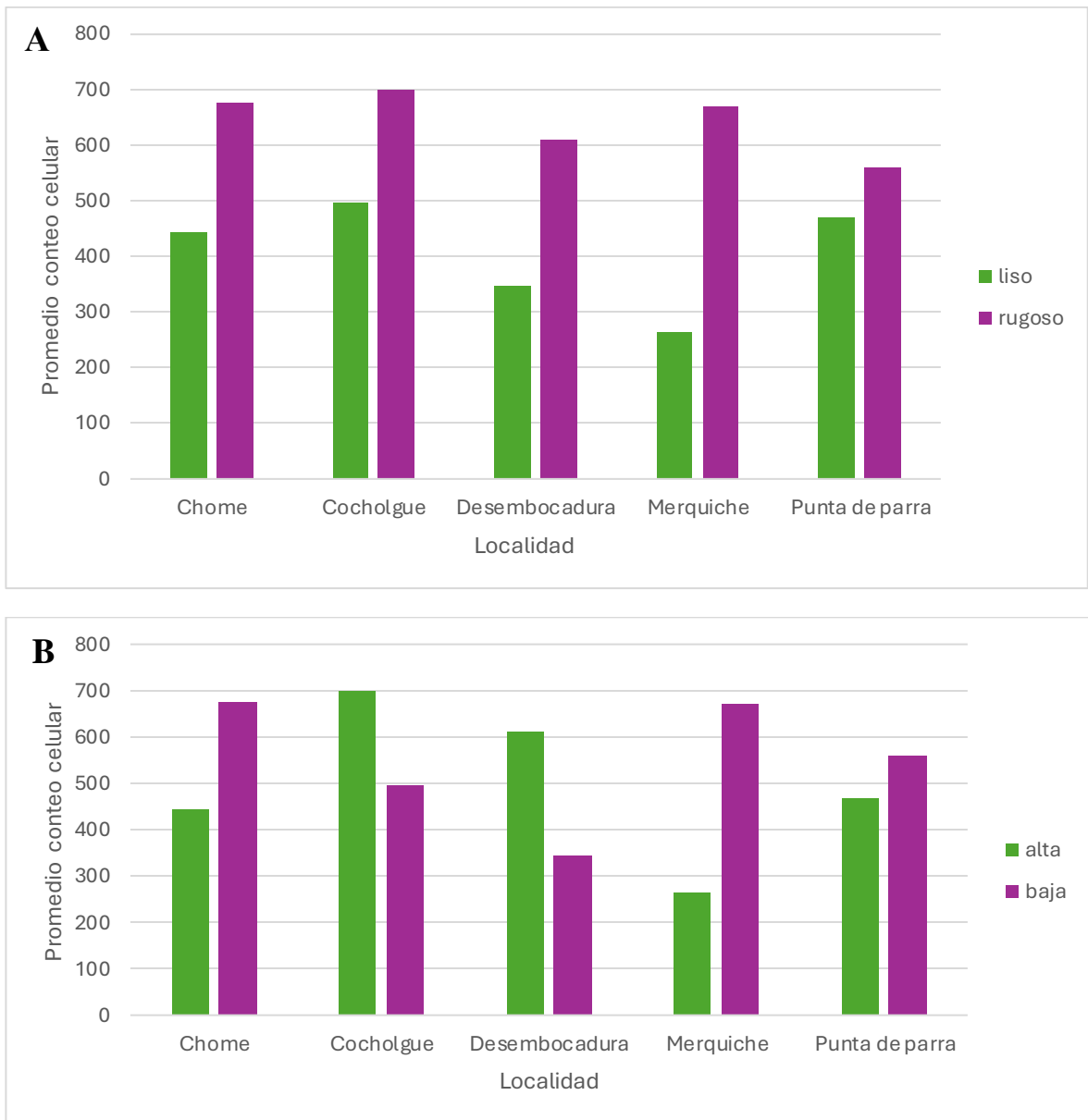


Fig. 19: Valores promedios del total de bacterias visualizadas por microscopia de epifluorescencia de las cinco localidades separadas por los factores estudiados, A) por nivel de rugosidad del sustrato, y B) por nivel de exposición

Se realizó el cálculo del Coeficiente de Correlación de Spearman, una medida específica que cuantifica la intensidad de la relación lineal entre dos variables en un análisis de correlación. En este caso, se evaluó la relación entre los valores promedio de la abundancia y los valores del Índice de Shannon para la diversidad (Tabla 6).

Tabla 6: Valores de Diversidad por el índice Shannon y de Abundancia por el promedio de los conteos celulares.

