

Explorando la comunidad microbiana y el potencial biotecnológico de la esponja *Xestospongia* sp. de una cueva anquialina de la Península de Yucatán

Pablo Suárez-Moo¹, Ninette C García-Martínez¹, Norma A Márquez-Velázquez¹, Mario Figueroa², Eric Allen³, Alejandra Prieto-Davó^{1*}

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historial del artículo:

Recibido 01 de noviembre de 2024

Aceptado 13 de junio de 2024

Publicado 03 de julio de 2024

READ IN ENGLISH:

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3442>

AUTOR DE CORRESPONDENCIA

* E-mail: apdavo@unam.mx

¹ Unidad de Química-Sisal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 97356 Sisal, Yucatán, México.

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.

³ Scripps Institution of Oceanography, University of California, 92093 San Diego, California, Estados Unidos de América.

RESUMEN. Los microorganismos asociados a las esponjas tienen una influencia importante en la biogeoquímica de nutrientes además de ser una fuente importante de productos naturales. Este estudio proporciona una primera mirada a la diversidad taxonómica de la comunidad microbiana asociada con la esponja *Xestospongia* sp., la cual fue recolectada en una cueva anquialina en el área costera del acuífero subterráneo de la Península de Yucatán en Xcalak, Quintana Roo, México, y muestra el potencial de la actividad antimicrobiana que puede tener la diversidad bacteriana cultivable. Los amplicones de ARNr 16S mostraron una alta abundancia de los géneros *Sulfurospirillum* y *Desulfovibrio*, lo que sugiere un papel importante de la comunidad microbiana en *Xestospongia* sp. en el ciclo geoquímico del azufre. Los extractos crudos de la cepa *Nocardiopsis dasonvillei* NCA-454 mostraron actividad antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 (SASM) y *S. aureus* ATCC 43300 (SARM) sensibles y resistentes a la meticilina, respectivamente. El estudio de los microbiomas de esponjas pertenecientes al sistema de cuevas anquialinas en la Península de Yucatán puede ayudar a descifrar los ciclos biogeoquímicos de estos ambientes poco estudiados, a la vez que los microorganismos presentes en estas comunidades microbianas representan una fuente inexplorada de metabolitos secundarios con potencial biotecnológico.

Palabras clave: cueva anquialina, esponja, microbioma de esponja, productos naturales, bioactividad microbiana, Península de Yucatán.

INTRODUCCIÓN

La historia geológica de la Península de Yucatán ha creado uno de los ríos subterráneos más grandes del mundo. Con una superficie de aproximadamente 165,000 km² (Bauer-Gottwein et al. 2011), la plataforma de piedra caliza de la península permite que el agua gotee y se acumule bajo tierra, creando interacciones entre el agua y las rocas que resultan en la disolución de rocas carbonatadas, evaporación, precipitación y áreas donde se mezclan agua salada y dulce (Perry et al. 2009). Estas condiciones químicas específicas han propiciado la formación de un sistema de cuevas anquialinas subterráneas inundadas de aproximadamente 330 km de longitud (Calderón-Gutiérrez et al. 2017) que es comparable a las cuevas marinas del Mar Mediterráneo que albergan una alta biodiversidad, incluida la

de esponjas (Gerovasileiou y Voultsiadou 2012). Sin embargo, distintas condiciones ambientales caracterizan el sistema de cuevas anquialinas de la Península de Yucatán, incluyendo limitación de luz, variación de la presión y temperatura, variación de los niveles materia orgánica disuelta y fluctuación de la disponibilidad de oxígeno.

Las condiciones de las cuevas de la Península de Yucatán son tan peculiares que han generado un alto grado de especialización en los organismos que las habitan, dando como resultado un notable endemismo (Calderón-Gutiérrez et al. 2017). De hecho, se ha descrito una variedad de esponjas endémicas, incluidas especies nuevas, para 2 cuevas pertenecientes a este sistema (Gómez y Calderón-Gutiérrez 2020), pero no se ha descrito ninguna en las cuevas del lado continental de la península. Las esponjas son organismos sésiles que pueden

Acceso abierto

En línea ISSN: 2395-9053

Verificado con Similarity Check impulsado por iThenticate

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3442>



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite compartir y adaptar el trabajo, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las figuras, tablas y otros elementos del artículo están incluidos en la licencia CC BY 4.0 del artículo, a menos que se indique lo contrario. Debe solicitar permiso al titular de los derechos de autor para utilizar material no cubierto por esta licencia. El título de la revista está protegido por derechos de autor propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, y el título y el logotipo de la revista no están sujetos a esta licencia.

filtrar de 0.002 a 0.84 cm³·s⁻¹ de agua de mar por 1 cm de tejido (Thakur et al. 2005). El agua filtrada suministra a las esponjas oxígeno, nutrientes y diversas comunidades microbianas que incluyen bacterias y arqueas, que pueden llegar a constituir más del 50% de su biomasa (Hentschel et al. 2003, Radjasa et al. 2011, Schmitt et al. 2012).

Estudios previos han investigado la diversidad de las comunidades microbianas de esponjas marinas con cultivo o sin cultivo. Además, la metabarcodificación de ARNr 16S ha permitido la exploración de la diversidad microbiana en especies de esponjas de diferentes entornos, proporcionando conocimientos y nueva información sobre la importancia de múltiples factores, como las especies hospedadoras, los impulsores ambientales y las distribuciones biogeográficas, en la configuración de la composición y la estructura de las comunidades microbianas de esponjas (Schmitt et al. 2012, Kennedy et al. 2014, Moitinho-Silva et al. 2017, Yang et al. 2019, Busch et al. 2022). Los estudios que utilizan métodos basados en cultivos han demostrado que las cepas aisladas de esponjas exhiben diversas actividades biológicas, incluida la producción de productos naturales con propiedades antimicrobianas (Jayatilake et al. 1996, Su et al. 2014, Santos et al. 2015, Bennur et al. 2016). La importancia de los microorganismos asociados a las esponjas radica en sus contribuciones a las defensas químicas de sus hospedadores contra depredadores, competidores y patógenos (Deshpande y Thakur 2020). Es importante destacar que los microbios simbióticos en las esponjas facilitan el crecimiento del hospedador en nichos que de otro modo serían inalcanzables al reciclar diferentes fuentes de materia orgánica disuelta y hacer que los nutrientes limitantes estén disponibles (Freeman et al. 2020).

Como parte de una exploración en curso de la diversidad microbiana presente en el sistema de cuevas anquialinas de la Península de Yucatán, presentamos la primera descripción de las comunidades microbianas asociadas con una esponja de cueva anquialina no descrita previamente en Xcalak, Quintana Roo, y mostramos el potencial de estos microbios asociados como fuentes de productos naturales bioactivos. Además, el presente estudio representa el primer esfuerzo por caracterizar ecológica y biotecnológicamente una esponja de un ecosistema anquialino, el cual actualmente está experimentando una mayor actividad humana debido a la expansión del turismo y el desarrollo urbano en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras, secuenciación de ARNr 16S e identificación de especies de esponja

Se recolectaron especímenes de esponjas mediante buceo a una profundidad de ~12 m dentro de una cueva anquialina (i.e., la cueva de Xcalak, Cayo Judío) del sumidero del acuífero kárstico subterráneo en la Península de Yucatán en septiembre de 2020 (Fig. 1). Cayo Judío

(18°12'10.7238" N, -87°51'38.5806" W) está ubicado en el estado de Quintana Roo, México, y está rodeado de bosques de manglares y praderas de pastos marinos. La cueva de Xcalak está ubicada en la costa de Cayo Judío y se caracteriza por una afluencia alta de agua de mar (intrusión) y de poca a ninguna de agua dulce durante la estación seca (octubre-abril). La fecha de recolección fue cercana al final de la temporada de lluvias; las altas salinidades en la columna de agua de la cueva confirmaron los bajos aportes de agua dulce. Para la recolección de muestras se emitió un permiso (PPF/DGOPA-062/21) por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) de México.

