



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FENO Y GENOTÍPICA DE
BACTERIAS GRAM (+) AISLADAS DEL
PACÍFICO MEXICANO**

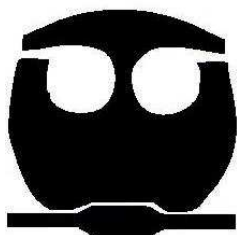
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

DULCE MARÍA FRAGOSO YÁÑEZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** RODOLFO PASTELIN PALACIOS
VOCAL: **Profesor:** ESTRELLA CERVANTES GARCÍA
SECRETARIO: **Profesor:** LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
1er. SUPLENTE: **Profesor:** NORMA TREJO MEDINA
2° SUPLENTE: **Profesor:** MARTHA GILES GÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de
México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Lab. Análisis Químico, Ciudad
Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: Dr. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
(nombre y firma)

SUSTENTANTE: DULCE MARÍA FRAGOSO YÁÑEZ
(nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS

Los proyectos son difíciles pero aun así es indispensable terminar cada uno de ellos. A lo largo de mi vida atravesé por varias etapas para lograr mi formación profesional, y sin el apoyo de varias personas no lo habría logrado. En la preparación de esta tesis recibí aliento y ayuda de muchas personas e instituciones.

En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por haberme otorgado mi formación académica. Al instituto de Ciencias del Mar y Limnología por permitirme el uso de sus instalaciones para este proyecto. Al proyecto CONACyT CO1-46894 por el financiamiento otorgado para la realización de estudios a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, y por haberme otorgado una beca.

A mi tutor de Tesis Dr. Luis A. Maldonado por su valiosa dirección y apoyo a lo largo del proyecto, así como su comprensión, paciencia y oportunidades.

A la Dra. Erika T. Quintana por asesorarme y enfocar mejor mis ideas.

A mis compañeros de laboratorio por su gran apoyo y en algunos casos por brindarme su amistad.

A mis amigos que me apoyaron y animaron en todo momento.

A mi madre y hermanos que me alentaron y estuvieron presentes en los problemas.

A Dios por darme todo lo que tengo.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico:

A mis padres por su comprensión, por su tiempo y sus ánimos.

A mis hermanos cuyo apoyo lo vi en su grande admiración.

A mi sobrina todo el tiempo disfrutando de pequeños momentos.

A mi abuelita por su tiempo y por un segundo hogar.

A mis tíos los cuales me han brindado su apoyo.

A mis amigos, con los que crezco, con los que aprendo, con los que me divierto, no es necesario nombrarlos porque ellos saben muy bien de quienes hablo, pero lo que sí es verdad es que forman una parte muy importante en mi vida.

A mis profesores, que me brindaron su conocimiento, su comprensión y en algunos casos su amistad.

A todos ellos gracias.

PRESENTACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

De la realización de este proyecto se logro lo siguiente:

Póster: *D.M. Fragoso, L.A. Maldonado, E.T. Quintana. "Nuevas especies de estreptomicetos marinos y su caracterización metabólica". XXXVI Congreso Nacional de Microbiología. Ciudad de Morelia, Mich., México. Junio 4 al 7 de 2008.*

Póster: *L.A. Maldonado, D.M. Fragoso, N.A. López, E.T. Quintana. "Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico".12TH International Symposium On Microbial Ecology. Cairns, Australia, Agosto 17 al 22 de 2008.*

Articulo: Maldonado L. A., Fragoso D., Pérez A., Rosellón J., Quintana E. 2008. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*.

ÍNDICE

Datos del jurado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Presentaciones relacionadas con esta tesis	iv
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Importancia de la diversidad microbiana marina	2
2. ANTECEDENTES	
2.1 La biotecnología y su relación con los microbios marinos	5
2.2 Compuestos microbianos del crecimiento celular	7
2.3 Importancia de la feno y genotificación microbiana	10
2.4 La clase <i>Actinobacteria</i>	16
2.5 Planteamiento del problema	25
2.6 Objetivo general	26
2.7 Objetivos particulares	26
2.8 Hipótesis	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Cultivo de fuentes microbianas	28
3.2 Caracterización morfológica macroscópica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos en México	28
3.3 Determinación de isómeros de ácido diaminopimélico	29
3.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	29
3.5 Cultivo de aislados marinos en fuentes de carbono y nitrógeno	31
3.6 Tolerancia de los aislados en agua marina	32
3.7 Sensibilidad a diferentes antibióticos	32
3.8 Extracción de ADN de los aislados marinos	33
3.9 Electroforesis horizontal	34
3.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
3.11 Secuenciamiento del producto de PCR	35
3.12 Análisis y construcción de árboles filogenéticos	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Fuentes microbianas y características morfológicas macroscópicas	37
4.2 Determinación de isómeros de ácido diaminopimélico	41
4.3 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de Carbono	42
4.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de Nitrógeno	49
4.5 Crecimiento en diferentes concentraciones de agua marina	55
4.6 Sensibilidad a diferentes antibióticos	59
4.7 Estudio molecular y construcción de árboles filogenéticos	63
5. CONCLUSIONES	70
6. INNOVACIÓN E IMPACTO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	71
7. RECOMENDACIONES	73
8. REFERENCIAS	74
9. APÉNDICES	79

RESUMEN

Las bacterias son microorganismos cosmopolitas y su diversidad en los mares y océanos juegan un papel fundamental en las cadenas tróficas como colonizadores, degradadores, parásitos y simbioses. La Tierra está constituida por un poco más de 70% de agua, lo que hace a éste ecosistema un interesante modelo de estudio. Establecer la diversidad de bacterias presentes en los océanos, sobre todo de aquellos grupos bacterianos con la capacidad de producir metabolitos de interés comercial como los antibióticos no es algo nuevo, sino un tema que va evolucionando. La clase *Actinobacteria*, bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina incluye diversos grupos taxonómicos con la capacidad innata de producir metabolitos secundarios, así como de morfologías ampliamente diversas y variadas. En el presente proyecto, bacterias de este grupo microbiano (genéricamente denominados "actinomicetos") aislados de muestras de sedimentos marinos del Pacífico Mexicano fueron caracterizados fenotípicamente y genotípicamente para establecer su relación con sus contrapartes terrestres. Pruebas de utilización de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y sensibilidad a antibióticos se incluyeron como parte de la caracterización fenotípica, mientras que para la caracterización genotípica se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen 16S rRNA ribosomal de aislados marinos. La posición taxonómica de los aislados se estableció con base en secuencias del gen 16S rRNA ribosomal por medio de análisis filogenéticos al comparar dichas secuencias con sus contrapartes terrestres.

Palabras clave: Actinomicetos, bacterias marinas, metabolitos secundarios, estudios filogenéticos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA MARINA

Por muchos años se consideró que la tierra y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos. La tierra y el agua dulce varían significativamente en su estructura física y química; en el número y disponibilidad de nutrientes y en la temperatura. La combinación de todos estos factores influye directamente en la biodiversidad afectando el número de organismos presentes en un ecosistema. Los ecosistemas no son estáticos, por el contrario, evolucionan y cambian bajo condiciones determinadas. Por más de 4 mil millones de años de evolución, los microorganismos han sido testigos de un inmenso espectro de fuentes de energía y de condiciones ambientales, adaptándose adecuadamente a ellas (Hunter-Cevera, 1998).

Si se considera que $\frac{3}{4}$ partes de nuestro planeta están cubiertas por agua y que cerca del 70% de ella lo constituye el agua de los océanos, no es raro pensar en la posibilidad de encontrar una enorme cantidad de microorganismos desconocidos por el hombre y aún por descubrir. Los microorganismos (incluyendo los marinos) son extremadamente importantes, porque de ellos dependen diversos procesos químicos para el buen funcionamiento del planeta. Estos constituyen el pilar de la biosfera ya que tienen la capacidad metabólica única de llevar a cabo los ciclos biogeoquímicos que son básicos para el sostén y desarrollo de la vida misma (Hunter-Cevera, 1998).

El mundo marino representa una fuente poco estudiada aunque constituye un extraordinario reservorio microbiano. Existen reportes en donde se descubrió que entre el 90 y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos (Sogin *et al.*, 2006). Sogin y colegas sugieren que si se lograra separar a todos los organismos vivos que habitan en el océano, los microbios constituirían la inmensa mayoría del peso, mientras que otras formas de vida superiores como los peces, así como las diversas especies animales y vegetales solamente representarían entre un 2 y 10 por ciento de la masa de vida del océano.

Por otra parte, el hecho de identificar especies microbianas metabólicamente adaptadas al ambiente marino, esto es, *autóctonas* de dicho ecosistema realza la importancia actual del estudio de la microbiología marina y molecular, así como la diversidad microbiana de los océanos (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a).

Los ambientes oceánicos contienen diversos hábitats (ventilas hidrotermales, lodos marinos profundos, géiseres, zonas litorales, entre otros) en los cuales habitan una multitud de organismos desde microscópicos hasta los más grandes mamíferos. La mayor división de los seres vivos en el océano separa a los organismos pelágicos (los que se encuentran en la columna de agua) de los bentónicos (los que viven en el suelo marino; Kennish, 2001).

El ambiente bentónico incluye: 1) supralitoral, 2) litoral, 3) sublitoral, 4) batial, 5) abisal y 6) la zona hadal. El ambiente pelágico contiene únicamente el nerítico (en la costa) y al oceánico (fuera de la costa). La zona nerítica puede subdividirse de acuerdo a la profundidad del agua en epipelágico (0-200m), mesopelágico (200-1,000m), batipelágico (1,000-2,000m), abisopelágico (2,000-6,000m) y regiones hadalpelágicas (>6,000; Figura 1, Kennish, 2001).

Las bacterias marinas son organismos unicelulares, microscópicos (menores a 2 μm de diámetro). En términos generales se subdividen en autótrofos y heterótrofos. Los primeros obtienen su energía a través de la fotosíntesis (fotótrofos) o a través de la oxidación de compuestos inorgánicos (quimiolitótrofos). Las bacterias heterótrofas, saprófitas y parásitas obtienen energía de otros compuestos orgánicos. Las bacterias aeróbicas heterótrofas se encuentran generalmente en la columna de agua (cuerpo de agua uniforme) ya sea flotando o adjuntas a partículas, en la capa superior de los sedimentos del suelo marino y/o en los tejidos de animales o plantas. Las bacterias anaeróbicas habitan en profundidades mayores, es decir, capas de sedimentos anóxicos, mares anóxicos caracterizados por una pobre circulación o aquellas regiones muy contaminadas (Kennish, 2001).

Las bacterias epibióticas colonizan la superficie de los sustratos marinos que sirven como recurso alimenticio para protozoarios y otros heterótrofos, y un gran número de bacterias vive en los sedimentos del suelo marino (Ward & Bora, 2006).

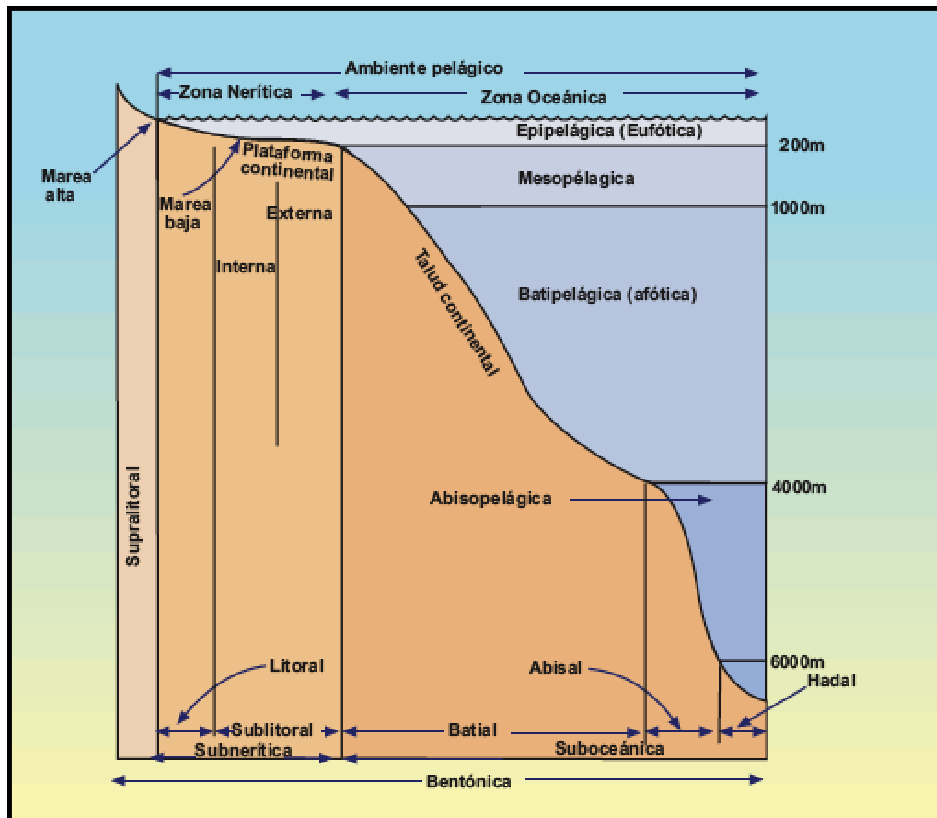


Figura 1. Clasificación del entorno marino.
Fuente: <http://mardechile.cl/educacion/themes/Cool/images/libro/fig8-2.gif>
junio 2008.

Estos sedimentos contienen cantidades limitadas de materia orgánica, con la mayoría de las fuentes de carbono presentes en forma compleja tales como la quitina y/o la celulosa (Magarvey *et al.*, 2004).