MUESTRA	LOCALIDAD	EXPOSICIÓN	RUGOSIDAD	PROMEDIO	DIVERSIDAD
G2	Chome	alta	liso	443,8	4,9831
G4	Chome	baja	rugoso	676,25	5,4367
G5	Desembocadura	alta	rugoso	610,5	5,1721
G6	Desembocadura	baja	liso	345,95	2,5173
G13	Merquiche	baja	rugoso	671,3	5,036
G14	Merquiche	alta	liso	263,9	2,4461
G15	Punta de parra	baja	rugoso	561,1	5,3591
G16	Punta de parra	alta	liso	469,2	5,1121
G18	Cocholgue	baja	liso	496,6	4,8604
G20	Cocholgue	alta	rugoso	700,5	5,6887

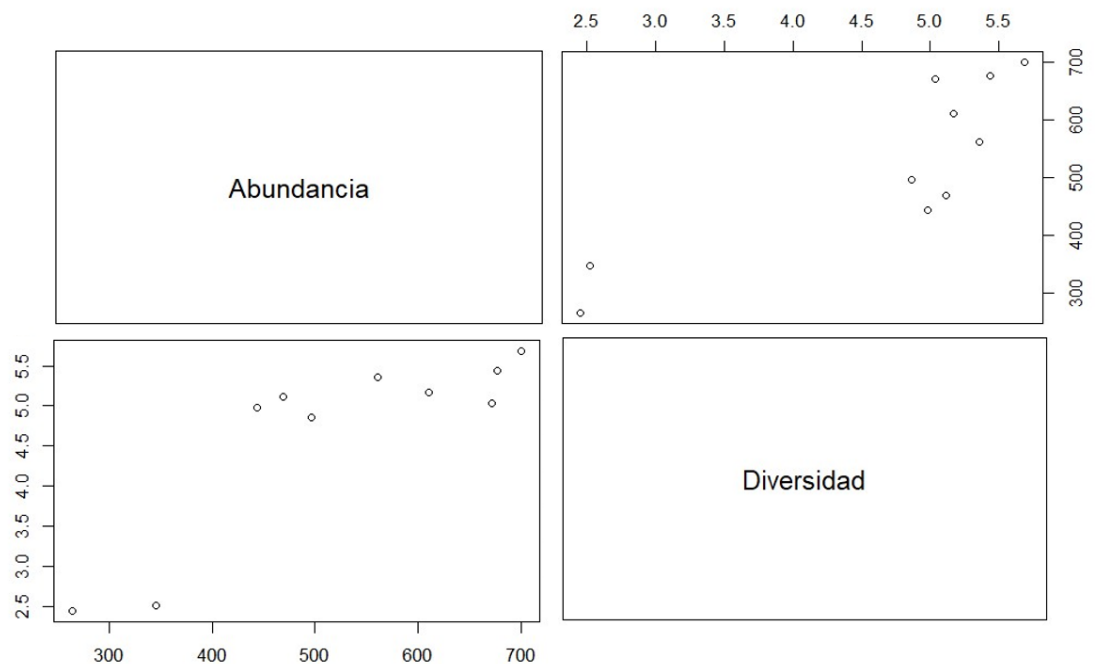


Fig. 20: Gráfico de dispersión de las variables de abundancia y diversidad.

A partir de la Figura 20, la cual muestra la distribución de los puntos de datos en un plano cartesiano, donde cada punto representa una observación individual con valores para dos variables, permite visualizar que los puntos tienden a formar una línea recta hacia arriba indicando una posible tendencia positiva, lo que significa que, al aumentar

el valor de una variable, también aumenta la otra. La suma de los productos es positiva, lo que implica que el coeficiente de correlación  $r$  resulta positivo. Una correlación positiva indica que los incrementos de una variable están relacionados con incrementos en la otra.

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la abundancia y la diversidad. Los resultados mostraron que la variable de diversidad tenía un valor de  $p$  de 0,0009827, lo que indica que no sigue una distribución normal, mientras que la variable de abundancia tenía un valor de 0,5696. Dado que una de las variables no sigue una distribución normal, se optó por utilizar la correlación no paramétrica de Spearman, el cual entregó un valor de correlación  $r_s = 0,86667$  y un valor  $p$  de 0,002681 por lo que se considera estadísticamente significativo representando así una correlación fuerte. Dado que el valor de  $r$  es positivo, indica una relación positiva entre las variables presentando así una correlación fuerte.