La zona del espejo de agua (EA) se determinó como la zona menos profunda (1 m de profundidad) en la entrada de la cueva que estaba expuesta a la radiación solar, mientras que la zona de la cueva (12 m de profundidad) se definió como la zona no expuesta a la radiación solar. Se recolectaron muestras de la columna de agua en la zona del EA y de la cueva, mientras que los especímenes de esponjas se recolectaron de la pared de la cueva. Después de recolectar las muestras de agua en bolsas esterilizadas, se determinaron las variables *in situ*, como la temperatura (°C), la salinidad (psu), el oxígeno disuelto (OD, mg·L⁻¹), la conductancia específica (CE, μS·cm⁻¹), la conductancia (C, μS·cm⁻¹), la conductividad eléctrica (mS·cm⁻¹), los sólidos disueltos totales (SDT, mg·L⁻¹), el pH y el N-nitrato (NO₃-N), abordo de un barco con un multiparámetro portátil YSI ProQuatro (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, EE. UU.).

Se recogieron aproximadamente 40 cm³ de tejido de esponja húmedo por triplicado utilizando tubos Falcon de 50 mL (Corning Inc., Nueva York, EE. UU.) y se almacenaron a 4 °C para su transporte al laboratorio. Una vez en tierra, la muestra fue preservada en etanol al 96%, fotografiada bajo un microscopio estereoscópico e identificada siguiendo un enfoque taxonómico tradicional basado en los tejidos y espiculas (Gómez y Calderón-Gutiérrez 2020). El ADN genómico del tejido de la esponja se extrajo por triplicado utilizando un kit ZymoBIOMICS Miniprep D4300 (Zymo Research, Irvine, EE. UU.). Se agrupó el ADN de los triplicados y se analizó su pureza y concentración utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) y se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa. El ADN se almacenó a -20 °C para su procesamiento posterior.

Después de la extracción, el ADN genómico se envió a QB3 Genomics (UC Berkeley, Berkeley, EE. UU.) (RRID:SCR_022170) para la secuenciación de amplicones con la plataforma emparejada MiSeq 2×250 (Illumina, San Diego, EE. UU.). Los cebadores 515F (5' GTGCCAGCM-GCCGCGTAA 3') y 806R (5' GGACTACHVGGGTWCTAAT 3') se utilizaron para amplificar la región V4 del gen ARNr 16S siguiendo el protocolo de Caporaso et al. (2012). Los datos de secuenciación sin procesar para los resultados de la secuenciación del ARNr 16S se depositaron en Sequence

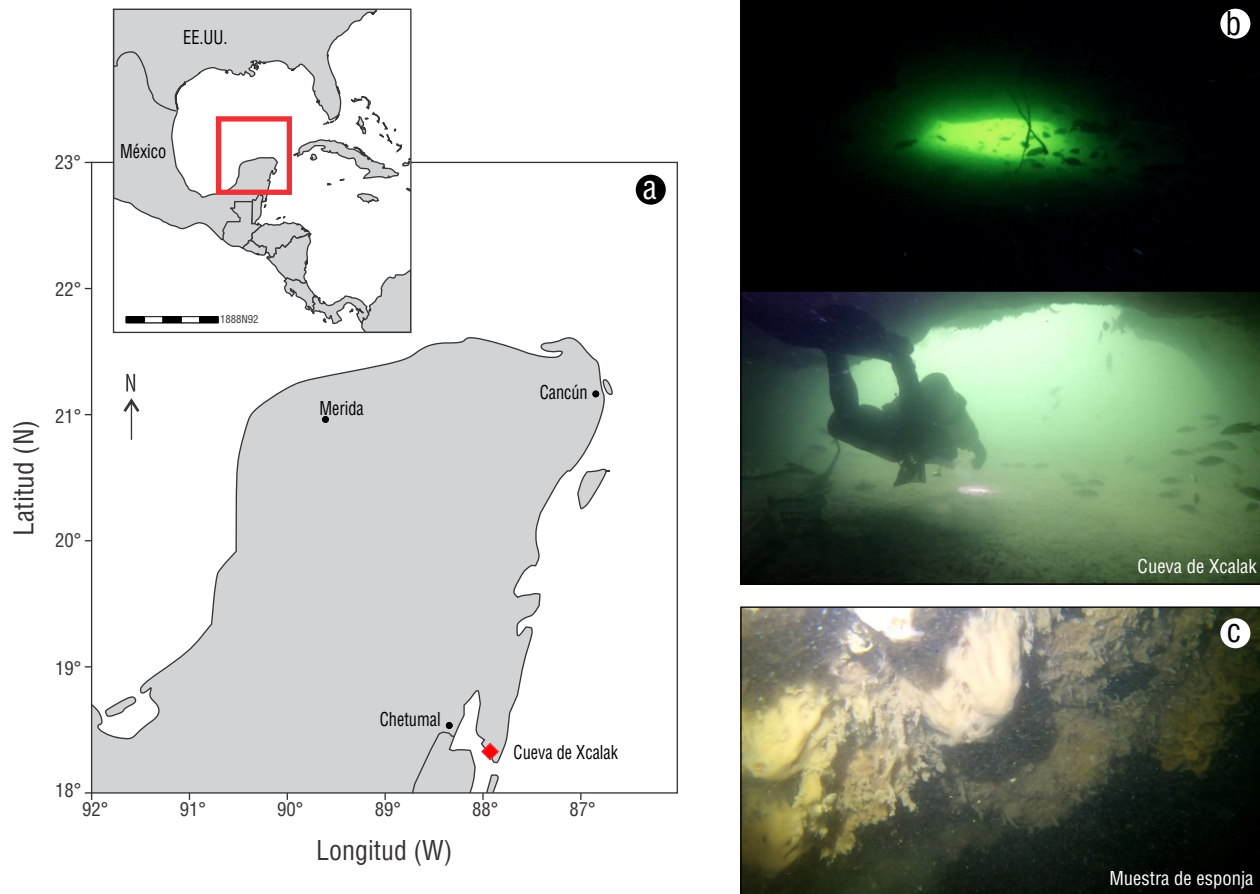


Figura 1. Sitio de estudio (rombo rojo) en la Península de Yucatán (cuadrado rojo en el recuadro) (a), fotografías de la cueva anquialina de Xcalak (b) y fotografía del espécimen de esponja (c).

Read Archive (SRA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) con el número de acceso PRJNA1118309 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1118309>).