La abundancia de las bacterias va disminuyendo desde la costa (1 a 3×10^6 células/mililitro [cel/ml]) hasta la zona nerítica (10^4 a 10^6 cel/ml; Madigan & Martinko, 2006). Este comportamiento es similar en los fondos marinos, con la más alta cuenta bacteriana 10^{11} cel/ml observada en los sedimentos lodosos de los estuarios (parte más ancha y profunda en la desembocadura de los ríos, mares abiertos o en los océanos) y cuentas menores en los sedimentos marinos profundos. La cuenta celular bacteriana así como la abundancia bacteriana también disminuye con el

incremento de la profundidad dentro de los primeros 20 cm de la columna de sedimento. El mayor número de bacterias se alcanza en la interfase sedimento-agua en los primeros 2 cm de los sedimentos del fondo marino y declina progresivamente conforme aumenta la profundidad (Stach *et al.*, 2003). Hay una correlación entre lo mencionado anteriormente y la concentración de materia orgánica presente en la columna de agua y en el fondo de los sedimentos. El mayor número de bacterias y reproducción de las mismas ocurre en los sedimentos enriquecidos en materia orgánica o en concentraciones altas de carbón orgánico. Esto se debe a que las bacterias encuentran la mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento (Kennish, 2001) en estos medios ó ambientes.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA BIOTECNOLOGÍA Y SU RELACIÓN CON LOS MICROBIOS MARINOS

La ciencia que se basa en el descubrimiento y explotación de recursos biológicos donde su aplicación culmina con el desarrollo tecnológico de productos comerciales de utilidad y beneficio para la humanidad se conoce como *biotecnología* (Bull *et al.*, 2000; Bolívar, 2004). Esta ciencia nos ha permitido descubrir, obtener y procesar compuestos producidos naturalmente por microorganismos que en muchos casos son de gran relevancia para industrias como la alimentaria, agrícola, avícola, cosmética y farmacéutica, por mencionar solo algunas de ellas.

Por miles de años y en muchas ocasiones sin que el ser humano conociera su existencia, los microorganismos han sido utilizados para la obtención de productos de utilidad para la humanidad, en productos fermentados como el pan, cerveza, vino, queso y vinagre, son estos microorganismos los que juegan un papel protagónico en el proceso. Otros productos que se obtienen por vía microbiana son la acetona, el butanol y el glicerol. A los productos fermentados por microorganismos le siguieron productos obtenidos por bioconversión o procesos enzimáticos los cuales incluyen aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos, solventes, vacunas y antibióticos.

Hoy en día, hablar de biotecnología no solo se remite a procesos ligados a la producción de alimentos y bebidas, sino a una ciencia mucho más completa y moderna a partir de la aparición y aplicación de la biología molecular.

La biotecnología moderna muestra un conjunto de tecnologías que permiten un impacto radical en innovación, no solo para incrementar los avances en la ciencia, sino para crear un cambio substancial a través de grandes desarrollos y aplicaciones de la biología molecular. La posibilidad de aislar, secuenciar e investigar el material genético de los organismos representa un invaluable tesoro para la industria biotecnológica (Bull *et al.*, 2000), obteniendo una mayor información sobre los beneficios que ofrecen a los seres humanos.

Así, el desarrollo de la biotecnología moderna no puede verse sin la biología molecular ya que actualmente es ésta última la que en muchas ocasiones representa el mayor reto en el desarrollo de un nuevo producto o proceso biotecnológico. En este sentido la diversidad microbiana (incluyendo la marina) representa un invaluable recurso biológico de aplicación y potencial prácticamente ilimitado.

El mundo microbiano comprende a las bacterias, arqueas, hongos y virus. Dentro de estos grupos, está bien establecido que las bacterias se encuentran distribuidas en todo el planeta (Hunter-Cevera, 1998) aunque durante muchos años se consideró que la tierra y el agua dulce eran el mayor reservorio de éstas. Sin embargo, a partir de la década de los 60s los investigadores comenzaron a obtener a los océanos como una alternativa de estudio ya que representa cerca del 95% del total de nuestro planeta. Desde la década pasada, se ha observado a los microorganismos marinos como una alternativa para la obtención de recursos biomédicos y biotecnológicos por ejemplo la obtención de antibióticos, antitumorales e inmunosupresores (Baltz, 2007).

2.2 COMPUESTOS MICROBIANOS DEL CRECIMIENTO CELULAR

Existe una gran cantidad de compuestos que son obtenidos a partir del metabolismo celular microbiano los cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) los metabolitos primarios y 2) los metabolitos secundarios.

Un metabolito primario es aquel que se produce durante la fase primaria del crecimiento de un microorganismo, mientras que un metabolito secundario es aquel que se forma cerca del final de la fase de crecimiento, frecuentemente cerca de o en lo que conocemos como la fase estacionaria (Figura 2).

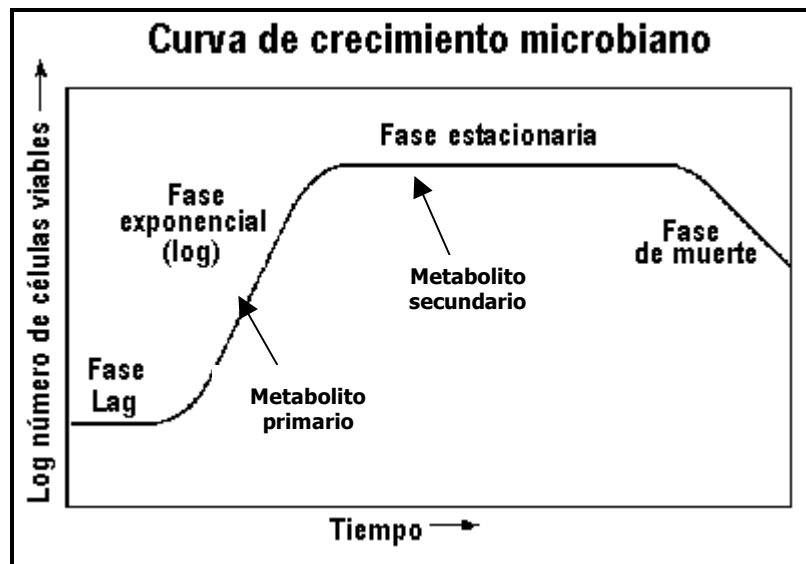


Figura 2. Curva de crecimiento microbiano.

Fuente: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/12crec11.gif>
junio 2008.

Los metabolitos primarios son moléculas pequeñas producidas por las células, las cuales sirven como intermediarios o productos finales de las vías biosintéticas. Por otra parte, los metabolitos secundarios son compuestos o moléculas que se producen generalmente después del crecimiento bacteriano, importantes en el área farmacéutica y nutrición del ser humano (Demain, 2000).

Los metabolitos primarios incluyen a los ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, solventes y vitaminas mientras que entre los secundarios se encuentran los

antibióticos, antihelmínticos, antitumorales, biopesticidas, inhibidores enzimáticos e inmunosupresores (Demain, 2000). En general, el mercado de antibióticos en EUA está valuado en unos 30 millones de dólares y esto incluye aproximadamente 160 compuestos, la gran mayoría de ellos de origen bacteriano (Demain, 2000).

Debido a su importancia económica, los metabolitos secundarios (en específico los antibióticos) son los mas conocidos y estudiados. Estos, son un grupo diverso y complejo de moléculas químicas (Figura 3) tanto en su actividad biológica como en sus estructuras y diversos modos de acción (Walsh, 2003). Se han descrito cerca de 6000 antibióticos, de los cuales 4000 son producidos por el grupo microbiano genéricamente llamado '*actinomicetos*' y cada año se descubren nuevos alrededor de 500 antibióticos, debido a la resistencia que presentan los agentes infecciosos por lo que es necesario seguir investigando para obtener nuevos medicamentos para curar enfermedades nuevas y/o emergentes (Demain, 2000; Baltz, 2007).

Es evidente que sin la existencia y el descubrimiento de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos, la vida humana sería menos apta y más corta. Cerca del 70% de los antibacteriales y aproximadamente el 50% de todos los anticancerígenos son compuestos producidos por microorganismos (Bode & Müller, 2005; Maldonado, 2007a,b).

Los antibióticos mas utilizados son aquellos que presentan una acción rápida contra el agente infeccioso, ya que de esta forma disminuirá la enfermedad en poco tiempo. Sin embargo los tratamientos interrumpidos o llevados a cabo inadecuadamente trae como consecuencia que los microorganismos que producen la infección se vuelvan resistentes al antibiótico a través de modificaciones en su material genético. Por lo anterior un gran número de empresas farmacéuticas han orientado sus investigaciones a tratar de mantener un equilibrio entre los fármacos conocidos y la resistencia bacteriana, abandonando poco a poco sus programas de descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas (Demain, 2000).

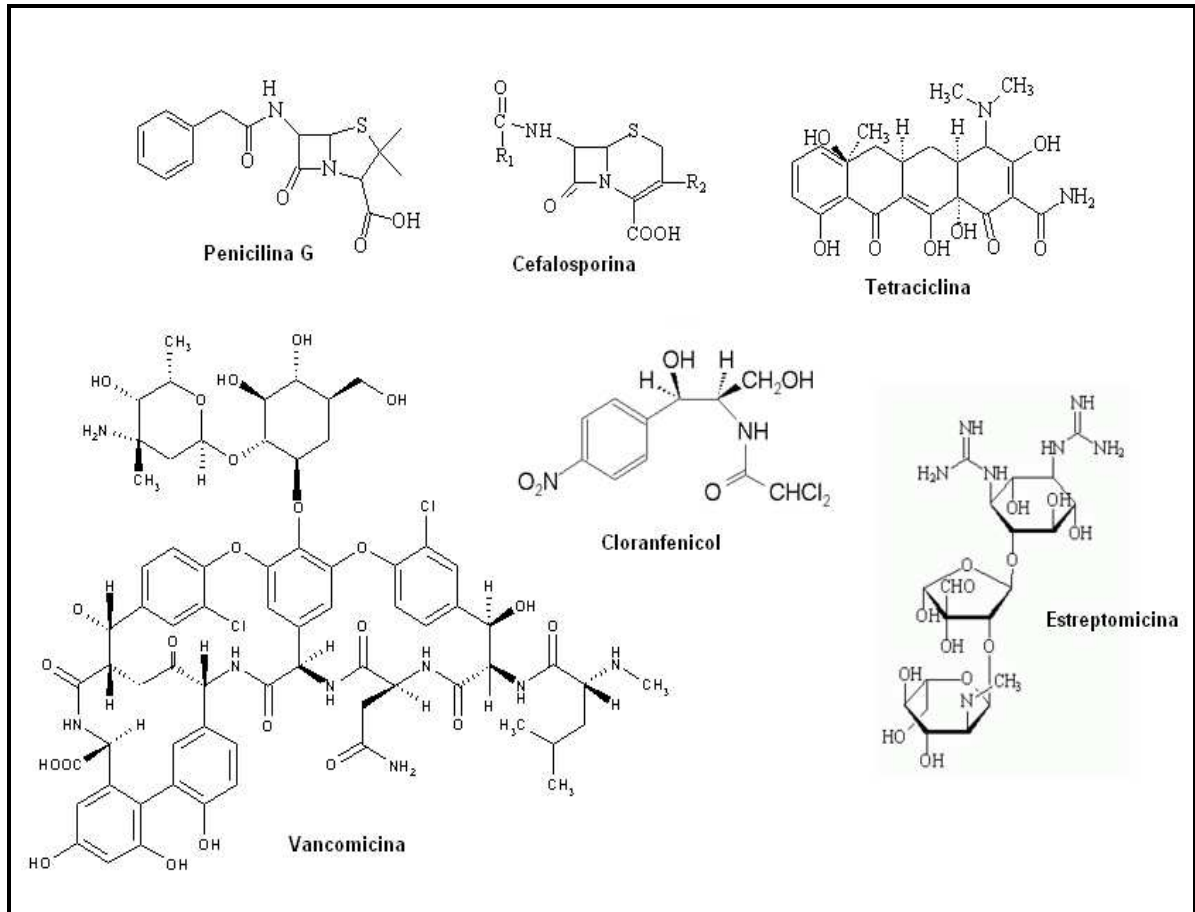


Figura 3. Estructura química de antibióticos de origen microbiano.
Fuente: Demain, 2000.

La razón de lo anterior se debe a: 1) el aislamiento y caracterización de los microorganismos son sumamente laboriosos, 2) obtener la misma cantidad de producto como aquella que se podría obtener por síntesis química al mismo tiempo es difícil, y 3) la producción de cualquier producto natural que involucre una fuente biológica requiere de manipulación y personal especializado en la materia. Debido al costo y el trabajo para descubrir un producto microbiano que sea prometedor y útil para el tratamiento de alguna enfermedad es un desafío difícil y altamente caro de realizar. Como consecuencia, las grandes empresas farmacéuticas mantienen sus principales procesos, basados en compuestos sintetizados químicamente lo que se conoce genéricamente como síntesis orgánica.

Unas desventajas que se observan de lo anteriormente descrito se traducen en lo siguiente: 1) usualmente las moléculas producidas por los microorganismos son notablemente complicadas como para que sean sintetizadas “rápidamente” en el

laboratorio, 2) la composición química de los productos naturales es más estable, 3) el porcentaje de los productos naturales activos es más alto y 4) la fuente biológica del compuesto es frecuentemente renovable y abre la posibilidad para una producción elevada. Lo anterior ha sido explotado por los químicos orgánicos, ya que estos aciertos resultan en el desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias para la síntesis orgánica, donde nuevos compuestos de origen microbiano e identificados como productos naturales potenciales pueden servir como base de reacciones o modificaciones químicas con el objeto de crear análogos de estos productos naturales (Bode & Müller, 2005).

La obtención de antibióticos con un mecanismo de acción nuevo es una necesidad actual, debido al surgimiento de cepas multiresistentes a diferentes fármacos de última línea y a la aparición de enfermedades emergentes.

2.3 IMPORTANCIA DE LA FENO Y GENOTIFICACIÓN MICROBIANA

Para que un microorganismo se desarrolle en la naturaleza o en el laboratorio, debe tener una fuente de energía la cual es principalmente una fuente de carbono. Además, debe contener minerales y un rango permisivo de condiciones físicas como concentración de O₂, temperatura y pH. En el laboratorio, las bacterias crecen en medios de cultivo diseñados para proveerles los nutrientes esenciales para su crecimiento.

Las bacterias necesitan compuestos orgánicos que son el principal constituyente de la materia celular. Después del carbono, el siguiente elemento necesario y el más abundante en la célula es el nitrógeno. En una bacteria alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno, y las fuentes de nitrógeno pueden ser de naturaleza orgánica e inorgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Además para la síntesis de proteínas se requiere en general de L-aminoácidos, también son necesarios algunos D-aminoácidos, y en algunos casos se requiere de péptidos de histidina.