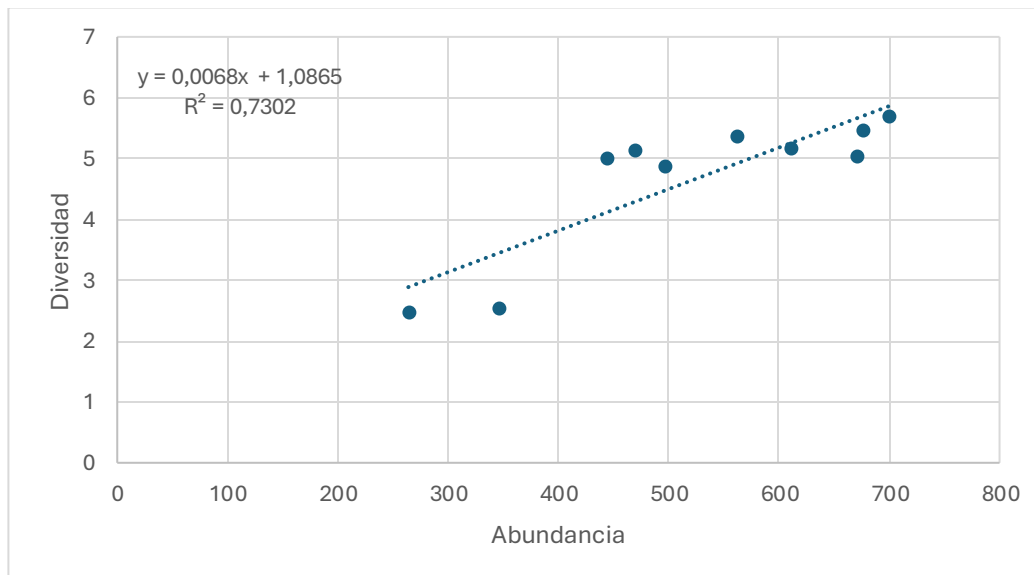


Fig. 21: Gráfico de dispersión lineal de las variables de diversidad y abundancia.

El coeficiente de determinación, el cual es el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, fue de  $r^2 = 0,730236$  o 73,2%. lo que sugiere que aproximadamente el 73,2% de

la variabilidad en la diversidad puede explicarse por la variabilidad en la abundancia. Esto implica que alrededor del 17% de la variabilidad en la abundancia no está relacionada con la diversidad de las muestras.

El gráfico de dispersión (Fig. 21) muestra una relación creciente, con una ecuación de la recta  $y = 0,0068x + 1,0865$  y un  $R^2 = 0,7302$ , en donde se observa que a medida que la abundancia aumenta, la diversidad también lo hace. Por lo tanto, las biopelículas con menor abundancia probablemente presenten menos diversidad en su composición microbiana y al revés.

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la rugosidad del sustrato y la exposición al oleaje pueden influir de manera diferencial en la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas en el intermareal rocoso. La ligera diferencia observada en la diversidad alfa de estas comunidades entre los distintos sustratos, como se evidenció en los boxplots observados en la Figura 6, podría atribuirse a la capacidad del sustrato rugoso para proporcionar nichos microambientales más diversos y heterogéneos que el sustrato liso. Además, la riqueza de especies bacterianas es variable a escala milimétrica y esta variabilidad aumenta en respuesta al aumento en la concentración de materia orgánica particulada en el agua de mar (Long & Azam, 1996). Esto podría permitir que una variedad más amplia de especies microbianas colonice y prospere en ambientes con mayor rugosidad del sustrato.

Por otro lado, los análisis de NMDS también resaltaron una mayor diferencia entre los niveles de rugosidad del sustrato que entre los niveles de exposición al oleaje, lo que sugiere que la variabilidad en la rugosidad del sustrato podría tener un impacto más significativo en la composición de las comunidades microbianas que la exposición al oleaje en sí misma. Este hallazgo apunta a la importancia de considerar las características morfológicas del sustrato como un factor clave en la estructuración de las comunidades microbianas en ambientes intermareales.