En un estudio paralelo del microbioma de la esponja realizado en nuestro laboratorio, se obtuvo el metagenoma de la misma muestra de tejido a partir de los datos de secuenciación generados por Novogene (Davis, EE. UU.) con la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina). Los cóntigos se ensamblaron con Metaspades v. 3.13.0 (Nurk et al. 2017) y se anotaron taxonómicamente mediante la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLASTn) en la base de datos nr del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Los cóntigos que se ensamblaron y asignaron al superreino de Eukaryota se usaron para buscar genes de ARNr (principalmente ARNr 18S) para identificar taxonómicamente la esponja con Barnap v. 0.9 (github.com/tseemann/barnap). Las secuencias de ARNr se alinearon con una versión no redundante de la base de datos SILVA v. 138 con un valor $E < 10^{-5}$ empleado para la asignación taxonómica. Además, utilizamos otro enfoque que implicó alinear los datos metagenómicos de escopeta (que

abarcaban lecturas de procariotas y eucariotas) con una versión no redundante de la base de datos SILVA v. 138 con un valor $E < 10^{-5}$. Las secuencias que coincidían con esta base de datos se consideraron fragmentos potenciales del gen ARNr y se alinearon con los modelos ocultos de Markov (HMM) de Eukarya con SSU-ALIGN v. 0.1.1 (<https://github.com/EddyRivasLab/ssu-align>) para identificar las secuencias verdaderas. Se construyeron gráficos circulares para visualizar la presencia y abundancia relativa de los géneros pertenecientes a Eukaryota y Porifera identificados mediante ambos enfoques (cóntigos y lecturas cortas) utilizando RStudio (R Studio Team 2015). La comunidad microbiana del metagenoma de la esponja aún está bajo análisis y se reportará en otro lugar.

Filtros de calidad y análisis de secuencia

Las lecturas de secuenciación obtenidas de la ejecución de MiSeq se procesaron con Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2 v. 2020.8) (Bolyen et al. 2019). Las secuencias se filtraron por calidad con una puntuación Phred

de Q20 con el algoritmo Deblur. Las variantes de secuencia de amplicones (ASV, por sus siglas en inglés) se asignaron taxonómicamente utilizando el complemento feature-classifier2 implementado en QIIME2 contra la base de datos no redundante SILVA SSU (versión 138). Los ASV no asignados se enviaron a una búsqueda BLASTn en la base de datos NCBI. Se eliminaron los ASV asignados a Eukaryota, cloroplastos y mitocondrias. Se calculó una curva de rarefacción directamente con el comando “diversidad alfa-rarefacción” de QIIME2 (Bolyen et al. 2019).

Los taxones más abundantes (desde el nivel de filo hasta el nivel de género) que pertenecían a bacterias y arqueas se visualizaron con ‘barplot()’ en RStudio (R Studio Team 2015). Se generó un diagrama de árbol de calor de diversidad taxonómica a partir del espécimen de esponja con el paquete R ‘metacodeR’ v. 0.2.145 (Foster et al. 2017). En estos gráficos, el ancho y el color del nodo indican el número de lecturas asignadas a cada taxón (nivel de filo a género).

Aislamiento e identificación molecular de la cepa NCA-454.

La muestra de esponja recolectada se enjuagó con agua de mar estéril, y se cortó 1 g de tejido en pedazos (~1 cm³) y se homogeneizó con un triturador de tejidos. Posteriormente, se realizaron diluciones con agua de peptona (0.1%). Se transfirió una dilución (10⁻⁷) de agua de peptona a placas de agar marino (Difco, Becton Dickinson, San José, EE. UU.) y se mantuvo durante 48 h a 25 °C; se aislaron 13 actinobacterias halotolerantes y halófilas. Posteriormente, las cepas de actinobacterias se cultivaron en el medio líquido A1 (10 g de almidón soluble, 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 18 g de agar y 1 L de agua) y se almacenaron alícuotas de 500 µL como soluciones madre de glicerol (1:1 glicerol:H₂O) a -80 °C. Se utilizaron aproximadamente 2 mL para la extracción de ADN con un kit de aislamiento de ADN genómico (ZymoBIOMICS DNA Mini-prep Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante (Zymo Research). Para identificar las cepas taxonómicamente, el gen ARNr 16S se amplificó mediante PCR con los cebadores 27F (5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’) y 1492R (5’ GGTTACCTTGTTACGACTT 3’) (Weisburg et al. 1991). El producto de la PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa, cuantificado por Nanodrop (1000) y enviado a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, México) para su secuenciación. Se realizó un análisis BLAST mediante una búsqueda BLASTn en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificar las cepas taxonómicamente. Entre todas las cepas bacterianas aisladas, se seleccionó la identificada como *Nocardioopsis dassonvillei* NCA-454 para análisis posteriores y ensayos de actividad, ya que demostró una alta actividad en nuestra prueba exploratoria de inhibición del crecimiento. Además, las cepas de *N. dassonvillei*

se han estudiado previamente por su potencial biotecnológico (ver las revisiones de Bennur et al. 2016 y Bhairamkar et al. 2023). La secuencia de ARNr 16S de la cepa NCA-454 de *N. dassonvillei* se depositó en la biblioteca de datos de GenBank con el número de acceso OR616708.

Preparación del extracto de NCA-454 y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La cepa NCA-454 se cultivó en el medio DSC-ASW (5 g de almidón soluble, 10 g de glucosa, 5 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 32 g de sales de mar y 1 L de agua) a temperatura ambiente durante 10 d para obtener suficiente masa celular para la extracción con solvente con 200 mL de MeOH. Después de la extracción durante 40 min en un matraz, el sobrenadante y el sedimento celular se recuperaron mediante centrifugación (20 min, 6,000 rpm) y decantación. Para la extracción del medio (extracelular), se agregaron 18 g de resina XAD-7 (amberlite) por litro de sobrenadante y se incubaron durante 12 h en un agitador orbital (120 rpm). Posteriormente, se filtró la resina al vacío, seguido de la extracción por maceración con 250 mL de acetato de etilo (LEtOAc) y después con 100 mL de metanol (LMeOH); este proceso se realizó con el sedimento y el sobrenadante. Esto dio como resultado 4 extractos diferentes (fracción de extracción/disolvente de extracción) para la cepa NCA-454: extracto SA17 (sobrenadante/EtOAc), extracto SA18 (sobrenadante/MeOH), extracto SA19 (sedimento/EtOAc) y extracto SA20 (sedimento/MeOH).

Se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (SARM) resistente a la meticilina y *S. aureus* ATCC 25913 (SASM) sensible a la meticilina en un ensayo interno de susceptibilidad antimicrobiana para probar la bioactividad de los extractos obtenidos de NCA-454. Se usó una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para calcular la inhibición del crecimiento (%). Se probaron 2 concentraciones de cada extracto crudo de NCA-454 (SA17, SM18, PA19 y PM20) (200 mg·mL⁻¹ y 20 mg·mL⁻¹), y se utilizó un control antibiótico (vancomicina para SASM y ampicilina para SARM). Las absorbancias altas indican una inhibición baja de patógenos, ya que los patógenos en crecimiento transforman el MTT en tinte de formazán. Adicionalmente, se utilizaron controles para la absorbancia de medios y disolventes. La absorbancia se determinó en un lector de absorbancia de microplacas iMarkTM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.) a 490 y 608 nm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

Inhibición (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{absorbancia de la muestra} - \text{absorbancia del blanco}}{\text{ADMSO} - \text{absorbancia del blanco}}\right) \times 100 \quad ,$$

(1)

donde la absorbancia del blanco corresponde a la del medio, y ADMSO es el valor de la absorbancia para el solvente (DMSO).