El fósforo y el azufre pueden ser suministrados en forma de sales inorgánicas o aminoácidos azufrados. Este fósforo se incorpora en los ácidos nucleicos y

polímeros celulares. El azufre es asimilado en la síntesis de aminoácidos azufrados. El potasio y magnesio son también nutrientes esenciales. El potasio es importante porque se une al RNA lo cual influye en el aumento del tamaño celular además de favorecer la velocidad de crecimiento. El ión potasio actúa como coenzima y probablemente también como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión magnesio es esencial para la estabilidad de los ribosomas actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. En muchos medios de cultivo el potasio y el magnesio se incorporan en forma de sales inorgánicas (Madigan & Martinko, 2006).

Respecto a los micronutrientes se distinguen dos categorías: aquellos que son esenciales para el crecimiento como calcio, magnesio, hierro, cobalto, cobre y zinc y los menos esenciales como boro, sodio, aluminio, silicio, cloro, vanadio, cromo, níquel, arsénico, selenio, yodo, molibdeno y estaño. A veces es difícil demostrar que un micronutriente es esencial para los microorganismos, ya que generalmente este se encuentra en cantidad suficiente como impureza de los componentes principales. Los factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantotético y niacina. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas (Madigan & Martinko, 2006).

También dentro de la caracterización fenotípica esta la quimiotaxonomía, analiza la pared celular a través de determinaciones químicas dando como resultado huellas específicas que permiten la identificación incluso de géneros bacterianos. La cromatografía en capa fina (TLC, del inglés) se utiliza para el análisis del ácido diaminopimélico (DAP -del inglés-; un componente de la pared celular de algunas bacterianas) es una técnica importante en la clasificación de los actinomicetos ya que permite separar taxonómicamente los estereoisómeros del DAP. La presencia del LL-DAP es una huella específica que permite, por ejemplo, la identificación del género actinobacteriano *Streptomyces*. El procedimiento consiste en realizar una hidrólisis ácida de las células bacterianas para la obtención de los aminoácidos de la pared celular. En la placa de TLC es posible ver los puntos del DAP en una gama de colores como gris, verde y amarillo con los isómeros DAP migrando al inicio del corrimiento. Los aminoácidos aparecen de color morado o rojo migrando inmediatamente después de los puntos DAP (Staneck & Roberts, 1974).

Desde el inicio del estudio de los microorganismos de manera sistemática, el ser humano ha empleado numerosas herramientas para cumplir con éste propósito. En sentido estricto, Peter Sneath, un investigador británico es considerado como el padre de lo que ahora denominamos *taxonomía numérica*. En breve, un microorganismo o grupo de microorganismos desconocido(s) es(son) evaluado(s) ante diferentes números de pruebas, con la finalidad de formar grupos y establecer así posibles relaciones entre los microorganismos de cada uno de los miembros del grupo. Estas pruebas son las que después derivan en esquemas reducidos (tablas de identificación) empleados para los diferentes microorganismos de interés (Logan, 1994).

Entre las diferentes pruebas se han empleado la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, crecimiento a diferentes temperaturas y curva de pH, entre otras. Que posteriormente sirvieran para hacer un diagrama donde se describa el perfil metabólico del microorganismo o microorganismos de interés. La utilidad de este tipo de pruebas no radica exclusivamente en el diseño de esquemas de identificación sino que también proporciona el perfil metabólico de un microorganismo(s) “desconocido(s)”, esto puede facilitar el diseño y evaluación de medios de cultivo específicos para el aislamiento de grupos particulares que muestran cierta preferencia por uno u otro grupo de las diferentes pruebas aplicada. Puesto que lo anterior es medido de manera “visual” y depende estrictamente de las características observables del microorganismo durante la lectura de las pruebas, es conocido como una caracterización “fenotípica microbiana” (Logan, 1994).

Con el advenimiento de la biología molecular y la determinación de secuencias específicas de ADN, se ha cambiado la manera de ver a los microorganismos en diferentes aspectos. La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA ha modificado nuestra percepción sobre la forma de clasificarlos. El concepto de homología (o similitud) engloba todo un análisis filogenético, es decir, la búsqueda de aquel ancestro que puede ser rastreado únicamente estimando los cambios en la secuencias de genes similares a partir de cepas tipo o de referencia (Sneath, 1993). Los genes del rRNA son esenciales para la subsistencia de los seres vivos y contienen nuestra historia evolutiva ya que están altamente conservados en

bacterias y organismos superiores por lo que pueden ser utilizados para generar el árbol universal de la vida.

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction; PCR, del inglés) es un método que sirve para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir de cantidades muy pequeñas (<1 µg de muestra y en teoría a partir de una sola molécula de ADN). La PCR amplifica exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario. El proceso comprende varios ciclos divididos en 3 etapas: 1) desnaturalización, 2) hibridación y 3) extensión. Lo anterior se resume de la siguiente manera: primero se desnaturaliza el ADN por calor (aproximadamente a 94°C), después se baja la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras ahora separadas se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos perfectamente complementarios, cuya longitud sea suficiente (20-30 bases de longitud) para formar híbridos estables con la molécula que sirve de plantilla. Estos desoxinucleótidos funcionan como cebadores (primers) de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la polimerasa *Taq* (llamada así por haber sido aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*) extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos utilizando las hebras del ADN bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como extensión del cebador o primer. Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del ácido nucleico original. El ciclo anterior se repite unas 20 o 45 veces sin añadir más enzima y usando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como plantilla. De esta forma se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos.

El secuenciamiento del ADN es la determinación del orden de bases en una molécula. Existen básicamente dos métodos: la degradación química (Maxam-Gilbert) y la síntesis enzimática de la región a secuenciar (Sanger). En secuenciación, un gran avance tecnológico lo constituye la introducción de equipos automatizados los cuales son usados para separar los productos de las reacciones de secuenciación, detectar y coleccionar (vía computadora) la información de estas reacciones así como establecer el orden de las bases para automáticamente deducir la secuencia de bases del fragmento de ADN de interés (Hardin, 2001).

Las técnicas de secuenciación también han influenciado notoriamente nuestra visión sobre la información que un microorganismo posee en su material genético. Desde la publicación del primer genoma secuenciado (*Haemophilus influenzae*) en 1995, más de 250 genomas han sido secuenciados y más de 600 genomas procariotes y 460 eucariotes están también siendo secuenciados actualmente (Bode & Müller, 2005). Aunque en el pasado el enfoque del secuenciamiento microbiano se basó en bacterias patógenas, actualmente 47% de todas las bacterias secuenciadas o en proceso de secuenciamiento representan microorganismos de importancia y aplicación industrial.

La información que nos proporciona el secuenciar un genoma es enorme y altamente heterogénea. Esta ha brindado conocimientos nuevos tales como: genes de virulencia, interacción hospedero-patógeno, nuevos blancos moleculares y genes y maneras novedosas para producir metabolitos secundarios. Lo que nos permite de una manera más apropiada establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo bacteriano.

Las bacterias tienen grandes ventajas en comparación con las plantas y los hongos, sobre todo en términos de los genes que codifican para la información referente a su metabolismo secundario. En las bacterias, los genes biosintéticos se agrupan en operones (clústers) con toda la información de manera continua, la información codificada es grande, en consecuencia el costo de su secuenciamiento puede ser reducido, ningún intrón o fragmento de DNA que no codifica para una proteína está presente logrando así que los métodos de expresión comiencen directamente del ADN cromosomal (Bode & Müller, 2005).

Dentro de los actinomicetos, es decir, bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina (G+C), se han secuenciado especies que producen metabolitos secundarios, que se han tomado como modelo de estudio. El secuenciamiento de estos ha permitido conocer las agrupaciones de genes necesarios para la producción de metabolitos secundarios antes desconocidos. Los organismos más estudiados y ejemplos por excelencia son *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* que por estudios genéticos previos al secuenciamiento de su genoma se sabía producían de 3 a 4 metabolitos secundarios, respectivamente.

Sin embargo, una vez completado el secuenciamiento de sus genomas ha revelado que poseen entre 20 y 25 genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Figura 4; Bode & Müller, 2005).

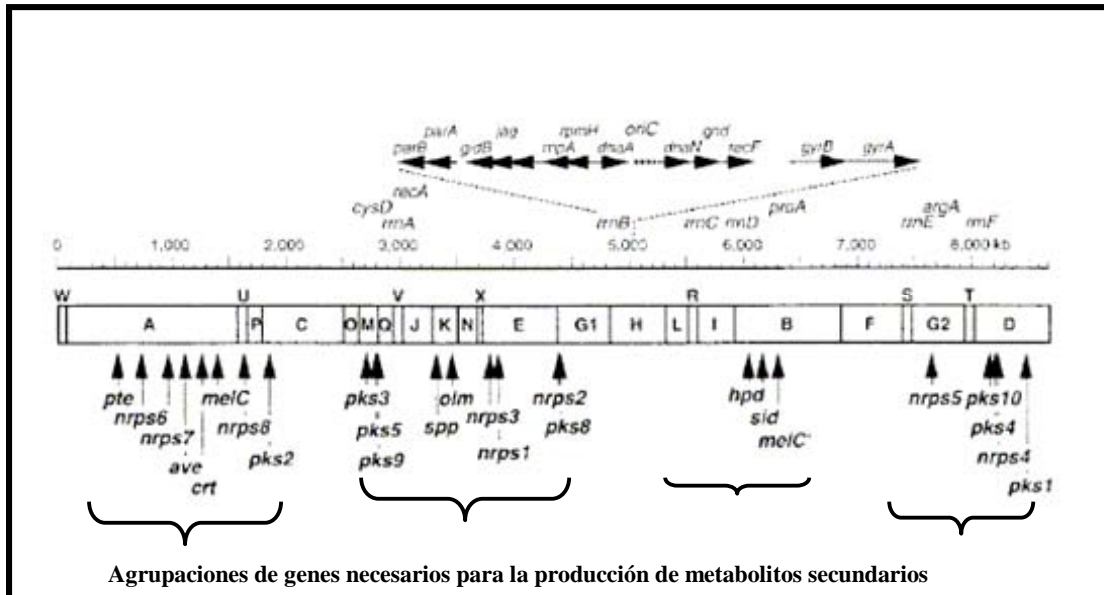


Figura 4. Genoma lineal de *Streptomyces avermitilis* que contiene 8.7 millones de pares de bases, las agrupaciones de genes necesarios para la producción de metabolitos secundarios se encuentran señalados con llaves. Fuente: Ômura *et al.*, 2001.

Actualmente, los métodos más específicos e informativos empleados para clasificar a los microorganismos se basan en la determinación de secuencias de nucleótidos de regiones específicas de ADN, en concreto del gen del 16S ribosomal. Esta molécula está universalmente distribuida y es funcionalmente homóloga en cada organismo lo que hace que la comparación filogenética sea a partir de la identificación de regiones homólogas (Madigan & Martinko, 2006).

A partir del análisis comparativo de secuencias, se pueden construir las genealogías moleculares que conducen a los árboles filogenéticos, éstos nos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos (Woese *et al.*, 1990).

El operón del RNA ribosomal (Figura 5) se encuentra conformado de la siguiente manera (5' → 3'): rRNA 16S, espacio de región, rRNA 23S, espacio de región y rRNA 5S. Los genes de la subunidad 16S rRNA son similares en longitud en todos los miembros del dominio procarote (sobre 1.5 kb) y contiene algunas regiones

altamente conservadas y otras variables. Lo anterior sirve como una herramienta rápida y confiable para la clasificación de procariotes (Madigan & Martinko, 2006).

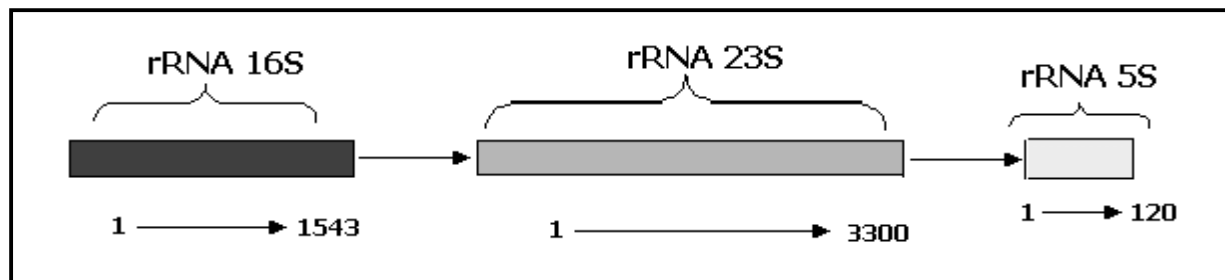


Figura 5. Operón del rRNA. Cada rectángulo indica los genes del operón. Las flechas indican la transcripción del operón, que va de izquierda a derecha y los números indican el tamaño aproximado de cada subunidad.

Fuente: Modificada de Maldonado, 2002.

Lo anterior se realiza empleando cebadores (primers, del inglés) universales que se unen complementariamente al inicio y final del gen del 16S rRNA y por PCR se obtienen millones de copias que pueden ser purificadas y enviadas a secuenciar para su posterior análisis.

2.4 LA CLASE ACTINOBACTERIA

El término *actinomiceto* tiene una larga y oscura historia. La primera descripción que se conoce de un “hongo radiado” (*actino* significa *rayo* y *miceto* es *hongo* en latín) aparentemente proviene del investigador alemán Ferdinand Cohn en 1875. Con el paso de los años, el término se fue acuñando para incluir diferentes agrupaciones de microorganismos hasta la primera clasificación “formal” que propusieran Waksman y Henrici en 1943 para estos microorganismos que inclusive se llegaron a considerar como el “puente evolutivo” entre las bacterias y los hongos. Es desde estas fechas que diversos investigadores consideraban a este grupo precisamente como parte del Reino Fungi, sobre todo por sus características morfológicas macroscópicas y su desarrollo así como por su descripción original. No fue, sino hasta después de numerosos estudios y en particular al comparar secuencias ribosomales del gen 16S rRNA ribosomal que finalmente se estableció que los “*hongos radiados*” se encuentran relacionados filogenéticamente a las Eubacterias (Figura 6) específicamente ocupando un lugar cercano con las bacterias Gram positivas (Figura 7).