A pesar de la expectativa de que los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato desempeñarían un rol fundamental en las estructuras de las comunidades bacterianas en las biopelículas, los resultados sugieren que otros factores, como las diferencias ambientales entre localidades, podrían ser determinantes para estructurar las comunidades microbianas formadoras de biopelículas. Por ejemplo, las localidades Desembocadura y Merquiche presentaron mayores diferencias al resto de las localidades, las que presentaron una composición relativamente homogénea. Una característica común de estas dos localidades es la influencia directa de agua dulce, lo que podrían tener un mayor impacto en la diversidad y riqueza de especies en las biopelículas. Esto se puede observar también que las localidades de Merquiche y

Desembocadura mostraron una mayor diferencia en su composición taxonómica con relación a las otras localidades que mostraron un patrón relativamente más similar. Lo mismo en el análisis del gráfico de NMDS, en donde se obtuvo que, en términos de exposición al oleaje no se demostraron mayores diferencias y para el factor de rugosidad del sustrato hay una tendencia a separarse, pero hay que considerar que la categoría de sustrato liso incluye solo las muestras de Desembocadura y Merquiche, por lo que las diferencias podrían estar también influenciadas por la localidad. Es sabido, que el gradiente salino juega un papel fundamental en la estructura espaciotemporal de las propiedades física, biológicas y biogeoquímicas de los ecosistemas. Tanto los estuarios como la desembocadura de ríos constituyen ecosistemas de transición entre la tierra y el océano, considerándose no solo ambientes transicionales, sino ecosistemas en sí mismos, debido a que poseen ensambles comunitarios únicos y diferentes a los de sus extremos (Cloern et al., 2017). Según lo reportado por Alonso et al., (2010) se han visto diferencias en la dominancia de ciertas clases de microorganismos según la zona del gradiente de salinidad, por ejemplo, Alfaproteobacterias dominan ambientes con mayor salinidad, las Betaproteobacterias en las zonas con menor salinidad (agua dulce) y las Flavobacterias se han observado asociadas a las zonas de máxima turbidez en estuarios. Esto tendría relación con nuestros resultados en donde las Flavobacterias presentaron una mayor abundancia en la localidad de Merquiche en comparación a las otras localidades y las Alfaproteobacterias predominaron en las localidades de Punta de parra, Chome y Cocholgue. De manera similar, estudios previos identificaron marcadas diferencias en la abundancia y la composición de las comunidades bacterianas a lo largo del gradiente de salinidad, encontrándose una mayor diversidad microbiana en la zona media del estuario (zona frontal) (Alonso et al., 2010). No obstante, aunque Merquiche tuvo uno de los valores de abundancia más altos en el recuento total de bacterias (11.490) en la exposición baja y sustrato rugoso, su recuento total de bacterias para la exposición alta y sustrato liso fue considerablemente menor (6.645) siendo este valor el más bajo en comparación con las otras localidades. En contraste, la localidad Desembocadura presentó altos niveles de abundancia, siendo el recuento total de bacterias para la muestra de exposición baja y sustrato rugoso de 10.138 y para exposición baja y sustrato liso de 9.450.

En cuanto a la composición taxonómica, en el estudio descrito por Tan et al. (2015) en donde comparó las comunidades microbianas de biopelículas intermareales entre estructuras artificiales (muros de contención marinos) y hábitats naturales (costas rocosas) dentro del Puerto de Sídney, se obtuvo que todas las clases de Proteobacteria fueron relativamente más abundantes en costas rocosas naturales que en muros de contención marinos. La clase Alphaproteobacteria dominaron las comunidades de biopelículas en este estudio y son frecuentemente destacadas como el grupo primario de colonización de sustratos duros, pero son relativamente menos abundantes en sedimentos blandos (Tan et al., 2015). Al igual que la presente investigación, el filo más abundante fue Proteobacteria con un 41,5% de abundancia total en los conjuntos de datos, en donde la clase Alphaproteobacteria fue una de las más abundantes y diversas presentando una mayor diversidad en las muestras con exposición baja al oleaje y sustrato liso. Las bacterias heterótrofas, como los miembros de Proteobacteria (por ejemplo, Alfa-, Gamma- y Delta-proteobacteria), son extremadamente diversas en términos metabólicos (Tujula et al., 2010) y son cruciales para el ciclo de nutrientes, realizando transformaciones y remineralización de materiales como carbono y nitrógeno orgánico (Azam et al., 1993; Azam, 1998). Se puede apreciar también una alta proporción de los órdenes Rhizobiales y Rhodobacterales en las comunidades pertenecientes a la exposición alta al oleaje, lo que podría estar relacionado a que estos ordenes incluyen miembros fotoautótrofos. Las biopelículas fotoautótrofas se forman por agrupamientos celulares de los principales microorganismos fotótrofos, además pueden unirse microorganismos heterótrofos que obtienen su fuente de energía, carbono y nitrógeno a partir de los productos sintetizados por los fotótrofos, principalmente en el interior de las biopelículas, dado que no necesitan la exposición directa de la luz (Roeselers et al., 2008).