RESULTADOS

Propiedades físicas y químicas del agua

Las zonas del EA y la cueva exhibieron alta salinidad (34.5 ppt para ambas), temperatura constante (31 °C) y valores similares de SDT (34.13 a 34.5 mg·L⁻¹), CE (52,545 a 53,178 μS·cm⁻¹), C (58,157 a 60,755 μS·cm⁻¹) y pH (8.02 a 8.22) (Tabla 1). Se observó un aumento de 4.3 a 6.34 en NO₃ y una disminución de 4.24 a 3.77 mg·L⁻¹ en el OD desde la zona del EA hasta la zona de la cueva.

Identificación taxonómica del ejemplar de esponja

El análisis de la morfología indicó que el organismo era una esponja del orden Haplosclerida. Utilizando claves de identificación estándar basadas en el análisis de espículas, *Haliclona* y *Xestospongia* surgieron como géneros candidatos para el espécimen de esponja en este estudio.

En la búsqueda del gen ARNr 18S dentro de los cóntigos ensamblados a partir de los datos metagenómicos, se identificaron 5 secuencias de ARNr 18S y se asignaron cada una a los géneros *Solemya* (Bivalvia, longitud = 1,825 pb), *Rubifabriciola* (Annelida, longitud = 503), *Syllis* (Annelida, longitud = 1,066), *Diadumene* (Cnidaria, longitud = 879 pb) y *Xestospongia* (Porifera, longitud = 2,004 pb) (Fig. 2a). Entre los cóntigos asignados al genoma mitocondrial completo, el género *Xestospongia* exhibió la mayor cobertura (Tabla S1). Un enfoque diferente para analizar las secuencias de ARNr 18S del filo Porifera con lecturas cortas indicó que el género *Xestospongia* representó el mayor número de secuencias (92%) (Fig. 2b), mientras que una pequeña proporción de secuencias se asignó al género *Haliclona* (2.8%). Por tanto,

la especie de esponja utilizada en este estudio fue identificada como *Xestospongia* sp.; identificar la esponja a nivel de especie no fue factible debido a las limitaciones metodológicas.

Comunidad microbiana de la esponja

Se obtuvo un total de 23,222 secuencias filtradas de alta calidad que representan 160 ASV. Una curva de rarefacción de los ASV observados mostró que la curva alcanzó la saturación, lo que indica un muestreo adecuado de las secuencias de ARNr 16S (Fig. S1). Los 160 ASV fueron asignados a diferentes niveles taxonómicos: 8 filos, 11 clases, 23 órdenes, 21 familias y 18 géneros bacterianos. Adicionalmente, un pequeño número de ASV se identificaron como Archaea (10 ASV).

Los filos más abundantes (abundancia relativa) fueron Pseudomonadota (68%), Campylobacterota (5.2%), Bacteroidota (5.1%) y Desulfobacterota (2.1%) (Fig. 3 y Fig. S2). A nivel de clase, Gammaproteobacteria (41.6%), Alphaproteobacteria (27.0%) y Campylobacteria (5.2%) fueron los más dominantes (Fig. 3 y Fig. S2). Rhodobacterales (35.0%), Cellvibrionales (15.0%) y Campylobacterales (6.9%) fueron los órdenes más abundantes. Las 3 familias más abundantes fueron Rhodobacteraceae (36.9%), Halieaceae (15.8%) y *Sulfurospirillaceae* (6.3%) (Fig. 3 y Fig. S2). Los géneros *Sulfurospirillum* (33.6%), *Desulfovibrio* (15.6%), *Ulvibacter* (15.4%), *Pseudomonas* (8.4%) y *Ruegeria* (7.3%) fueron los más dominantes (Fig. 3 y Fig. S2). El único género identificado para Archaea fue *Nitrosopumilus* (Fig. 3 y Fig. S2).

Identificación y bioactividad de la cepa NCA-454

El análisis molecular del gen ARNr 16S reveló que la cepa (NCA-454) que se recuperó de la esponja *Xestospongia* sp. estaba estrechamente relacionada con *N. dassonvillei* (100% de identidad de secuencia, valor E de 0.0) y pertenecía al filo

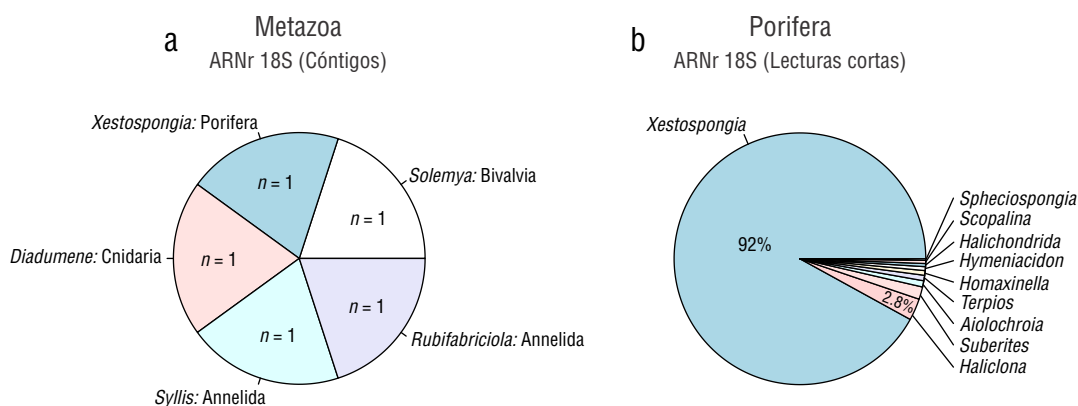


Figura 2. Identificación molecular del género del ejemplar de esponja recolectado en la cueva de Xcalak. Resultados del ARNr 18S obtenidos con los cóntigos (a) y lecturas cortas (b) de los datos metagenómicos.