Una vez establecida la posición evolutiva, el término clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) es el que actualmente se utiliza para su denominación genérica aunque en muchas ocasiones sea el término original (es decir *actinomiceto*) el que siga prevaleciendo entre diferentes grupos de investigación. La clase *Actinobacteria* es un grupo extremadamente diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. Por ejemplo, en agosto del año 2008, esta clase comprendía 51 familias y 253 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Evidentemente, la gran mayoría de los géneros que comprende han sido aislados de fuentes terrestres ya que se consideraba a éste hábitat como su reservorio por excelencia. La presencia de éstos en otros hábitats era, por consecuencia, explicada en términos de que las esporas de estos microorganismos eran acarreadas hacia el mar. En la actualidad existe evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a éste ecosistema. Evidentemente el descubrimiento del género *Salinispora* ha contribuido a la apertura de una nueva era en el biodescubrimiento de microorganismos de la clase *Actinobacteria* en éste hábitat.

La clase *Actinobacteria* comprende al grupo de bacterias Gram (+) caracterizadas por un alto contenido de Guanina y Citosina [G+C] (Logan, 1994). La importancia en el estudio de éstos está centrada en dos géneros de impacto económico: (a) *Mycobacterium*, contiene al agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad y (b) *Streptomyces*, los cuales son el modelo genético por excelencia en cuanto a la producción de la gran mayoría de los antibióticos empleados de manera comercial (Baltz, 2007; Maldonado, 2007a,b). Hay otros géneros que juegan también un papel importante en los procesos de biodegradación y biorremediación (Logan, 1994; Madigan & Martinko, 2006) aunque en nuestro país este grupo bacteriano es poco estudiado sin embargo es reconocido a nivel mundial por su elevado impacto económico (Baltz, 2007).

Es precisamente el interés desde el punto de vista económico que la búsqueda de actinos se ha reorientado hacia ambientes poco estudiados como sedimentos de

ríos, lagos y océanos pues ofrecen la posibilidad de encontrar cepas nativas desconocidas que produzcan nuevos metabolitos farmacológicamente activos (Bull *et al.*, 2000, 2005; Baltz, 2007). El interés por examinar la diversidad biológica de actinos en el ambiente marino viene de décadas atrás para la búsqueda y descubrimiento de productos activos de nueva composición química. Lo anterior se hizo evidente en 1984, con la descripción taxonómica del primer actino aislado de origen marino, *Rhodococcus marinonascens* (Helmke & Weyland, 1984) aunque éste no muestra una dependencia por sales marinas para su crecimiento a diferencia del género *Salinispora* mencionado previamente.

Se reconocen tres géneros de la clase *Actinobacteria* mundialmente como los predominantes en el ambiente marino: *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Goodfellow & Haynes, 1984). Sin embargo, el empleo de técnicas de biología molecular para evaluar la diversidad microbiana a partir de la amplificación de regiones específicas han ido lentamente aclarando la biodiversidad actinobacteriana presentes en sedimentos marinos (Stach *et al.*, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005b).

El presente proyecto se concentró en aislados microbianos recuperados de sedimentos marinos del Pacífico Mexicano dada la carencia de estudios en el país acerca de la biodiversidad de *Actinobacteria* en muestras nacionales. De acuerdo a los resultados de un alumno de estancias profesionales tuteladas de la Facultad de Química, licenciatura QFB en el 2006, se estudiaron 13 aislados que, por sus características macroscópicas, pudieran pertenecer a los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces*.

El género *Streptomyces* es muy grande, a este género pertenecen alrededor de 533 especies y 38 subespecies descritas de acuerdo con Euzéby (2008). Forman colonias discretas y liquenoides, algodonosas o grasosas (Figura 8). Inicialmente, las colonias son relativamente suaves y crecen hacia adentro del medio de cultivo con el tiempo van desarrollando una hifa aérea que aumenta en tamaño hasta formar el micelio aéreo. La mayoría de las colonias se desarrollan a temperaturas entre los 25 y 35°C y crecen mejor entre valores de pH de 5.0 a 8.0 (Rodríguez, 2004).



Figura 8. *Streptomyces* sp con producción de metabolitos sobre el micelio aéreo.
Fuente: Maldonado & Quintana, sin publicar.

El hábitat natural de la mayoría de los estreptomicetos es el suelo, donde constituyen del 1 al 20% de la población cultivable (Prescott *et al.*, 1999) siendo además los responsables del característico olor a “tierra mojada”, por la síntesis de un compuesto aromático denominado “geosmina”. En general, se les considera como microorganismos no fastidiosos para su crecimiento pues no requieren de vitaminas o factores específicos para su desarrollo. Es en el suelo donde logran encontrar una amplia superficie que permite el crecimiento del micelio con una subsecuente producción de esporas que asegura la supervivencia en períodos largos de sequía, heladas, presión hidrostática y condiciones anaeróbicas producidas por diferentes factores abióticos (Korn & Kutzner, 1992).

Se han aislado estreptomicetos de ambientes acuáticos, tanto del sedimento de la zona litoral como del mar profundo, desempeñando un papel importante en la mineralización. Estos pueden degradar sustancias resistentes como lo son los compuestos aromáticos, látex, lignina, pectina, queratina y quitina, lo que evidentemente tiene un impacto en el área de biorremediación (Prescott *et al.*, 1999).

La mayoría de los estreptomicetos son saprofitos, sin embargo algunos se asocian a enfermedades de plantas y animales como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S.*

caviscabies, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies* (Loria *et al.*, 2007) que causan la roña de la papa. *Streptomyces somaliensis* (Skerman *et al.*, 1980) y *S. sudanensis* (Quintana *et al.*, 2007) son los únicos estreptomicetos reconocidos como patógenos para el ser humano. Se les asocia con el actinomicetoma, una infección en los tejidos subcutáneos que produce lesiones y conduce a abscesos, tumefacción e incluso destrucción ósea cuando no se trata (Prescott *et al.*, 1999). Existen pocos reportes de micetomas subcutáneos en felinos y delfines, en este caso producidos por algunas cepas de la especie *Streptomyces griseus* (Koneman *et al.*, 1999).

El ciclo de vida de un estreptomiceto se ejemplifica de manera completa en la Figura 9. El micelio de sustrato (células que se desarrollan dentro y sobre la superficie del medio de cultivo) no muestra una fragmentación característica. Por el contrario, la hifa aérea (células que crecen hacia arriba y afuera de la superficie del agar; Koneman *et al.*, 1999) se divide en un solo plano para formar cadenas que pueden ser de 3 a 50 conidiosporas inmóviles, con una textura superficial que oscila entre lisa, espinosa y verrugosa (Prescott *et al.*, 1999). Dicha formación de esporas puede, en algunos casos, semejar fragmentación dependiendo del grado de especialización de la hifa aérea.

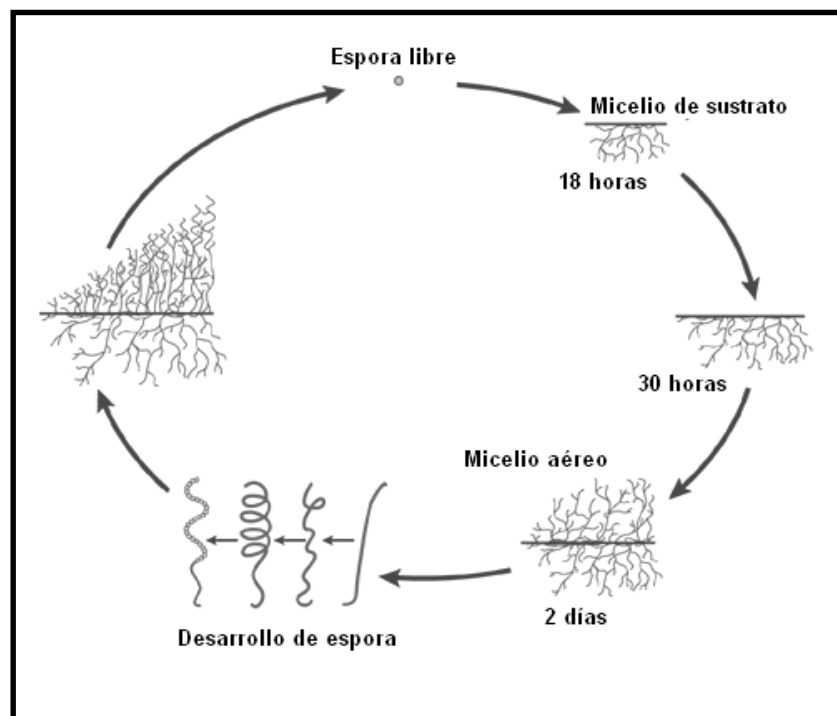


Figura 9. Ciclo de vida de los miembros del género *Streptomyces*.
Fuente: <http://twistedbacteria.blogspot.com/2007/08/streptomyces-theyre-twisted.html>
Junio 2008.

Todos los *Streptomyces* poseen una pared celular Tipo I que está caracterizada por la presencia del ácido *LL*-diaminopimérico y glicina así como por la ausencia de azúcares característicos (Anderson & Wellington, 2001). Su contenido de G+C oscila entre el 69 y 78%.

Los estreptomicetos son los actinomicetos más estudiados presentan una capacidad innata de sintetizar una extensa variedad de antibióticos entre los que se encuentran la anfotericina B, el cloranfenicol, la estreptomina, la neomicina, la nistatina y la tetraciclina. Para entender la importancia de la producción de antibióticos por *Streptomyces* basta con saber que algunos autores mencionan que el número total de antibióticos producidos por bacterias y hongos es de 10000. Los actinomicetos son responsables de una tercera parte de ese número, dentro de los actinomicetos los estreptomicetos ocupan el 70 al 80% de la producción total de estos metabolitos secundarios (Challis & Hopwood, 2003). *Streptomyces coelicolor* es responsable de la producción de la mayoría de los antibióticos naturales usados actualmente en la medicina humana y veterinaria (>65%; Challis & Hopwood, 2003). La producción de antibióticos en *Streptomyces* no es esencial para el crecimiento de las colonias de bacterias y se empiezan a producir cuando ha terminado la fase activa de crecimiento cuando el productor esta entrando en una fase reproductiva o vegetativa (Prescott *et al.*, 1999). Su actividad biológica es amplia, incluyendo la inhibición y defensa con otros microorganismos, a través de efectos tóxicos hacia otros organismos multicelulares, plantas o animales (esto es coherente si entendemos que los estreptomicetos son bacterias no móviles (Challis & Hopwood, 2003). A pesar de lo discutido, la producción de antibióticos, no sólo esta relacionada con la defensa y la competencia por recursos, sino también está involucrada en la comunicación entre células y colonias bacterianas. Incluso los antibióticos pueden inducir cambios complejos en la expresión genes de las bacterias lo cual es un factor de suma importancia en la medicina y en los posibles cursos que las enfermedades infecciosas pueden tomar (Hoffman *et al.*, 2007).

Un ejemplo de lo anterior son los biofilms que son comunidades microbianas que se adhieren y crecen en superficies sólidas, generalmente en contacto con una fase líquida. Los biofilms bacterianos pueden formar estructuras complejas, consistentes en una matriz con canales de agua que permiten el transporte e intercambio de

nutrientes y productos de desecho entre el mismo biofilm y el ambiente. Algunas poblaciones bacterianas de estos biofilms pueden producir antimicrobianos que les funciona como un mecanismo de competencia o defensa contra otras bacterias. Un factor que adhiere complejidad a las interacciones dentro de un biofilm es el quorum sensing definido como una comunicación entre las células relacionadas por su densidad de una o de distintas especies por medio de pequeñas moléculas señalizadoras difusibles. El *quorum sensing* puede controlar la producción de compuestos antibacterianos, como los antibióticos o las bacteriocinas (Hoffman *et al.*, 2007).

Especies del género *Streptomyces* se determinan a través de diferentes características morfológicas y fisiológicas como: a) el color de los micelios aéreos y de sustrato, b) la disposición de las esporas, c) las características superficiales de la espora, d) la utilización de carbohidratos, e) la producción de antibióticos, f) la síntesis de mielina, g) la reducción de nitrato, y h) la hidrólisis de la urea y ácido hipúrico (Prescott *et al.*, 1999). Sin embargo, para prevenir la sobre-especiación, es necesario usar tanto métodos moleculares como quimiotaxonómicos. Los primeros incluyen la tipificación con fagos, hibridación DNA-DNA, comparación de los patrones de proteínas ribosomales, análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (Anderson y Wellington, 2001), RFLP 16S-ITS fingerprinting (Lanoot *et al.*, 2005), Box PCR (Lanoot *et al.*, 2004), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas celulares (Lanoot *et al.*, 2002) y la comparación de las secuencias de rRNA 16S y rRNA 23S (Anderson y Wellington, 2001) y los segundos incluyen únicamente estudios sobre la composición de la pared celular.

A diferencia del género *Streptomyces*, el género *Micromonospora* Ørskov 1923 se caracteriza por la producción de una sola hifa de sustrato bien desarrollada y ramificada con un diámetro promedio de 0.5 µm. En este caso, las esporas (no móviles) nacen y crecen una a una a través de la hifa de sustrato, son cortas y en ocasiones en grupos aunque la mayoría de las veces de manera sencilla. No existe la formación de un micelio aéreo y las colonias son generalmente anaranjadas, que progresivamente pasan de marrones a negras, terminando con un aspecto mucoide de tonalidad oscura que es indicativo del proceso de esporulación (Figura 10). Los miembros de éste género también son grandes productores de compuestos

antibacterianos como la gentamicina su mejor representante de importancia comercial. El género *Micromonospora* es indistinguible macro-morfológicamente de los géneros *Salinispora* y *Verrucosipora* (que también pertenecen a la familia *Micromonosporaceae*; Rheims *et al.*, 1998) por lo que es necesario realizar el secuenciamiento de genes conservados para poder establecer la posición taxonómica estricta de aislados que “aparentemente” son *Micromonospora* y así diferenciar a éstos géneros filogenéticamente relacionados.