El filo Bacteroidete fue el segundo grupo bacteriano más abundante, al igual que en el trabajo de Narváez-Zapata et al. (2005), donde postula que se ha observado que las bacterias pertenecientes a este filo ocurren en asociación con biopelículas que crecen en una variedad de superficies orgánicas e inorgánicas. Por ejemplo, estas se encuentran en agregados particulados estuarinos (Crump et al., 1999) y conchas de moluscos (Gillan et

al., 1998). Al vivir dentro de biopelículas, los microorganismos están protegidos del estrés ambiental como la desecación y los compuestos tóxicos, una protección que es proporcionada predominantemente por una matriz de exopolímeros que los envuelve (Ortega-Morales et al., 2001; Stoodley et al., 2002) y que sería fundamental para la supervivencia en el intermareal. Por lo tanto, estos datos sugieren la presencia de poblaciones diversas de bacterias productoras de exopolisacáridos que contribuyen significativamente a la estructura de esta comunidad de biopelículas, un hallazgo consistente con el requisito ecológico impuesto por este entorno de alto estrés.

En contraste, la comunidad observada de cianobacterias no resultó ser abundante en comparación con otros filos. Esto podría atribuirse a las características de las cianobacterias, ya que al formar colonias conspicuas con un mayor biovolumen, en cada colonia se esperan observar adheridas a mucilago un mayor número de bacterias heterótrofas (Nervi Faggiani, 2020). El mucilago generado por las cianobacterias podría actuar como fuente de nutrientes para bacterias heterótrofas circundantes y proveer protección mecánica (Berg, 2009). Además, son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera, por lo que lo convierten de manera indirecta en formas accesibles a otros microorganismos de la comunidad (Berg et al., 2009). Se ha descrito que, al aumentar el número de cianobacterias en una colonia, como por ejemplo las biopelículas, aumenta también la biomasa de bacterias circundantes, y esto lleva a un cambio en la comunidad heterótrofa (Shen et al., 2011). Por lo que se podría deducir que las comunidades bacterianas más diversas parecerían tener una abundancia alta de cianobacteria. Lo anterior tiene relación con nuestros resultados, ya que las localidades que presentaron mayor índice de diversidad, Chome y Cochohgüe, presentaron una mayor proporción del filo Cyanobacteria en comparación a las demás localidades. Se encontró una pequeña diferencia en la presencia de cianobacterias siendo esta mayor en las muestras con exposición baja al oleaje y sustrato rugoso. Este fenómeno podría relacionarse con los patrones estacionales en la abundancia de cianobacterias reportados en estudios anteriores (Thompson et al., 2004). Dado que las muestras fueron tomadas en primavera, es posible que la presencia de cianobacterias esté influenciada por el factor estacional puesto que pueden exhibir variaciones estacionales en su abundancia debido a cambios

en las condiciones ambientales, como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la intensidad de la luz solar. En el caso de la ausencia de Chroococcales en Merquiche, las condiciones ambientales podrían no ser adecuadas para el desarrollo de cianobacterias sumado a la influencia de agua dulce que presenta esta localidad y sus características geográficas. Estos resultados se alinean con las observaciones de Thompson (2005), quien enfatizó la importancia de las interacciones físicas y biológicas a lo largo de los gradientes de exposición a las olas, sugiriendo que la abundancia de cianobacterias en el intermareal puede estar regulada por los efectos interactivos de la temporada, la elevación de la marea, aumento de la turbulencia en las costas expuestas a las olas y la extensión de la cobertura del dosel macroalgal (Jenkins et al., 1999; Thompson et al., 2004).

En el contexto específico de este estudio sobre la composición microbiana de las biopelículas del intermareal rocoso, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman para datos que no presentan una distribución normal para evaluar la relación entre la abundancia y la diversidad microbiana. Se encontró una correlación positiva significativa entre la abundancia y la diversidad, como se refleja en un coeficiente de correlación de  $r_s = 0,86667$ . Esto sugiere que, en general, un aumento en la abundancia microbiana se asocia con un aumento en la diversidad. Sin embargo, se requeriría un muestreo más intensivo con una mayor heterogeneidad dentro de cada localidad para llegar a establecer una generalidad al respecto.