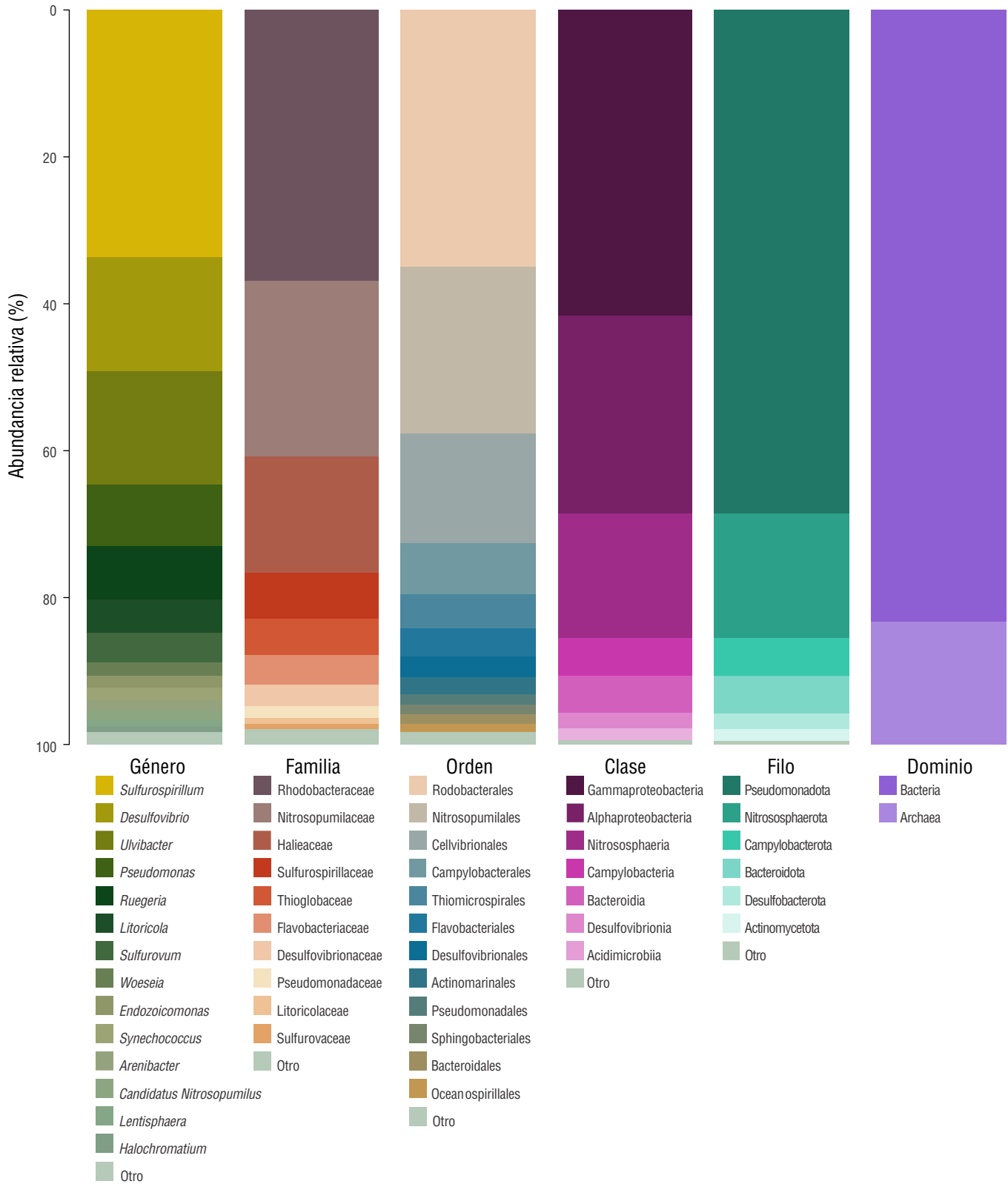


Figura 3. Perfil de la comunidad microbiana de *Xestospongia* sp. Clasificación taxonómica de 160 variantes de secuencia de amplicones (ASV, por sus siglas en inglés). Los taxones que exhibieron abundancias relativas $\leq 0.5\%$ se clasificaron colectivamente como “Otros”.

Actinobacteria. Las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas del ensayo de antibióticos con los extractos crudos fueron $12.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para SARM y $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para SASM (Tabla S2). Los extractos crudos con una concentración de $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ mostraron la mayor inhibición (%) contra SASM (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Diversidad microbiana del microbioma de *Xestospongia* sp.

Por primera vez, describimos la comunidad microbiana asociada con una especie de esponja de *Xestospongia* recolectada en una cueva anquialina en la Península de Yucatán. Se han realizado estudios sobre microbiomas de esponjas con diversas especies de esponjas de mar (Schmitt et al. 2012, Kennedy et al. 2014, Moitinho-Silva et al. 2017, Yang et al. 2019), incluidas algunas esponjas del género *Xestospongia* (Lesser et al. 2016, Thomas et al. 2016, Hayami et al. 2023). Se ha observado una diversidad microbiana similar a nivel de ASV en otras esponjas, como *Xestospongia mutua* (Indraningrat et al. 2022) y *Xestospongia testudinaria* (Hayami et al. 2023), aunque ambos estudios emplearon una mayor cantidad de muestras que este estudio.

Descubrimos que Pseudomonadota, Nitrososphaerota, Campylobacterota, Bacteroidota y Desulfobacterota eran los filos procarióticos dominantes en el microbioma de la muestra de esponja. Algunos de estos filos (Pseudomonadota, Nitrososphaerota y Bacteroidota) se han reportado como microorganismos típicos en los microbiomas de diferentes especies de esponjas marinas (Thomas et al. 2016, Leal et al. 2022), incluidas 4 especies del género *Xestospongia* encontradas en diferentes sitios de recolección (Thomas et al. 2016) y *X. mutua* recolectada en la cuenca del Caribe (Lesser et al. 2016) y del Caribe de Curazao (Indraningrat et al. 2022). Se ha reportado ampliamente que ciertos filos son abundantes y están asociados con esponjas marinas (e.g., cianobacterias) y al mismo tiempo contribuyen al metabolismo de los holobiontes a través de la fotosíntesis. Sin embargo, se observó una baja abundancia de cianobacterias en la muestra de *Xestospongia* sp. de la cueva de Xcalak. Esto podría atribuirse a las condiciones ambientales locales, incluida la falta de luz solar dentro de la zona de la cueva, que puede haber limitado la abundancia relativa de este grupo bacteriano dentro de la esponja (Jahn et al. 2018).

A nivel de género, *Sulfurospirillum* fue el más abundante en la comunidad microbiana de *Xestospongia* sp. de la cueva de Xcalak, seguido por *Desulfovibrio*. El género *Sulfurospirillum* se ha asociado con varios ambientes, incluidos sedimentos y aguas subterráneas ricos en compuestos de azufre (Goris y Gabriele 2016). Se ha reportado que *Desulfovibrio* es el género más dominante en 3 especies de esponjas (*Astrosclera willeyana*, *Dysidea arenaria* y *Arenosclera heroni*) del Mar de China Meridional (Zhang et al. 2015). Al igual que *Sulfurospirillum*, este género se ha descrito como bacterias

reductoras de azufre (BRA) facultativas que utilizan azufre elemental como sustrato para la respiración en ausencia de otros posibles aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfito o sulfato) (Fauque 1994).

Los genes y las vías metabólicas asociados con el ciclo del azufre se han reportado en estudios de la diversidad del microbioma y la capacidad metabólica de las esponjas marinas mediante enfoques metagenómicos (Tian et al. 2016, Lesser et al. 2022). El predominio de las bacterias sulfato reductoras (BSR) en *Xestospongia* sp. sugiere que en la cueva de Xcalak existe un ambiente rico en compuestos de azufre, donde la reducción de sulfatos es el papel predominante de las BSR en el microbioma, que mantienen el ciclo endosimbiótico del azufre (Hoffmann et al. 2005). Además, se han reportado altos niveles de sulfato en cuevas anquialinas costeras en el sistema de cuevas anquialinas de Yucatán (Schmitter-Soto et al. 2002, Suárez-Moo et al. 2022), lo que también respalda el papel de las BSR en los ciclos biogeoquímicos ambientales en estas cuevas costeras.