Los miembros del género *Micromonospora* muestran un ciclo complejo de desarrollo que los diferencia tanto morfológicamente como fisiológicamente. Estudios en *Micromonospora* son pobres a comparación de aquellos en *Streptomyces* por lo que un mejor entendimiento de la extensión de éste grupo microbiano puede llevar a mejores estudios respecto a su posible explotación.

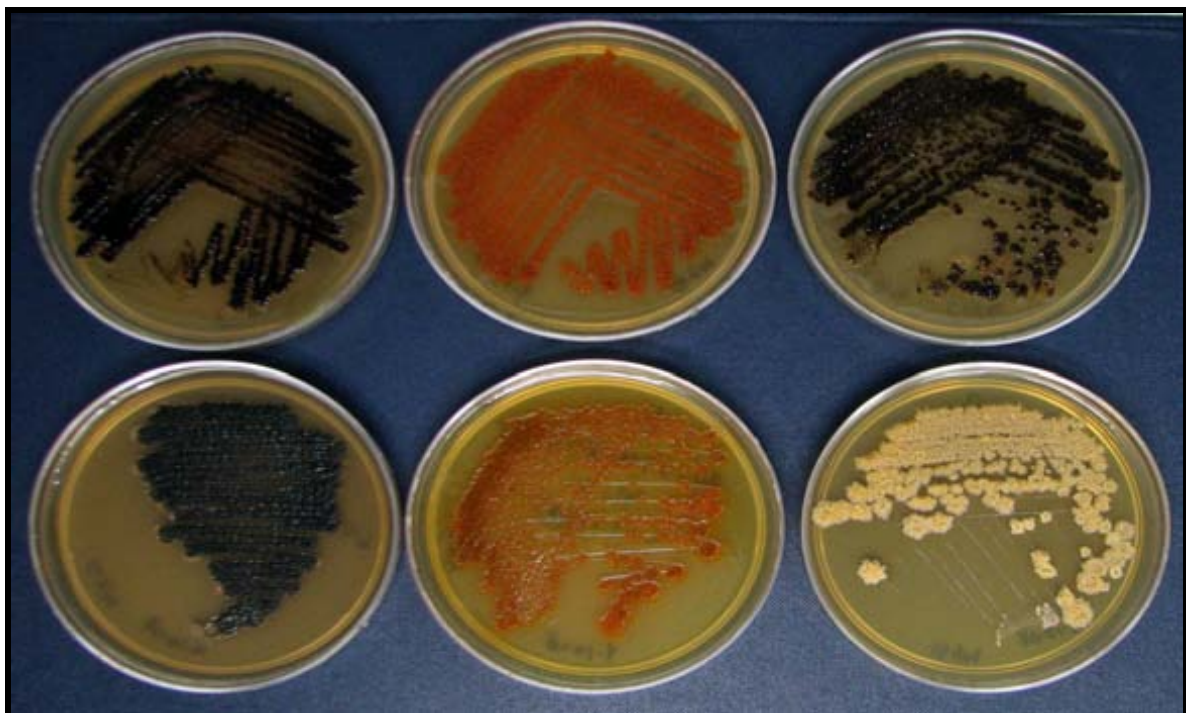


Figura 10. Diferentes miembros de la familia *Micromonosporaceae* mostrando los diferentes estadios de los cultivos.

Fuente: Maldonado & Quintana, sin publicar.

2.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por muchos años se consideró que la tierra y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos. Sin embargo, existen reportes en donde se descubrió que entre el 90 y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos (Sogin *et al.*, 2006). Si consideramos que $\frac{3}{4}$ partes de nuestro planeta están cubiertas por agua y que cerca del 70% de ella lo constituye el agua del océano, no es raro pensar en la posibilidad de una enorme cantidad de microorganismos desconocidos por el hombre y por descubrir, los cuales podrían presentar la capacidad de producir moléculas bioactivas de utilidad comercial y de beneficio para la humanidad. Además, no ha sido sino hasta la aplicación de técnicas moleculares que se ha estimado la increíble extensión de la diversidad microbiana. Por lo que es evidente que el mundo marino representa una fuente inexplorada de descubrimiento y constituye un extraordinario reservorio microbiano.

Dentro de este mundo microbiano se encuentran un grupo prolífico productor de metabolitos secundarios denominado -los actinomicetos-. La importancia en su estudio radica en que este grupo bacteriano es el responsable de más del 70% de los antibióticos de importancia médica y aplicación clínica. En México existen pocos grupos de investigación que se dedican al estudio de las *Actinobacterias* y aun menos grupos específicamente estudiando el ecosistema marino. La existencia de grupos bacterianos estrictamente de ambientes marinos (Maldonado *et al.*, 2005a) y la evidencia de que miembros de esta clase están presentes en el ecosistema marino mexicano y que este representa un extraordinario reservorio actinobacteriano abre la puerta para varias preguntas pero sobre todo la importancia que tiene estudiar a los actinomicetos tanto fenotípicamente como genotípicamente.

2.6 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente diferentes microorganismos aislados de sedimentos marinos del Golfo de California.

2.7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar el crecimiento de diferentes actinomicetos aislados de sedimentos marinos en distintas fuentes de carbono.
- Observar el crecimiento de diferentes actinomicetos aislados de sedimentos marinos en distintas fuentes de nitrógeno.
- Registrar la tolerancia de diferentes actinomicetos en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio.
- Ver el impacto de diferentes antibióticos en el crecimiento de diferentes actinomicetos aislados de sedimentos marinos.
- Realizar un estudio comparativo entre algunos actinomicetos terrestres y marinos y establecer su filogenia.

2.8 HIPÓTESIS

Aislados marinos recuperados del Golfo de California cuyo ambiente presenta condiciones extremas y distintas al ecosistema terrestre, es probable que muestren una capacidad de utilización de fuentes de carbono, nitrógeno y tolerancia a antibióticos y sales marinas diversa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental para el presente proyecto consistió en dos grandes partes, la primera en un estudio molecular y la segunda en uno fenotípico. La representación gráfica de la estrategia experimental se muestra en la siguiente figura:

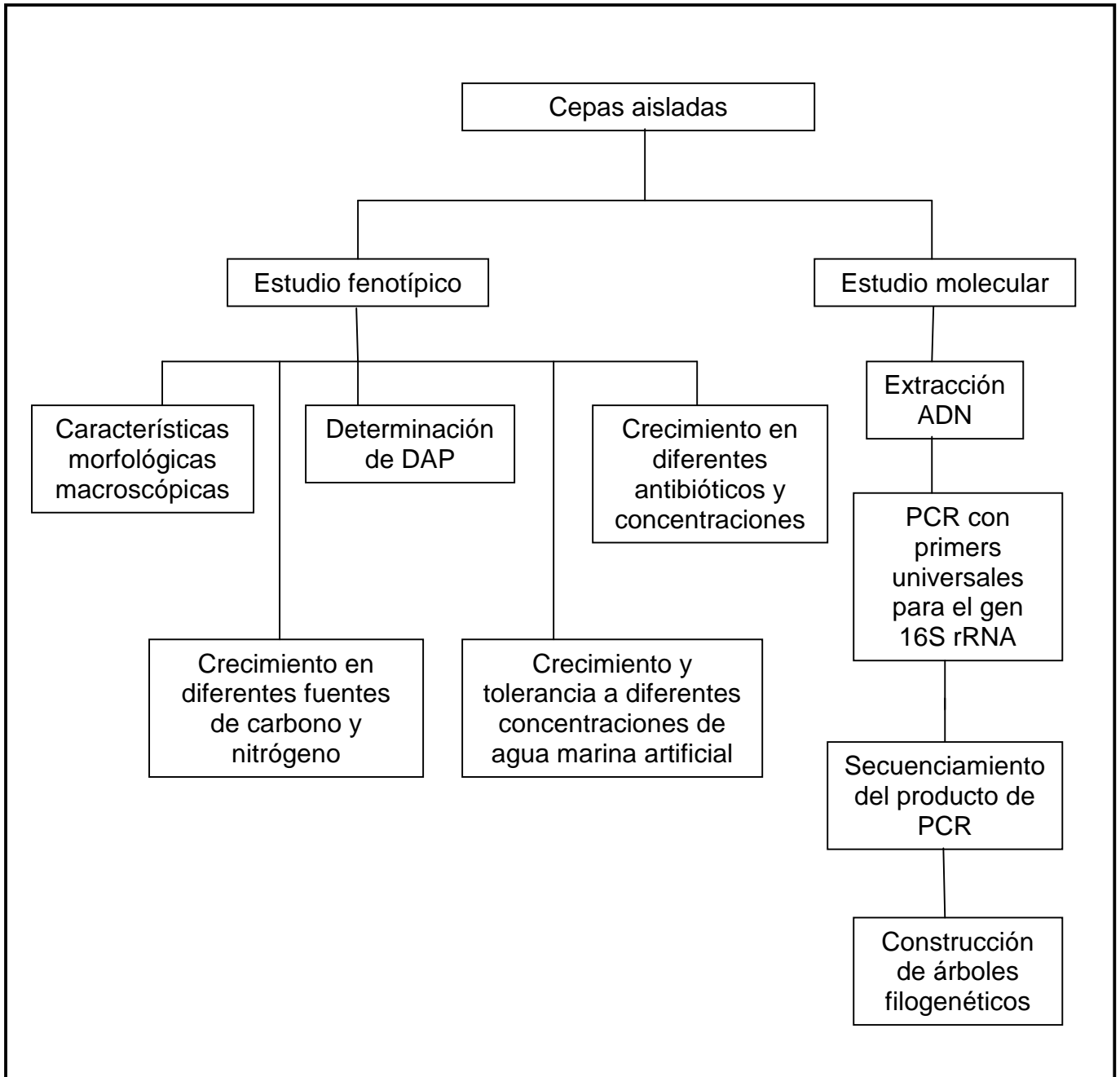


Figura 11. Diseño experimental del proyecto de investigación.

3.1 Cultivo de fuentes microbianas

Los diferentes actinomicetos se aislaron de sedimentos marinos recolectados en el Golfo de California (Océano Pacífico) a 300 metros de profundidad en estudios previos desarrollados en el Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Marina del Instituto de Ciencias de Mar y Limnología (ICMyL-UNAM-CU; Dr. LA Maldonado Manjarrez, comunicación personal). La biomasa de los aislados se conservó en tubos con glicerol (20% p/v a -20°C) y se inocularon en dos diferentes medio de cultivo, esto es, agar glucosa extracto de levadura (GYEA, del inglés; Gordon & Mihm, 1962; ver Apéndice A) y agar extracto de malta (GYM, del inglés; ver Apéndice A). En este proyecto todos los medios se prepararon con agua marina artificial (Instant Ocean, USA) a menos de que se indique otra cosa.

Trece cepas se seleccionaron con las claves: AB-1, AE-1, AI-1, AK-1, AL-1, AL-2, AN-1, AQ-1, AP-1, BB-1, BC-1, BX-2 y BX-3, así como dos cepas de referencia con los códigos: CNH-643^T (*Salinispora arenicola*) y CNB-440^T (*Salinispora tropica*), respectivamente. Adicionalmente las cepas: AE-1, AI-1, AK-1, AL-1, AL-2, BX-2, BX-3, se sembraron en medio ISP-3 (ISP, International *Streptomyces* Project número 3, del inglés, ver Apéndice A) y AB-1, AN-1, AP-1, AQ-1, BB-1, BC-1, CNH-643^T, CNB-440^T en GYEA y GYM. Las cajas Petri se incubaron de 1 a 3 semanas a 28°C . Las cepas AB-1, AN-1, AP-1, AQ-1, BB-1, BC-1 además se inocularon en medio líquido A1 y TCG (100 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250mL, ver Apéndice A). Los matraces se incubaron a 28°C durante 3 semanas.

3.2 Caracterización morfológica macroscópica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos de México

Las cepas AE-1, AI-1, AK-1, AL-1, AL-2, BX-2, BX-3, se resembraron en los medios ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ISP-7 (ver Apéndice A). Se incubaron a 28°C por 21 días y pasado este tiempo se observaron y registraron sus características morfológicas macroscópicas. Las lecturas se realizaron a los 7, 14 y 21 días de crecimiento.

3.3 Determinación de isómeros del ácido diaminopimélico

Dos asas de biomasa fresca se suspendieron y homogenizaron en 500 μ L de ácido clorhídrico (HCl, J.T. Baker, México) 6N y 100 μ g de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, México), en un criovial limpio, seco y estéril. El criovial se agitó durante 5 minutos a velocidad máxima en un Vortex. Posteriormente los tubos se colocaron en un horno de convección a 100°C durante 4 horas y pasado este tiempo los tubos se retiraron del horno y se enfriaron a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 minutos. El líquido se transfirió a un tubo Eppendorf limpio, seco y estéril y se evaporó hasta sequedad en una parrilla de calentamiento (100°C). Se agregaron 500 μ L de agua destilada agitando suavemente el tubo. El líquido se evaporó nuevamente hasta sequedad y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 100 μ L de agua destilada para reconstituir los hidrolizados.

Los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP) fueron separados usando una placa de cromatografía en capa fina (TLC, del inglés). Se aplicó por separado 1 μ L de estándar y 3 μ L de cada muestra en la placa de TLC con la ayuda de una micropipeta (Gilson, Francia) conservando 1 cm entre muestra y muestra. La placa de TLC se reveló en un tanque con Metanol:Agua:HCl-6N:Piridina en una proporción 80:26:4:10 (v/v) durante 4 horas. Pasado este tiempo la placa se retiró del tanque y se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de extracción durante 15 minutos. Posteriormente la placa se roció con una solución de Ninhidrina (0.2%). La placa se seco durante 15 minutos y posteriormente se introdujo en un horno de convección a 100 °C durante 3 minutos. La placa se retiró del horno e inmediatamente los isómeros del ácido diaminopimélico se visualizaron comparándolos con aquellos del estándar.