## 5. CONCLUSIONES

El modelo observacional planteado en este estudio en el que se comparó la diversidad y abundancia de la comunidad microbiana de biopelículas entre niveles de exposición al oleaje y niveles de rugosidad del sustrato permitió obtener las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la composición taxonómica, el filo predominante fue Proteobacteria, las clases fueron Flavobacteriia y Alphaproteobacteria y el orden fue Flavobacteriales.
- Los resultados sugieren que el factor de rugosidad del sustrato sería un factor más importante en comparación al factor de la exposición al oleaje como causante de variabilidad de la diversidad y la abundancia entre biopelículas del intermareal rocoso.
- Se sugiere que las diferencias en las características propias de las localidades, por ejemplo, la influencia de agua dulce, podrían generar mayor variabilidad en la diversidad microbiana de las biopelículas en comparación con los factores de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato.
- Los conjuntos de muestras pertenecientes a las biopelículas de los niveles de exposición no mostraron diferencias significativas en cuanto a diversidad, sin embargo, mostró el recuento bacteriano más alto, por lo que se acepta parcialmente la hipótesis 1.
- Los conjuntos de muestras pertenecientes a las biopelículas de sustratos rugosos mostraron mayor abundancia y diversidad que aquellos conjuntos pertenecientes a los sustratos lisos, aceptando en su totalidad la hipótesis 2.

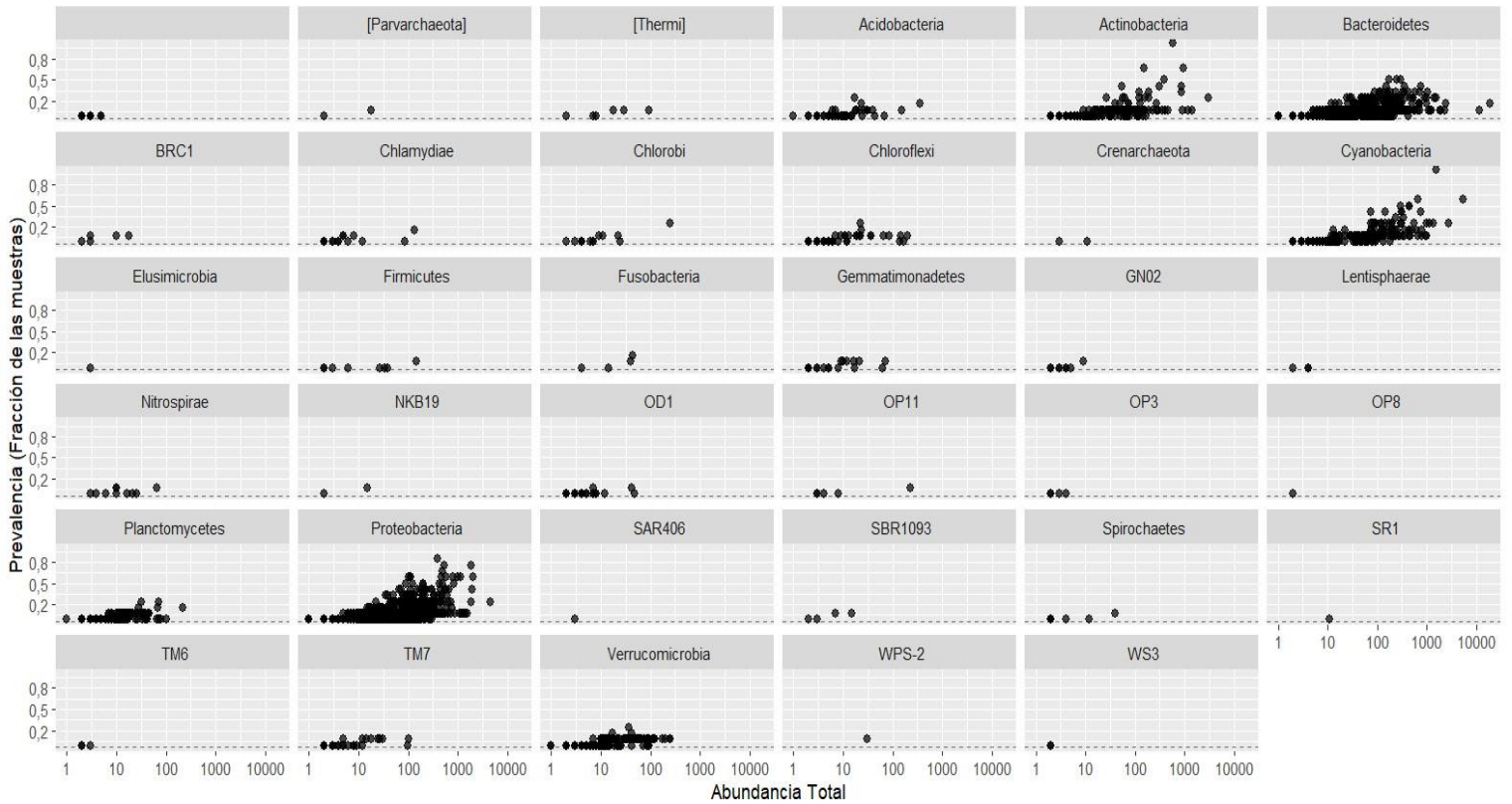
Los resultados de esta investigación proporcionaron una aproximación para comprender la composición microbiana y los cambios en la abundancia de las biopelículas en el intermareal rocoso, lo que tiene importantes implicaciones predictivas en estudios ecológicos y microbiológicos a futuro. Las biopelículas son extremadamente importantes para la colonización de superficies, por lo cual, estudiar las biopelículas del intermareal debe ser objeto de investigaciones posteriores que ayuden a comprender la ocurrencia de los patrones de diversidad y los factores abióticos y bióticos subyacentes.