Se ha reportado que los miembros de las comunidades microbianas asociadas con las esponjas marinas exhiben diversas propiedades biológicas, incluida la actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antifúngica o antiviral (Brinkmann et al. 2017). Actualmente, se han descubierto 140 estructuras nuevas, como los sesquiterpenos, policétidos, péptidos y alcaloides, en los microorganismos asociados a las esponjas (Li et al. 2023). En este estudio, el género *Pseudomonas* fue el género más abundante en los datos de metabarcodificación del ARNr 16S. Estudios previos de ensayos de actividad en las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de diferentes especies de esponjas reportaron la presencia de diferentes metabolitos que inhiben el crecimiento de cepas microbianas patógenas (Brinkmann et al. 2017).

El ácido fenazina-1-carboxílico, obtenido de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de la esponja *Isodictya setifera*, inhibió el crecimiento de las cepas patógenas de *S. aureus* (Jayatilake et al. 1996). Santos et al. (2015) reportaron la actividad antimicrobiana en los extractos bacterianos de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* contra la cepa indicadora *S. aureus* ATCC 29213. El péptido cíclico dicetopiperazina se aisló de estos extractos y mostró actividad bactericida contra las cepas de *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Santos et al. 2015). El género *Ruegeria* ocupó el quinto lugar en términos de abundancia de las secuencias del ARNr 16S, y diferentes especies de *Ruegeria* han mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas para humanos como *S. aureus*, *Salmonella enterica* y *Candida glabrata* (Almeida et al. 2023).

El único género identificado en Archaea fue *Nitrosopumilus*. Se ha descrito que este género pertenece al grupo de arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) y se ha encontrado que exhibe funciones metabólicas como el transporte de fósforo y metales del medio ambiente (Suárez-Moo et al. 2024). Se han observado adaptaciones en *Nitrosopumilus* a diversos hábitats de aguas subterráneas, geotérmicos, terrestres y marinos

(Zheng et al. 2024). Además, existen reportes de la presencia de *Nitrosopumilus* en varios hospedadores (Nakagawa et al. 2021), incluidas esponjas (Feng et al. 2016, Haber et al. 2021), y su presencia se asocia con procesos geoquímicos como la nitrificación (Feng et al. 2016) y la protección de las células hospedadoras a la toxicidad del amoníaco. Además, los análisis del exometaboloma de cultivos de la cepa SCM1 del *Nitrosopumilus maritimus* marino mostraron que este AOA tiene la capacidad de biosintetizar cobalamina; la extracción del genoma de esta cepa de AOA detectó genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos como agmatidina y medicagenato (Law et al. 2021), lo que demuestra un alto potencial biotecnológico para este género. Este potencial podría explorarse más a fondo en cepas de esponjas AOA de las cuevas anquialinas de la Península de Yucatán.

Reconocemos las limitaciones de secuenciar parcialmente el gen ARNr 16S en un estudio de microbioma y de utilizar solo una muestra de esponja. No se realizaron pruebas estadísticas en este estudio debido a la falta de muestras replicadas de esponjas en el análisis de metabarcoding porque este espécimen fue el único encontrado en la cueva. Se deben realizar futuras investigaciones con más muestras de esponjas y se deben explorar factores como las especies hospedadoras y las variables ambientales que influyen en la comunidad microbiana. Los primeros conocimientos sobre la diversidad del microbioma de la esponja proporcionados por este estudio respaldarán la generación de nuevas hipótesis sobre el papel de estos microbios en este entorno poco explorado. Futuras investigaciones deberían centrarse en estudiar la comunidad microbiana de la esponja mediante enfoques metagenómicos, incluidas las lecturas de escopeta y largas de PacBio o Nanopore, con un mayor número de muestras. Sin embargo, encontramos solo un individuo de esponja de esta especie en la cueva de Xcalak durante el muestreo (Efraín Chávez y Luis Liévano, com. pers.).

Actividad antibiótica de la cepa *Nocardiopsis dassonvillei* NCA-454

La cepa NCA-454 se aisló utilizando el tejido de esponja como inóculo y su secuencia de ARNr 16S presentó una alta similitud con *N. dassonvillei* (KU306741.1/KF543091.1/MN108027.2/MN371461.1 con una identidad de secuencia del 99%). El género *Nocardiopsis* está compuesto por especies halotolerantes y halófilas, y los miembros de este género se han aislados frecuentemente de áreas con altas concentraciones de sal (Bennur et al. 2016) como la cueva anquialina de Xcalak en Cayo Judío. Los extractos crudos obtenidos de la cepa *N. dassonvillei* NCA-454 inhibieron el crecimiento de SARM y SASM. Se ha observado actividad antimicrobiana contra patógenos resistentes a múltiples fármacos pertenecientes a una bacteria grampositiva y 6 bacterias gramnegativas en el sobrenadante libre de células de varias cepas de *N. dassonvillei* aisladas de diferentes esponjas marinas (Selvin et al. 2009). Otra cepa de *N. dassonvillei* ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Vibrio dolicus*,

Vibrio parahaemolyticus y *Bacillus subtilis* (Su et al. 2014). Los análisis químicos de otros extractos de *Nocardiopsis* han demostrado la producción de metabolitos secundarios, incluidos policétidos, fencinas, alcaloides de quinolina, terfenilos, proteínas, tiopéptidos y aminos (Bennur et al. 2016), todos los cuales podrían ser responsables de la inhibición de los patógenos SARM y SASM por *N. dassonvillei* NCA-454 en este estudio. Además, la secuenciación del genoma completo de la cepa TP-A0876 de *Nocardiopsis* sp. destacó la presencia de 3 policétido sintasas (Komaki et al. 2014), mientras que la extracción del genoma de *Nocardiopsis* sp. RACA4 aislado de un nudibranquio del Mar Rojo mostró una variedad de metabolitos secundarios, específicamente policétidos, terpenos y péptidos no ribosómicos (Elfeky et al. 2023). La bioactividad observada en los extractos crudos de *N. dassonvillei* NCA-454 resalta la importancia de los esfuerzos para descubrir metabolitos secundarios de bacterias cultivables en los microbiomas de esponjas de ambientes diversos y novedosos, como el sistema de cuevas anquialinas en la Península de Yucatán.

CONCLUSIONES

Este estudio representa el primer esfuerzo para caracterizar la diversidad microbiana y el potencial biotecnológico de bacterias aisladas de la esponja *Xestospongia* sp. recolectada en una cueva anquialina en la Península de Yucatán. Nuestro análisis independiente de cultivo identificó varios miembros bacterianos conocidos por su capacidad para producir productos naturales y participar en ciclos biogeoquímicos. Adicionalmente, este estudio destaca la importancia biotecnológica de explorar entornos novedosos en la búsqueda de cepas bacterianas que alberguen productos naturales bioactivos. Las futuras investigaciones deberían centrarse en la función (metagenómica) y los patrones de expresión génica (metatranscriptómica) asociados con la comunidad microbiana de la esponja de cueva anquialina que reportamos aquí.

Traducido al español por Claudia Michel-Villalobos.

Declaraciones

Material suplementario

El material complementario de este trabajo se puede descargar desde: <https://www.cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarias/article/view/3442/420421104>.