3.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de las trece cepas más las dos de referencia, es decir, AB-1, AE-1, AI-1, AK-1, AL-1, AL-2, AN-1, AQ-1, AP-1, BB-1, BC-1, BX-2, BX-3, CNH-643^T y CNB-440^T en 27 fuentes de carbono. Las fuentes de carbono seleccionadas para este estudio y su clasificación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Fuentes de carbono seleccionadas para la caracterización fenotípica.

Fuente de carbono	Tipo	Fuente de carbono	Tipo
1. Ácido malónico	Ácido dicarboxílico	15.D(+)Manosa	Monosacárido
2. Adonitol	Monosacárido	16.D(+)Melezitosa	Trisacárido
3. D(-)Arabinosa	“	17.D(+)Melibiosa	Disacárido
4. Celobiosa	Disacárido	18.Pectina	Polímero
5. Celulosa	Polisacárido	19.D(+)Rafinosa	Trisacárido
6. Dextrano	“	20.L(+)Ramnosa	Monosacárido
7. D(-)Fructosa	Monosacárido	21.D(-)Ribosa	“
8. D(+)Galactosa	Monosacárido	22.D(-)Sorbitol	Poli-alcohol
9. Glicerol	Alcohol	23.Sucrosa	Disacárido
10. Glucosa	Monosacárido	24.D(+)Trehalosa	“
11.Inositol	Poliol	25.D(+)Turánosa	“
12.α-Lactosa	Disacárido	26.D(+)Xilitol	Poli-alcohol
13. D(+)Maltosa	“	27.D(+)Xilosa	Monosacárido
14.D(-)Manitol	Poli-alcohol		

Nota: Concentración final de las fuentes de carbono: 1%.

En conjunto con la prueba anterior se evaluó la capacidad de los aislados marinos y las dos cepas de referencia de crecer en trece diferentes fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno seleccionadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Fuentes de nitrógeno seleccionadas para el estudio.

Fuente de nitrógeno	Tipo	Fuente de nitrógeno	Tipo
1. L-Ácido aspártico	Ácido	8. L-Isoleucina	Alifático
2. L-Ácido glutámico	Ácido	9. L-Ornitina	Bibásico
3. Adenina	Base nitrogenada	10. L- Prolina	Alifático
4. L-Alanina	Alifático	11. L-Serina	Hidroxilado
5. L-Arginina	Básico	12. L-Triptofano	Aromático
6. L-Fenilalanina	Aromático	13. L-Valina	Alifático
7. L-Histidina	Básico		

Nota: Concentración final de las fuentes de nitrógeno: 0.1%.

Tanto las fuentes de carbono como las fuentes de nitrógeno fueron esterilizadas por medio de un proceso de tindalización, el cual se utiliza cuando las sustancias químicas no pueden calentarse por encima de los 100°C para evitar su modificación química. Las soluciones preparadas de las 27 fuentes de carbono y las 13 de nitrógeno se calentaron a 100°C durante 30 minutos por 3 días consecutivos. Para lo anterior se peso 1 g de las fuentes de carbono y 0.1 g de las fuentes de nitrógeno, respectivamente, ambas se disolvieron en 20 mL de agua bidestilada. El último día de la tindalización se preparó medio ISP-9 y medio basal (ver Apéndice A) tanto para las fuentes de carbono como para las de nitrógeno. Estos medios se prepararon y esterilizaron a 15 libras de presión, a 121 °C durante 15 minutos. Posterior a la esterilización los medios se dejaron enfriar aproximadamente a 45 °C, se agregó la fuente de carbono o nitrógeno (según fuera el caso) y finalmente se vertieron en cajas Petri de plástico estériles.

3.5 Cultivo de aislados marinos en fuentes de carbono y nitrógeno

Suspensiones de microorganismos marinos se prepararon a partir de biomasa fresca de AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3, AE-1, CNH-643^T y CNB-440^T. Dos asas de biomasa se agregaron a 1.3 mL de solución salina isotónica (SSI, 0.9%) contenida en crioviales esteriles de plástico de 2 ml de capacidad. Para las cepas AB-1, AP-1, AQ-1, BB-1 y BC-1, la biomasa se obtuvo a partir de medio líquido realizando tres lavados con SSI y centrifugando los tubos a 5,000 rpm por 5 minutos en cada lavado.

Las cajas Petri con agar ISP-9 y medio basal con cada una de las fuentes de carbono y nitrógeno se numeraron y etiquetaron de tal forma que se asegurara fuera posible inocular cinco microorganismos por caja (ver Figura 12). 7 µL de cada suspensión de microorganismos se inocularon en las respectivas cajas Petri. Estas placas se incubaron a 28°C por 21 días, revisando y registrando los resultados a los 7, 14 y 21 días de crecimiento.

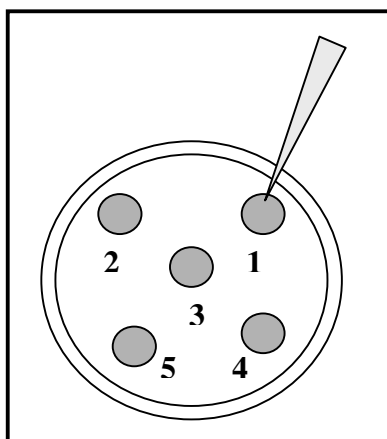


Figura 12. Método de inoculación.

3.6 Tolerancia de los aislados marinos en agua marina

La capacidad de las cepas para tolerar diferentes concentraciones de agua marina se evaluó preparando medio Bennett's modificado (ver Apéndice A) como medio basal y diferentes concentraciones de agua marina es decir, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 y 13.0%. Las cajas Petri se numeraron, etiquetaron, inocularon e incubaron a las mismas condiciones que se indicaron en el punto anterior. Los resultados de esta prueba se evaluaron de la misma forma que se menciona en el punto anterior.

3.7 Sensibilidad a diferentes antibióticos

La tolerancia de los aislados seleccionados y las dos cepas de referencia en diez diferentes antibióticos y 30 diferentes concentraciones se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Antibióticos seleccionados.

Antibióticos y concentraciones utilizadas	
1. Vancomicina (0.15 / 0.3/ 0.45)	6. Clortetraciclina (16 / 32/ 48)
2. Neomicina (4/ 8/ 12)	7. Kanamicina (5 / 10/ 15)
3. Penicilina G (7.5/ 15/ 22.5)	8. Eritromicina (16 / 32/ 48)
4. Ácido Nalidíxico (16/ 32/ 48)	9. Estreptomina (10 / 14/ 18)
5. Demeclociclina (16 / 32/ 48)	10. Rifampicina (0.2 / 0.4 / 0.6)

Nota: Concentración final de los antibióticos en µg/mL.

GYEA suplementado con los diferentes antibióticos y respectivas concentraciones se vertieron en cajas Petri. Las placas se numeraron, etiquetaron, inocularon e incubaron de la misma forma que se indicó en el punto 3.5. Los resultados de esta prueba se revisaron y registraron como se indicó en el punto 3.5.

3.8 Extracción de ADN de los aislados marinos

Para la extracción de ADN se realizó una extracción fenólica 1:1. Para ello se etiquetaron tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL con la clave de cada cepa. Se agregaron 100 µg de perlas de vidrio y 500 µL de Buffer Glucosa-Tris-EDTA (GTE; ver Apéndice B). Se transfirieron dos asas de biomasa fresca dentro de cada tubo. Los tubos se mantuvieron a 4°C durante 12 horas. Pasado este tiempo se agitaron constantemente durante 15 minutos en un Vórtex (DAIGGER, GENIE 3, USA). Posteriormente los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm en una centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, USA). El líquido se transfirió (300-400 µL aproximadamente) a un nuevo tubo Eppendorf limpio, seco y estéril y la biomasa y perlas de vidrio remanentes en el tubo original se eliminaron. Se adicionó el mismo volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (25:24:1; v/v) al líquido transferido, este tubo se mezcló en el Vortex a velocidad máxima por 5 segundos previo a una centrifugación a 14,000 rpm durante 12 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf limpio, seco y estéril (1.5mL), se adicionó etanol frío (100%) en una relación 2:1 (v/v) y cada tubo se invirtió tres veces suavemente. Los tubos se mantuvieron en refrigeración por 2 horas. Pasado este tiempo se centrifugaron 15 minutos a 14,500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 200 µL de etanol al 70% (esto repitió dos veces). Los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos y posteriormente el líquido remanente se decantó. Los tubos se secaron a temperatura ambiente invirtiéndolos sobre papel absorbente durante 12 horas. El ADN se reconstituyó con 100 µL de buffer TE 1X (Tris- EDTA, ver Apéndice B). La visualización del ADN se realizó por electroforesis horizontal como se describe en el siguiente punto.

3.9 Electroforesis horizontal

Se pesó 1 g de agarosa en una balanza analítica el cual se agregó a 100 mL de Buffer TBE 0.5X (ver Apéndice B) y se calentó hasta disolver en un horno de microondas. Se agrega 1 µL de Bromuro de Etidio, dejando enfriar durante 10 minutos y pasado este tiempo se vertió en una charola de plástico de electroforesis. La agarosa se dejó enfriar a temperatura ambiente en una campana de extracción hasta su completa gelificación.

2 µL de muestra de ADN junto con 2 µL de Buffer de corrida, se aplicó en cada uno de los pozos correspondientes del gel de agarosa agregando el marcador molecular (BioLine, EUA) inmediatamente después de la última muestra. Posteriormente la charola se colocó en una cámara de electroforesis la cual se programó a 100 Voltios por 35 minutos. Pasando este tiempo el ADN genómico se visualizó usando un transiluminador (Probiotek, México) y por medio de un fotodocumentador (Probiotek, México) la imagen se conservó en una memoria flash. La imagen del gel se transfirió a una computadora y posteriormente se imprimió.

3.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del PCR para el gen 16S rRNA se llevó a cabo utilizando los primers universales 27f [5'-AGAGTTTGATCMTTGGCTCAG-3'] y 1525r [5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'] (Lane, 1991). La mezcla de PCR de cada tubo se describe en la Tabla 4.

El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Eppendorf modelo Mastercycler ep y consistió en 35 ciclos de 95°C por 10 minutos ("hot-start", del inglés), 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto. El producto de PCR de cada muestra se examinó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% como se mencionó anteriormente.

Tabla 4. Mezcla de reacción para un tubo de PCR.

Reactivo	Volumen
Buffer NH ₄ (10X) (Bioline, EUA)	5 µL
MgCl ₂ (50mM) (Bioline, EUA)	1.5 µL
dNTP _s (10mM) (Bioline, EUA)	1.25 µL
Primer 1 (27f) (20mM)	0.5 µL
Primer 2 (1525r) (20mM)	0.5 µL
ADN	0.75 µL
<i>Taq</i> polimerasa (Bioline, EUA)	0.2 µL
H ₂ O	cbp 50µL

3.11 Secuenciamiento del producto de PCR

El producto de PCR se purificó directamente utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2 µg del producto de PCR purificado fue utilizado para cada reacción de secuenciamiento de acuerdo con la siguiente metodología: la secuenciación de los fragmentos de PCR fue llevado a cabo usando el ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq FS DNA Polymease (Applied Biosystems, EUA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los productos purificados del gen ribosomal 16S rRNA se analizaron y visualizaron a través de una electroforesis horizontal para asegurarse de tener las concentraciones adecuadas ADN por comparación con el movimiento molecular que tiene concentraciones conocidas. Los productos PCR se conservaron a -20°C hasta que fueron enviados para su secuenciamiento. El secuenciamiento se llevó a cabo por Macrogen en la República de Corea de acuerdo con la siguiente metodología: La secuenciación en ciclos de los fragmentos del 16S rRNA purificado fue llevado a cabo usando el ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits with AmpliTaq FS DNA Polymease (Applied Biosystems , EUA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuencia completa en longitud de todos los genes

del 16S rRNA fue determinada en ciclos separados de reacciones de secuenciamiento usando los oligonucleótidos que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados para el secuenciamiento del gen 16S rRNA.

Primers	Secuencia (5'→3') ^a	Tamaño	Sitios de unión ^b		Procedimiento ^c		Fuente
			5'	3'	PCR	Seq	
MG1f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	8	27	*		Lane, 1991
MG3f	CTACGGGRSGCAGCAG	16	342	357		*	Chun & Goodfellow, 1995
MG5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		*	Chun & Goodfellow, 1995
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	1544	1525	*		Lane, 1991

Fuente: Chun & Goodfellow, 1995.

^aDe acuerdo con Lane, 1991: M= A/C, S= C/G, W= A/T, Y= C/T.

^bNumeración de acuerdo al sistema de numeración de *Escherichia Coli*

^cPCR= primers utilizados en las amplificaciones del gen 16S rRNA, Seq= primers utilizados en el secuenciamiento en ciclos DyeDeoxy del gen 16S rRNA amplificado.

3.12 Análisis y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas después del secuenciamiento fueron visualizadas y editadas con el programa Chromas el cual permite observar el cromatograma con la secuencia resultante (extensión ABI). Posteriormente la secuencia fue importada en el programa Phydit el cual permite alinear en base a la estructura secundaria del gen ribosomal 16S rRNA.

Para la comparación de las secuencias obtenidas se recuperaron secuencias de actinomicetos a partir de la base de datos de libre acceso NCBI (National Center for Biotechnology Information, del inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estas secuencias se alinearon y compararon con aquellas obtenidas de los aislados de las muestras del Pacífico Mexicano y se construyeron los árboles filogenéticos con el programa TREECON (Van de Peer & DeWachter, 1994).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fuentes microbianas y características morfológicas macroscópicas

Se seleccionaron trece cepas aisladas a partir de muestras de sedimentos marinos del Océano Pacífico (Golfo de California), estos se cultivaron en tres diferentes medios de cultivo (GYEA, GYM e ISP-3), respectivamente. En las imágenes mostradas en esta página se pueden observar las características morfológicas macroscópicas de los aislados AE-1, AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2 y BX-3 miembros presuntivos del género *Streptomyces*.