## ANEXO

Anexo 1. Tabla de valores de índices Chao1 y Shannon de las muestras.

<b>SAMPLE</b>	<b>CHAO1</b>	<b>SHANNON</b>
MUESTRA14	186	2,446195647
MUESTRA16	363	5,11210771
MUESTRA18	793,034091	5,688713137
MUESTRA2	408,056604	4,860432081
MUESTRA20	417,029412	5,03605695
MUESTRA4	357,035714	5,172142162
MUESTRA6	628,015152	5,436700514
REPLICA1	446,015625	4,881467011
REPLICA2	539,123457	5,348059784
REPLICA3	583	5,359169741
REPLICA5	377	4,983148052
REPLICA6	645,014706	5,576290931
REPLICA7	640,283465	5,346411517
REPLICA9	165,047619	2,517315505

Anexo 2. Prevalencia de los ASVs (representado por puntos) identificados en los conjuntos de muestras de los niveles de exposición al oleaje y rugosidad del sustrato, agrupados por filo bacteriano. En el eje x se indica a abundancia y en el eje y su prevalencia (expresado como fracción del total de las muestras) de cada ASV.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, C., Gómez-Pereira, P., Ramette, A., Ortega, L., Fuchs, B. M., & Amann, R. (2010). Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata–South Atlantic Ocean. *Aquatic microbial ecology*, *61*(1), 57-72.
- Azam, F., Smith, D. C., Steward, G. F., & Hagström, Å. (1994). Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial ecology*, *28*, 167-179.
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, *280* (5364), 694-696
- Berg, K. (2009). Heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in recreational and drinking water.
- Boyle, C.D., Readle, A.E. (1983). Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* *46*: 392–399.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, *108*(supplement\_1), 4516-4522.
- Characklis, W. G., & Wilderer, P. A. (Eds.). (1989). *Structure and function of biofilms* (pp. xiii+-385).
- Cloern, J. E., Jassby, A. D., Schraga, T. S., Nejad, E., & Martin, C. (2017). Ecosystem variability along the estuarine salinity gradient: Examples from long-term study of San Francisco Bay. *Limnology and Oceanography*, *62*(S1), S272-S291.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, *238*(1), 86-95.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137-2142

Costerton, J.W., Stewart, P. S. (2001). Battling biofilms. *Sci. Am.* 285:75–81

Crump, B. C., Armbrust, E. V. & Baross, J. A. (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3192–3204

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–98

Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental shelf research*, 20(10-11), 1257-1273.

Epstein, S. S. (1995). Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol.

Faimali M, Garaventa F, Terlizzi A, Chiantore M, CattenaoVietti R (2004). The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement. *J Exp Mar Biol Ecol* 306:37–50

Freeman C, Lock MA. (1995). The biofilm polysaccharide matrix a buffer against changing organic substrate supply. *Limnology and Oceanography* 40: 273–278.

Gillan, D. C., Arjen, G., Speksnijder, C. L., Zwart, G. & de Ridder, C. (1998). Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3464–3472

Harley, C. D., & Helmuth, B. S. (2003). Local-and regional-scale effects of wave exposure, thermal stress, and absolute versus effective shore level on patterns of intertidal zonation. *Limnology and oceanography*, 48(4), 1498-1508. Harlin MM, Lindbergh JM. (1977). Selection of substrata by seaweeds: optimal surface relief. *Mar Biol* 40:33–40.

Hill, A. S., & Hawkins, S. J. (1991). Seasonal and spatial variation of epilithic micro algal distribution and abundance and its ingestion by *Patella vulgata* on a moderately exposed rocky shore. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71(2), 403-423.

Holmström, C., Rittschof, D., and Kjelleberg, S. (1992). Inhibition of settlement by larvae of *Balanus amphitrite* and *Cionaintestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2111–2115.