Agradecimientos

El Laboratorio Allen del Instituto de Oceanografía Scripps ayudó con la secuenciación del metacódigo de barras. Agradecemos el apoyo del Brady Lab de la Universidad Rockefeller (Nueva York). También agradecemos a Efraín Chávez Solís, Erick Sosa Rodríguez y Luis A. Liévano Beltrán por

su invaluable apoyo mientras navegaban por las increíbles profundidades y longitudes del sistema de cuevas anquialinas.

Fondos

Este trabajo recibió fondos de las siguientes becas: Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) Ciencia Básica (A1-S-10785) para APD, una beca postdoctoral para PSM (CVU 362331), UNAM DGAPA PAPIIT IT202220, una beca de pregrado para NCGM y UNAM DGAPA PAPIIT IN203923 (análisis químicos) para MF.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Contribuciones de autor

Conceptualización: APD, MF, EA; Curación de datos: PSM, NCGM; Análisis de datos: PSM, NCGM; Adquisición de financiación: APD, EA; Metodología: PSM, NCGM, NAMV; Administración de proyectos: NAMV; Recursos: APD; Supervisión: APD, MF; Validación: APD, MF, EA; Visualización: PSM, NCGM; Redacción – borrador original: PSM, APD; Redacción-revisión y edición: PSM, APD.

Disponibilidad de datos

La secuencia de ARNr 16S de la cepa NCA-454 de *Nocardioopsis dassonvillei* se depositó en la biblioteca de datos de GenBank con el número de acceso OR616708.

Los datos de secuenciación sin procesar para el ARNr 16S se depositaron en Sequence Read Archive (SRA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) con los números de acceso PRJNA1118309 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1118309>).

Aprobaciones y permisos éticos para estudios con animales

Este estudio se realizó con la aprobación ética de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) con todos los permisos necesarios [PPF/DGOPA-062/21]; el estudio cumplió con todas las normas correspondientes para el uso justificado de animales en investigación y su bienestar.

Uso de herramientas de IA

Los autores no utilizaron herramienta de inteligencia artificial en este trabajo.

REFERENCIAS

Almeida JF, Marques M, Oliveira V, Egas C, Mil-Homens D, Viana R, Cleary DFR, Huang YM, Fialho AM, Teixeira MC, et al. 2023.

- Marine sponge and octocoral-associated bacteria show versatile secondary metabolite biosynthesis potential and antimicrobial activities against human pathogens. *Mar Drugs*. 21(1):34. <https://doi.org/10.3390/md21010034>
- Bauer-Gottwein P, Gondwe BRN, Charvet G, Marín LE, Rebolledo-Vieyra M, Merediz-Alonso G. 2011. Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeol J*. 19(3):507-524. <https://doi.org/10.1007/s10040-010-0699-5>
- Bennur T, Ravi Kumar A, Zinjarde SS, Javdekar V. 2016. *Nocardioopsis* species: A potential source of bioactive compounds. *J Appl Microbiol*. 120(1):1-16. <https://doi.org/10.1111/jam.12950>
- Bhairamkar S, Kadam P, Anjulal H, Joshi A, Chaudhari R, Bagul D, Javdekar V, Zinjarde S. 2023. Comprehensive updates on the biological features and metabolic potential of the versatile extremophilic actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei*. *Res Microbiol*. 21(4):104171. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104171>
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, AlGhalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 37:852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brinkmann CM, Marker A, Kurtböke Dİ. 2017. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. *Diversity*. 9(4):40. <https://doi.org/10.3390/d9040040>
- Busch K, Slaby BM, Bach W, Boetius A, Clefsen I, Colaço A, Creemers M, Cristobo J, Federwisch L, Franke A, et al. 2022. Biodiversity, environmental drivers, and sustainability of the global deep-sea sponge microbiome. *Nat Commun*. 13:5160. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32684-4>
- Calderón-Gutiérrez F, Solís-Marín FA, Gómez P, Sánchez C, Hernández-Alcántara P, Álvarez-Noguera F, Yáñez-Mendoza G. 2017. Mexican anchialine fauna — With emphasis in the high biodiversity cave El Aerolito. *Reg Stud Mar Sci*. 9:43-55. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.11.001>
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 6(8):1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Deshpande A, Thakur N. 2020. Chemical ecology driven bioprospecting of marine sponges. In: Kim S (ed.), *Encyclopedia of Marine Biotechnology*. 1st ed: Wiley. p. 681-692. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch25>
- Elfeky HH, Hanora A, Solyman SM. 2023. Bioactivity of bacteria associated with Red Sea nudibranchs and whole genome sequence of *Nocardioopsis dassonvillei* RACA-4. *Mar Genomics*. 67:101004. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2022.101004>
- Fauque GD. 1994. Sulfur reductase from thiophilic sulfate-reducing bacteria. *Methods Enzymol*. 243:353-367. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)43026-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)43026-8)
- Feng G, Sun W, Zhang F, Karthik L, Li Z. 2016. Inhabitancy of active *Nitrosopumilus*-like ammonia-oxidizing archaea and *Nitrospira* nitrite-oxidizing bacteria in the sponge *Theonella swinhoei*. *Sci Rep*. 26(6):24966. <https://doi.org/10.1038/srep24966>
- Foster ZSL, Sharpton TJ, Grunwald NJ. 2017. Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput Biol*. 13(2):e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>