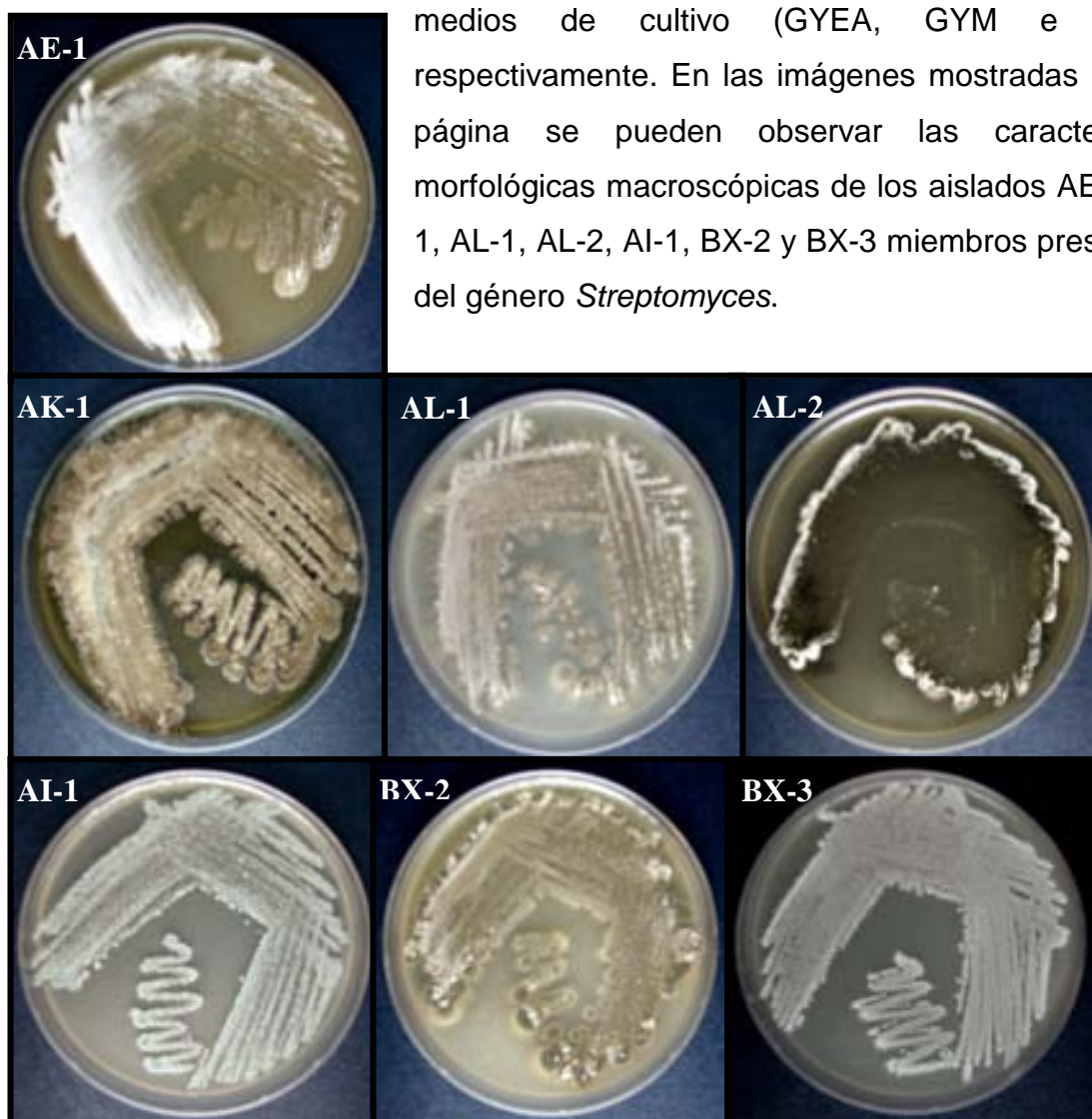


Figura 13. Microorganismos marinos asignados presuntivamente al género *Streptomyces*.

Los aislados fueron cultivados en ISP-3 preparado con agua marina artificial, incubados a 28 °C durante 14 días. Es evidente que cada aislado presenta diferentes características morfológicas macroscópicas, todos presentan micelio aéreo y algunos de ellos producen esporas. La caracterización macroscópica detallada de los aislados se desglosa en la Tabla 6.

Tabla 6. Características macroscópicas morfológicas de diferentes aislados en medios ISP.

Medios	AK-1	AL-1	AL-2	AI-1	BX-2	BX-3	AE-1
ISP2 (Agar extracto de levadura y extracto de malta)	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Beige	Micelio aéreo Beige	Micelio aéreo Amarillo pálido	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Amarillo pálido
	Micelio del sustrato Café oscuro	Micelio del sustrato Anaranjado	Micelio del sustrato Naranja	Micelio del sustrato Amarillo	Micelio del sustrato Café claro	Micelio del sustrato Anaranjado	Micelio del sustrato Amarillo claro
	Esporas Grises	Esporas Grises	Esporas Ninguna	Esporas Ninguna	Esporas Ninguna	Esporas Blancas	Esporas Ninguna
	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno
ISP3 (Agar avena)	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Gris	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Verde	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco
	Micelio del sustrato Verde/café	Micelio del sustrato Café	Micelio del sustrato Café	Micelio del sustrato Blanco	Micelio del sustrato Amarillo	Micelio del sustrato Blanco	Micelio del sustrato Amarillo
	Esporas Lilas	Esporas Blancas	Esporas Cafés	Esporas Blancas	Esporas Blancas	Esporas Blancas	Esporas Rosas
	Pigmento Verde	Pigmento Ninguno	Pigmento Anaranjado	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Amarillo
ISP4 (Agar almidón y sales inorgánicas)	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Verde claro	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Beige
	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Blanco	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Beige	Micelio del sustrato Beige
	Esporas Gris	Esporas Beige	Esporas Gris	Sin esporas	Esporas Blanca	Esporas Blanca	Sin esporas
	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno

Tabla 6. Continuación.....

Medio	AK-1	AL-1	AL-2	AI-1	BX-2	BX-3	AE-1
ISP5 (Agar glicerol- asparagina)	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Ninguno	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Ninguno
	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Ninguno	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Anaranjado	Micelio del sustrato Ninguno
	Esporas Gris	Esporas Beige	Esporas Gris	Sin Esporas	Esporas Verde militar	Esporas Beige	Sin esporas
	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno
ISP7 (Agar tirosina)	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Ninguno	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Blanco	Micelio aéreo Ninguno
	Micelio del sustrato Café oscuro	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Ninguno	Micelio del sustrato Amarillo pálido	Micelio del sustrato Café claro	Micelio del sustrato Ninguno
	Esporas Gris	Esporas Blanca	Esporas Gris	Sin esporas	Esporas Blanca	Sin esporas	Sin esporas
	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno	Pigmento Ninguno

En la Figura 14 podemos observar cepas cultivadas en medio GYM después de ocho semanas de incubación. Estos microorganismos corresponden a los códigos AB-1, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1 y BC-1. Es importante mencionar que estas presentaron un crecimiento más lento que aquellos aislados de la Figura 13 (género *Streptomyces*). Los aislados AB-1, AP-1, AQ-1 y AN-1 corresponden a microorganismos marinos estrictos, es decir, que solo crecen si el medio de cultivo (sólido o líquido) contiene agua marina en su formulación. Lo anterior indica que estos aislados probablemente pertenezcan al género *Salinispora* ya que es el único taxón que se conoce como estrictamente marino. Las cepas BB-1 y BC-1 no son

marinas estrictas ya que crecieron en medio GYM preparado únicamente con agua bidestilada y esto nos indica que pueden ser miembros de cualquiera de los 3 géneros de la familia *Micromonosporaceae* que han sido reportados en el ambiente acuático (Maldonado et al., 2005b).

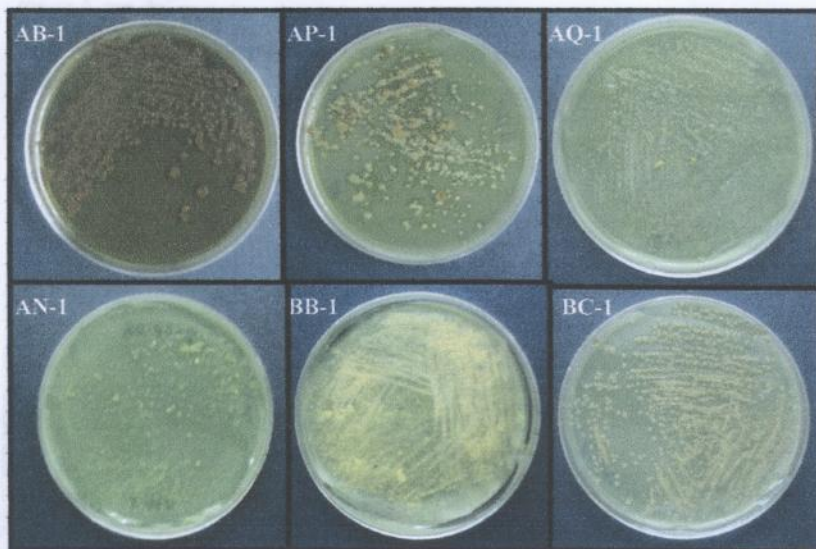


Figura 14. Aislados marinos después de ocho semanas de incubación, en medio GYM.

Se puede observar en esta figura que los aislados tienen un color anaranjado, de oscuro a pálido y no presentan formación de micelio aéreo. Lo anterior está en línea con la descripción de miembros de la familia *Micromonosporaceae*. Al menos después de ocho semanas de incubación estos aislados no han producidos esporas ya que las colonias no cambiaron de naranja a negro o café. Sin embargo, no podemos afirmar o descartar la posibilidad de que estos microorganismos produzcan esporas que nacen una a una, solas o en grupos en el micelio del sustrato.

4.2 Determinación de isómeros del ácido diaminopimérico

Las cepas AK-1, AL-1, AL-2, BX-2 y BX-3, presentaron una pared celular tipo I, caracterizadas por la presencia de ácido diaminopimérico de forma *LL-A₂pm*. Las cepas AE-1, AI-1, AB-1, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1 y BC-1 presentaron una pared celular tipo II, caracterizada por la presencia de ácido diaminopimérico de forma *meso-A₂pm* lo que los descarta de pertenecer al género *Streptomyces*. Estos resultados se muestran en la siguiente figura (Figura 15).

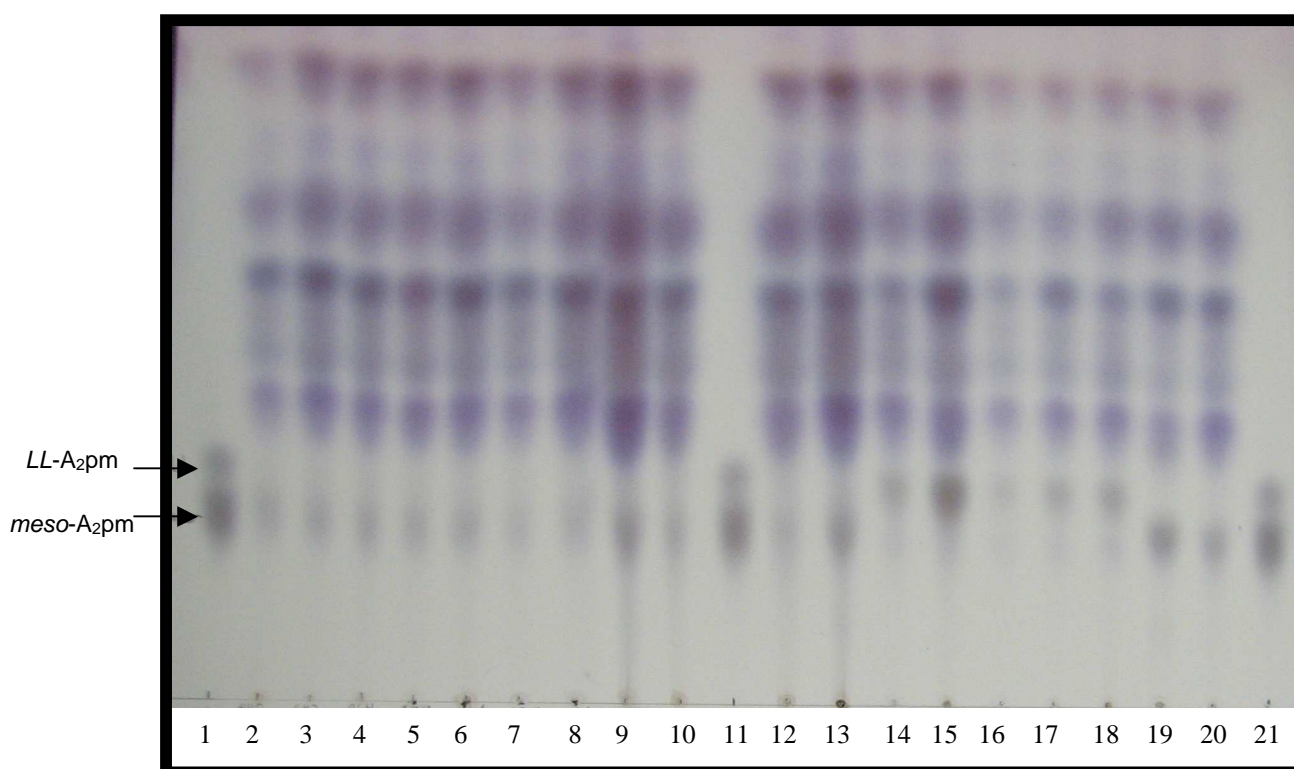


Figura 15. Visualización de isómeros del ácido diaminopimérico.

Nota: Estándar de DAP (1,11,21), cepa CNB-440^T (2), cepa CNH 643^T (3), AB-1 (5), AN-1 (6), AQ-1 (7), AP-1 (8), BB-1 (10), BC-1 (12), AK-1 (14), AL-1 (15), AL-2 (16), BX-2 (17), BX-3 (18), AE-1 (19) y AI-1 (20). Las flechas indican la presencia del ácido diaminopimérico *LL-A₂pm* y *meso-A₂pm*.