Hymel, S. N., & Plante, C. J. (1998). Improved method of bacterial enumeration in sandy and deposit-feeder gut sediments using the fluorescent stain 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Marine Ecology Progress Series*, 173, 299-304.

Jenkins, S. R., Hawkins, S. J., & Norton, T. A. (1999). Direct and indirect effects of a macroalgal canopy and limpet grazing in structuring a sheltered inter-tidal community. *Marine Ecology Progress Series*, 188, 81-92.

Lawrence, J. R., Korber, D. R., & Wolfaardt, G. M. (1996). Heterogeneity of natural biofilm communities. *Cells and Materials*, 6(1), 19.

Long, R. A., & Azam, F. (1996). Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 10(3), 213-221.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). Brock Biology of Microorganisms 15<sup>th</sup> edn, 71–74.

Muia, A. W., Bretschko, G., & Herndl, G. J. (2011). An overview of the structure and function of microbial biofilms, with special emphasis on heterotrophic aquatic microbial communities. *African Journal of Aquatic Science*, 36(1), 1-10.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700

Narváez-Zapata, J., Tebbe, C. C., & Ortega-Morales, B. O. (2005). Molecular diversity and biomass of epilithic biofilms from intertidal rocky shores in the Gulf of Mexico. *Biofilms*, 2(2), 93-103.

Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172.

Nervi Faggiani, E. (2020). Análisis de comunidades bacterianas en muestras de agua: puesta a punto de un protocolo in-house de secuenciación masiva de amplicones del gen ribosomal 16S.

Ortega-Morales, B. O., López-Cortés, A., Hernandez-Duque, G., Crassous, P., & Guezennec, J. (2001). Extracellular polymers of microbial communities colonizing ancient limestone monuments. In *Methods in enzymology* (Vol. 336, pp. 331-339). Academic Press.

Porter, K.G., Feig, Y.S., (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25, 943-948

Railkin, A. I. (2003). *Marine biofouling: colonization processes and defenses*. CRC press.

Robles, C., & Desharnais, R. (2002). History and current development of a paradigm of predation in rocky intertidal communities. *Ecology*, 83(6), 1521-1536.

Roeselers, G., Loosdrecht, M. V., & Muyzer, G. (2008). Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of applied phycology*, 20, 227-235.

Santos, R., Callow, M.E., Bott, T.R., (1991). The structure of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in contact with flowing systems. *Biofouling* 4:319–336.

Shen, H., Niu, Y., Xie, P., Tao, M. I. N., & Yang, X. I. (2011). Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, 56(6), 1065-1080.

Smith, S. D., & Simpson, R. D. (2002). Spatial variation in the community structure of intertidal habitats at Macquarie Island (sub-Antarctic). *Antarctic Science*, 14(4), 374-384.

Steffani, C. N., & Branch, G. M. (2003). Spatial comparisons of populations of an indigenous limpet *Scutellastra argenvillei* and an alien mussel *Mytilus galloprovincialis* along a gradient of wave energy. *African Journal of Marine Science*, 25, 195-212.

Stephenson, W. (1961). Experimental studies on the ecology of intertidal environments at Heron Island. II. The effect of substratum. *Aust J Mar Freshw Res* 12:132–188

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, 56(1), 187-209

Tan EL-Y, Mayer-Pinto M, Johnston EL and Dafforn KA (2015) Differences in Intertidal Microbial Assemblages on Urban Structures and Natural Rocky Reef. *Front. Microbiol.* 6:1276. doi: 10.3389/fmicb.2015.01276.

Thomas, J. G., & Nakaishi, L. A. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of the American Dental Association*, 137, S10-S15.

Thompson, R.C., Norton, T.A., Hawkins, S.J., (2004). Physical stress and biological control regulate the producer-consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology* 85:1372–1382

Thompson, R. C., Moschella, P. S., Jenkins, S. R., Norton, T. A., & Hawkins, S. J. (2005). Differences in photosynthetic marine biofilms between sheltered and moderately exposed rocky shores. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 53-63.

Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Burke, C., Thomas, T., Holmström, C., & Kjelleberg, S. (2010). Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine Ulvacean alga. *The ISME journal*, 4(2), 301-311.

Walters, L.J., Wethey, D.S., (1996). Settlement and early postsettlement survival of sessile invertebrates on topographically complex surfaces: the importance of refuge dimensions and adult morphology. *Mar Ecol Prog Ser* 137:161–171.

Watson S.W., Novotsky, T.J, Quinby, H.L., Valois, F.W. (1977). Determination of bacterial numbers and biomass in the marine environment. *Applied Environmental Microbiology* 33, 940-946