- Freeman CJ, Easson CG, Matterson KO, Thacker RW, Baker DM, Paul VJ. 2020. Microbial symbionts and ecological divergence of Caribbean sponges: A new perspective on an ancient association. *The ISME J.* 14(6):1571-1583. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0625-3>
- Gerovasileiou V, Voultsiadou E. 2012. Marine caves of the Mediterranean Sea: A sponge biodiversity reservoir within a biodiversity hotspot. *PLoS ONE.* 7(7):1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039873>
- Gómez P, Calderón-Gutiérrez F. 2020. Anchialine cave-dwelling sponge fauna (Porifera) from La Quebrada, Mexico, with the description of the first Mexican stygobiont sponges. *Zootaxa.* 4803(1):125-151. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4803.1.7>
- Goris T, Gabriele D. 2016. The Genus *Sulfurospirillum*. In: Adrian L, Löffler FE (eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria*. Berlin (Germany): Springer. p. 1-632. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0>
- Haber M, Burgsdorf I, Handley KM, Rubin-Blum M, Steindler L. 2021. Genomic insights into the lifestyles of Thaumarchaeota inside sponges. *Front Microbiol.* 11:622824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622824>
- Hayami Y, Ambalavanan L, Zainathan SC, Danish-Daniel M, Sharifah NE, Iehata S. 2023. Diversity and functional roles of the symbiotic microbiome associated to marine sponges off Karah Island, Terengganu, Malaysia. *Reg Stud Mar Sci.* 62. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.102967>
- Hentschel U, Fieseler L, Wehrl M, Gernert C, Steinert M, Hacker J, Horn M. 2003. Microbial Diversity of Marine Sponges. In: Müller WEG (ed.), *Sponges (Porifera)*. Volume 37: Springer. p. 59-88. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55519-0_3
- Hoffmann F, Larsen O, Thiel V, Rapp HT, Pape T, Michaelis W, Reitner J. 2005. An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiol J.* 22(1-2):1-10. <https://doi.org/10.1080/01490450590922505>
- Indraningrat AAG, Steinert G, Becking LE, Mueller B, de Goeij JM, Smidt H, Sipkema D. 2022. Sponge holobionts shift their prokaryotic communities and antimicrobial activity from shallow to lower mesophotic depths. *Antonie van Leeuwenhoek.* 115:1265-1283. <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01770-4>
- Jahn M, Vialas V, Karlsen J, Maddalo G, Edfors F, Forsström B, Uhlén M, Käll L, Hudson EP. 2018. Growth of Cyanobacteria is constrained by the abundance of light and carbon assimilation proteins. *Cell Rep.* 25(2):478-486. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.040>
- Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, Grimwade JE, Baker BJ. 1996. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nat Prod.* 59(3):293-296. <https://doi.org/10.1021/np960095b>
- Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Morrissey JP, O'Gara F, Dobson ADW. 2014. Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges. *PLoS ONE.* 9(3):e91092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091092>
- Komaki H, Ichikawa N, Hosoyama A, Fujita N, Igarashi Y. 2014. Draft genome sequence of marine-derived Actinomycete *Nocardioopsis* sp. strain TP-A0876, a producer of polyketide pyrones. *Genome Announc.* 2(4):e00665-14. <https://doi.org/10.1128/genomea.00665-14>
- Law KP, He W, Tao J, Zhang C. 2021. Characterization of the exometabolome of *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 by liquid chromatography-ion mobility mass spectrometry. *Front Microbiol.* 12:658781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658781>
- Leal CV, Avelino-Alves D, Salazar V, Omachi C, Thompson C, Berlinck RGS, Hajdu E, Thompson F. 2022. Sponges present a core prokaryotic community stable across Tropical Western Atlantic. *Sci Total Environ.* 835:155145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155145>
- Lesser MP, Fiore C, Slattery M, Zaneveld J. 2016. Climate change stressors destabilize the microbiome of the Caribbean barrel sponge, *Xestospongia muta*. *J Exp Mar Bio Ecol.* 475:11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.11.004>
- Lesser MP, Pankey MS, Slattery M, Macartney KJ, Gochfeld DJ. 2022. Microbiome diversity and metabolic capacity determines the trophic ecology of the holobiont in Caribbean sponges. *ISME Commun.* 2(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00196-3>
- Li P, Lu H, Zhang Y, Zhang X, Liu L, Wang M, Liu L. 2023. The natural products discovered in marine sponge-associated microorganisms: structures, activities, and mining strategy. *Front Mar Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1191858>
- Moitinho-Silva L, Nielsen S, Amir A, Gonzalez A, Ackermann GL, Cerrano C, Astudillo-García C, Easson C, Sipkema D, Liu F, et al. 2017. The sponge microbiome project. *GigaScience.* 6(10):1-13. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix077>
- Nakagawa T, Koji M, Hosoyama A, Yamazoe Yuki A, Tsuchiya Y, Ueda S, Takahashi R, Stahl DA. 2021. *Nitrosopumilus zosterae* sp. nov, an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of phylum Thaumarchaeota isolated from coastal eelgrass sediments of Japan. *IJSEM.* 71(8):004961. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004961>
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. 2017. MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 27:824-834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
- Perry E, Paytan A, Pedersen B, Velazquez-Oliman G. 2009. Groundwater geochemistry of the Yucatán Peninsula, Mexico: Constraints on stratigraphy and hydrogeology. *J Hydrol.* 367(1-2):27-40. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.12.026>
- R Studio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. Boston (MA): R Studio PBC. <http://www.rstudio.com>.
- Radjasa OK, Vaske YM, Navarro G, Vervoort HC, Tenney K, Linington RG, Crews P. 2011. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associates. *Bioorg Med Chem.* 19(22):6658-6674. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.017>
- Santos OCS, Soares AR, Machado FLS, Romanos MTV, Muricy G, Giambiagi-deMarval M, Laport MS. 2015. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. *Lett Appl Microbiol.* 60(2):140-147. <https://doi.org/10.1111/lam.12347>
- Schmitt S, Tsai P, Bell J, Fromont J, Ilan M, Lindquist N, Perez T, Rodrigo A, Schupp PJ, Vacelet J, et al. 2012. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* 6(3):564-576. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.116>
- Schmitter-Soto JJ, Comín FA, Escobar-Briones E, Herrera-Silveira J, Alcocer J, Suárez-Morales E, Elías-Gutiérrez M, Díaz-Arce V, Marín LE, Steinich B. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatán Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia.* 467:215-228. <https://doi.org/10.1023/A:1014923217206>

- Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal Kiran G, Rajeetha Ravji T, Natarajaseenivasan K, Hema TA. 2009. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83(3):435-445. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1878-y>
- Su P, Wang DX, Ding SX, Zhao J. 2014. Isolation and diversity of natural product biosynthetic genes of cultivable bacteria associated with marine sponge *Mycale* sp. from the coast of Fujian, China. *Can J Microbiol.* 60(4):217-25. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0785>
- Suárez-Moo P, Haro-Moreno JM, Rodríguez-Valera F. 2024. Microdiversity in marine pelagic ammonia-oxidizing archaeal populations. *bioRxiv:590705*. <https://doi.org/10.1101/2024.04.23.590705>
- Suárez-Moo P, Remes-Rodríguez CA, Márquez-Velázquez NA, Falcón LI, García-Maldonado JQ, Prieto-Davó A. 2022. Changes in the sediment microbial community structure of coastal and inland sinkholes of a karst ecosystem from the Yucatán peninsula. *Sci Rep.* 12(1):1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05135-9>
- Thakur NL, Perović-Ottstadt S, Batel R, Korzhev M, Diehl-Seifert B, Müller IM, Müller WEG. 2005. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against gram-positive bacteria: Induction of lysozyme and AdaPTin. *Mar Biol.* 146(2):271-282. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1438-z>
- Thomas T, Moitinho-Silva L, Lurgi M, Björk JR, Easson C, Astudillo-García C, Olson JB, Erwin PM, López-Legentil S, Luter H, et al. 2016. Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nat Commun.* 7:11870. <https://doi.org/10.1038/ncomms11870>
- Tian RM, Sun J, Cai L, Zhang WP, Zhou GW, Qiu JW, Qian PY. 2016. The deep-sea glass sponge *Lophophysema eversa* harbours potential symbionts responsible for the nutrient conversions of carbon, nitrogen and sulfur. *Environ Microbiol.* 18(8):2481-2494. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13161>
- Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173:697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Yang Q, Franco CMM, Zhang W. 2019. Uncovering the hidden marine sponge microbiome by applying a multi-primer approach. *Sci Rep.* 9(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42694-w>
- Zhang D, Sun W, Feng G, Zhang F, Anbuezhian R, Li Z, Jiang Q. 2015. Phylogenetic diversity of sulphate-reducing *Desulfovibrio* associated with three South China Sea sponges. *Lett Appl Microbiol.* 60(5):504-512. <https://doi.org/10.1111/lam.12400>
- Zheng Y, Wang B, Gao P, Yang Y, Xu B, Su X, Ning D, Tao Q, Li Q, Zhao F, et al. 2024. Novel order-level lineage of ammonia-oxidizing archaea. *ISME J.* 18:1-13. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrad002>