Cabe mencionar que las cepas AE-1 y AI-1 que fueron asignadas presuntivamente al género *Streptomyces* con base en sus características macro-morfológicas pero presentaron una pared celular tipo II (*meso-DAP*) fueron parcialmente enviadas a secuenciar (500 bp) de acuerdo al protocolo descrito en Maldonado *et al.* (2005b). De esta forma se encontró que éstos aislados pertenecían a los géneros *Saccharomonospora* y *Saccharopolyspora*, pero se les siguió estudiando como parte del grupo de los estreptomicetos para su caracterización fenotípica.

4.3 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de carbono

El crecimiento de las trece cepas con algunas de las fuentes de carbono utilizadas se muestra en la siguiente figura. Los platos se incubaron a 28°C durante 21 días registrando su crecimiento a los 7, 14 y 21 días.

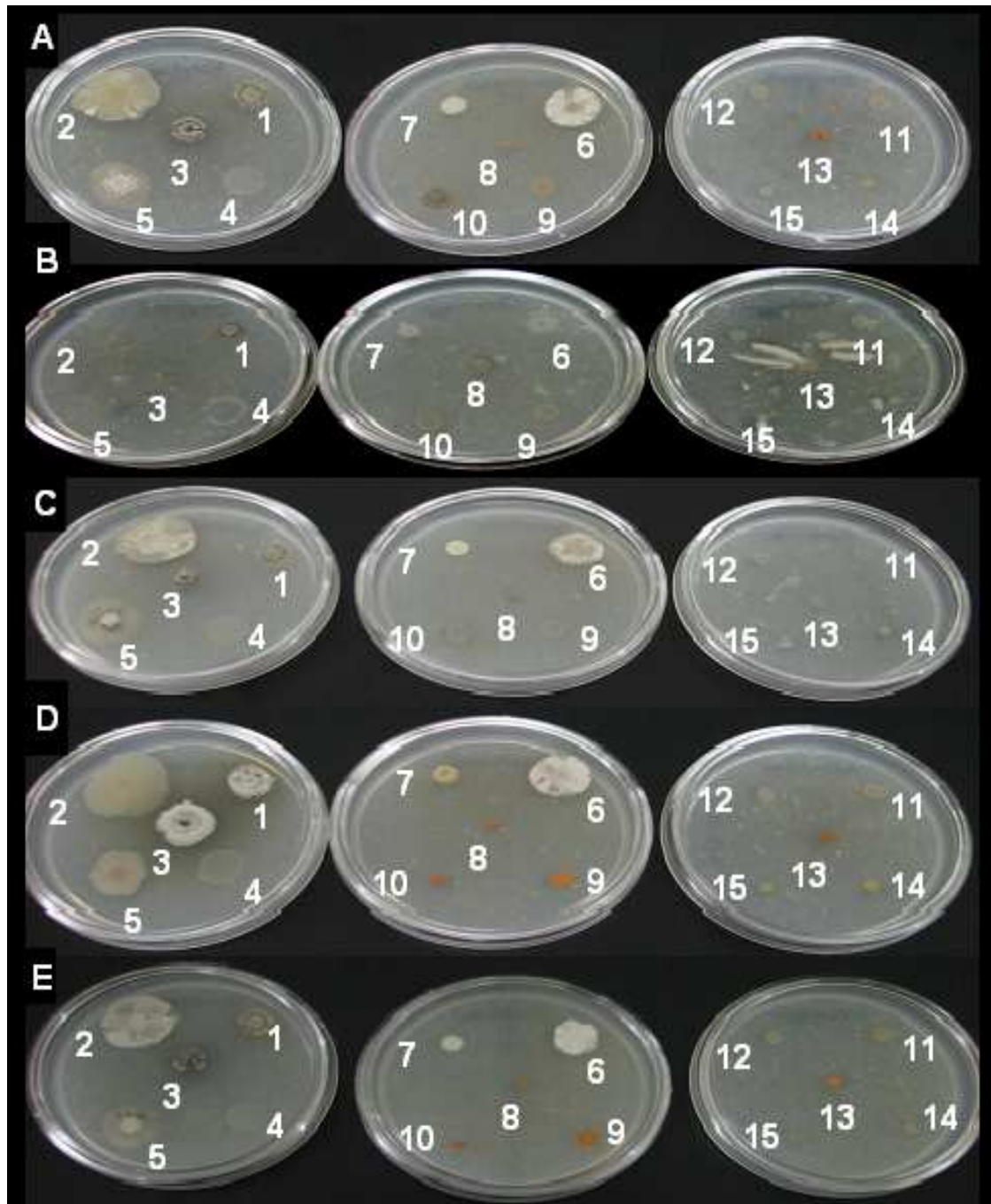


Figura 16. Medio ISP-9 con diferentes fuentes de carbono y los aislados marinos.

Nota: glucosa (A), dextran (B), galactosa (C), xelobiosa (D) y manosa (E), con las cepas AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

El análisis de las fuentes de carbono indica que los aislados crecen en un gran número de fuentes de carbono, es decir, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, polímeros, alcoholes, poli-alcoholes y polioles y su crecimiento en la mayoría de ellos es heterogéneo aunque hay tendencias claras que se discuten a continuación.

Únicamente siete de los trece aislados presentan un excelente crecimiento en las fuentes de carbono seleccionadas, esto es, AL-1 en fructosa; AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, en manitol; BX-3 y AE-1 en lactosa; AE-1 en maltosa; AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 en manitol; AK-1, AL-1 y AL-2 en trehalosa, BX-2 en turanosa y AK-1, AI-1 y BX-2 en xelobiosa. Este resultado es interesante ya que estos aislados pertenecen a los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* (microorganismos más relacionados al ambiente terrestre). En las fuentes de carbono antes mencionadas los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*" en que su hábitat ha sido reportado como 100% de origen marino su crecimiento mucho menor al observado con sus contrapartes terrestres, lo que nos permite claramente formar dos grupos para el uso de estas fuentes de carbono (Figuras 17, 18 y 19).

Para el segundo rango de crecimiento, identificado como "muy buen crecimiento", el comportamiento de los aislados fue el siguiente. AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 crecen en adonitol; AK-1, AL-1, AL-2 y BX-2 en arabinosa, celulosa, pectina y sucrosa; AK-1, AL-2, AI-1, BX-2 y AE-1 en fructosa. AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 en galactosa; AK-1, AL-2, AI-1, BX-3 y AE-1 en glicerol; AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 en glucosa (control positivo); AL-2, AI-1 y BX-2 en lactosa; AK-1, AL-1, AI-1, BX-2 y CNH-440 en maltosa; BX-3 en manitol; AK-1, AL-1, AI-1, BX-2 y AE-1 en manosa; AI-1 y BX-2 en melezitosa; AI-1 y BX-2 en melibiosa; AK-1, AL-1, AL-2 y BX-2 en pectina y AI-1 y AE-1 en rafinosa. Es muy interesante que nuevamente se formen dos grupos respecto a la capacidad de los aislados para utilizar estas fuentes de carbono. Lo anterior pone de manifiesto que los microorganismos identificados como miembros del género *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* presentan una capacidad para asimilar monosacáridos, disacáridos y trisacáridos principalmente, lo cual es evidentemente diferente para aquellos aislados marinos estrictos, del género *Salinispora* y aquellos de "*Solwaraspora*" que

al momento de escritura solamente han sido aislados de sedimentos marinos (Figuras 17, 18 y 19).

Para el tercer rango de crecimiento, “buen crecimiento”, los resultados fueron los más heterogéneos ya que no existe una separación evidente entre los aislados. Sin embargo es interesante observar nuevamente la capacidad de estos para crecer en una amplia gama de fuentes de carbono. AK-1, AL-1, CNH-643, AB-1, AP-1, AQ-1, y AN-1 en adonitol; AI-1, AE-1 y BC-1 en arabinosa; AI-1, AE-1, CNB-440, AB-1, AP-1, AQ-1, BB-1 y BC-1 en celulosa; AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, CNB-440 y AB-1 en dextran; BX-3, CNB-440, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1 y BC-1 en fructosa; AK-1, AL-2, BB-1 y BC-1 en galactosa; AL-1, BX-2, CNH-643, CNB-440, AB-1, AP-1 y AN-1 en glicerol; AK-1, AL-1, AI-1, BX-2, BB-1 y BC-1 en inositol; AK-1, AL-2, CNH-643, CNB-440, AB-1, AP-1, AQ-1, BB-1 y BC-1 en lactosa; AL-2 CNH-643, AB-1, AP-1, AQ-1 y AN-1 en maltosa; AL-2, CNB-440, AP-1, AQ-1 y AN-1 en manosa; AK-1, AL-1, AL-2, AE-1, AB-1, AP-1, AQ-1 y BB-1 y BC-1 en melezitosa; AK-1, AI-1, AL-2,

Respecto a los aislados marinos estrictos (*Salinispora*) y de origen marino (“*Solwaraspora*”) es interesante observar que existe diferencia en cuanto a su crecimiento en adonitol, galactosa, inositol y maltosa, lo cual nos permite separarlos en dos grupos. En adonitol las salinisporas tienen un mejor crecimiento y en galactosa es evidente que ocurre lo opuesto. En fructosa, glucosa, sorbitol, ribosa, trehalosa y xelobiosa tienen un crecimiento homogéneo y uno heterogéneo ocurre con glicerol, inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melezitosa, melibiosa, pectina, ramnosa, sucrosa, y xilosa.

Es muy interesante observar que algunos de los aislados marinos estrictos del género *Salinispora* y de origen marino “*Solwaraspora*” fueron capaces de crecer en ácido malónico lo que no se observó en ninguno de los aislados de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces*.

Es evidente por las fuentes de carbono utilizadas que la galactosa nos permite observar a los diferentes taxa identificados en el presente estudio. La glucosa (control positivo) nos permite en general observar los taxa más relacionados al

ecosistema terrestre y aquellos más relacionados al marino. Lo anterior ocurre de manera similar con la ribosa, turanosa, xelobiosa y xilitol, respectivamente.

Las diferentes fuentes de carbono utilizadas en la caracterización fenotípica nos muestran un claro panorama de la capacidad de los aislados marinos del Golfo de California objeto de estudio de este proyecto. Es evidente que la caracterización fenotípica es una herramienta valiosa para caracterizar microorganismos y proporciona información para en un futuro poder desarrollar estrategias de aislamiento selectivo sobre microorganismos marinos de taxa específicos.

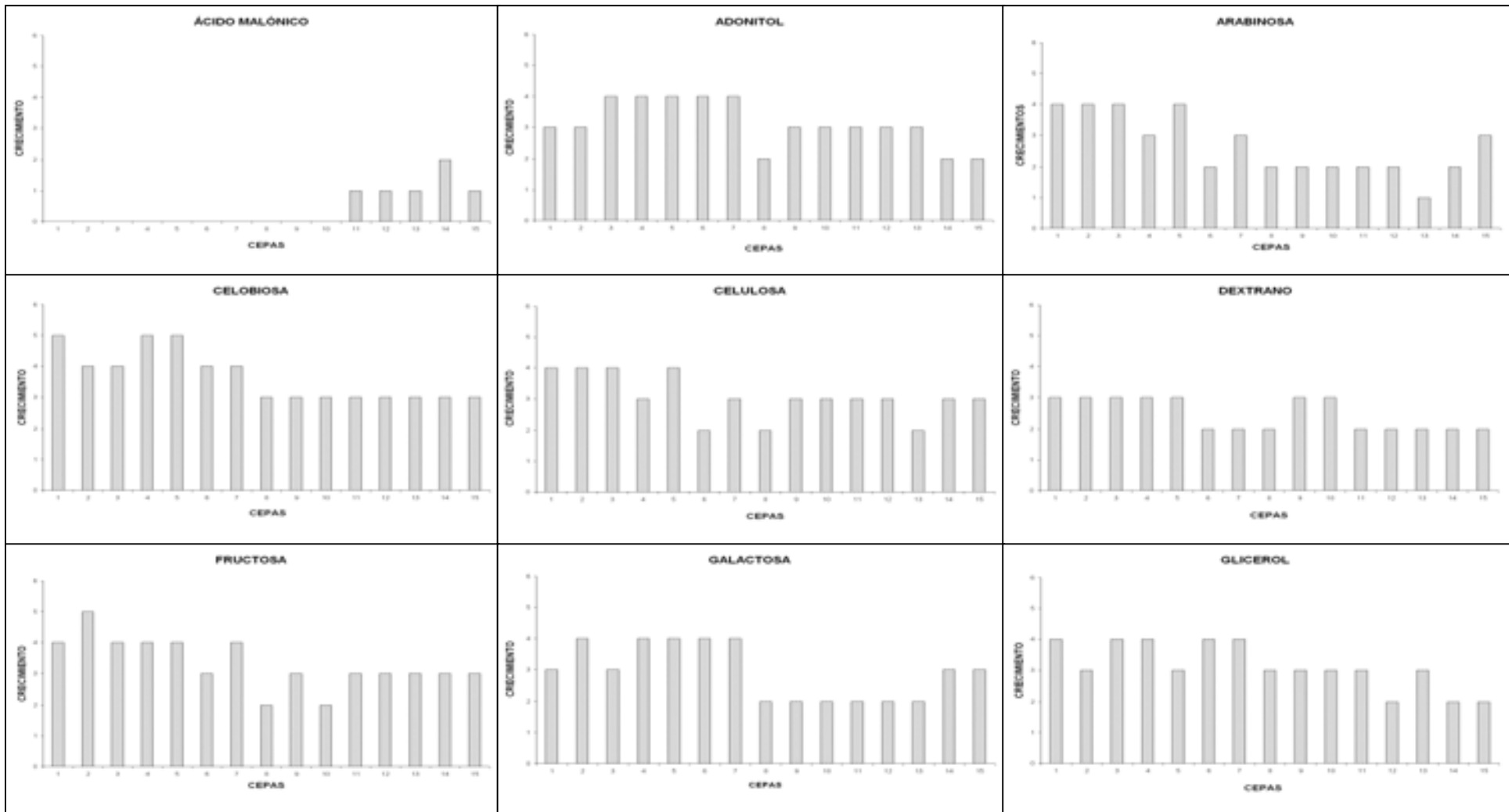


Figura 17. Crecimiento de los diferentes microorganismos en diferentes fuentes de carbono.

Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15) en diversas fuentes de carbono.

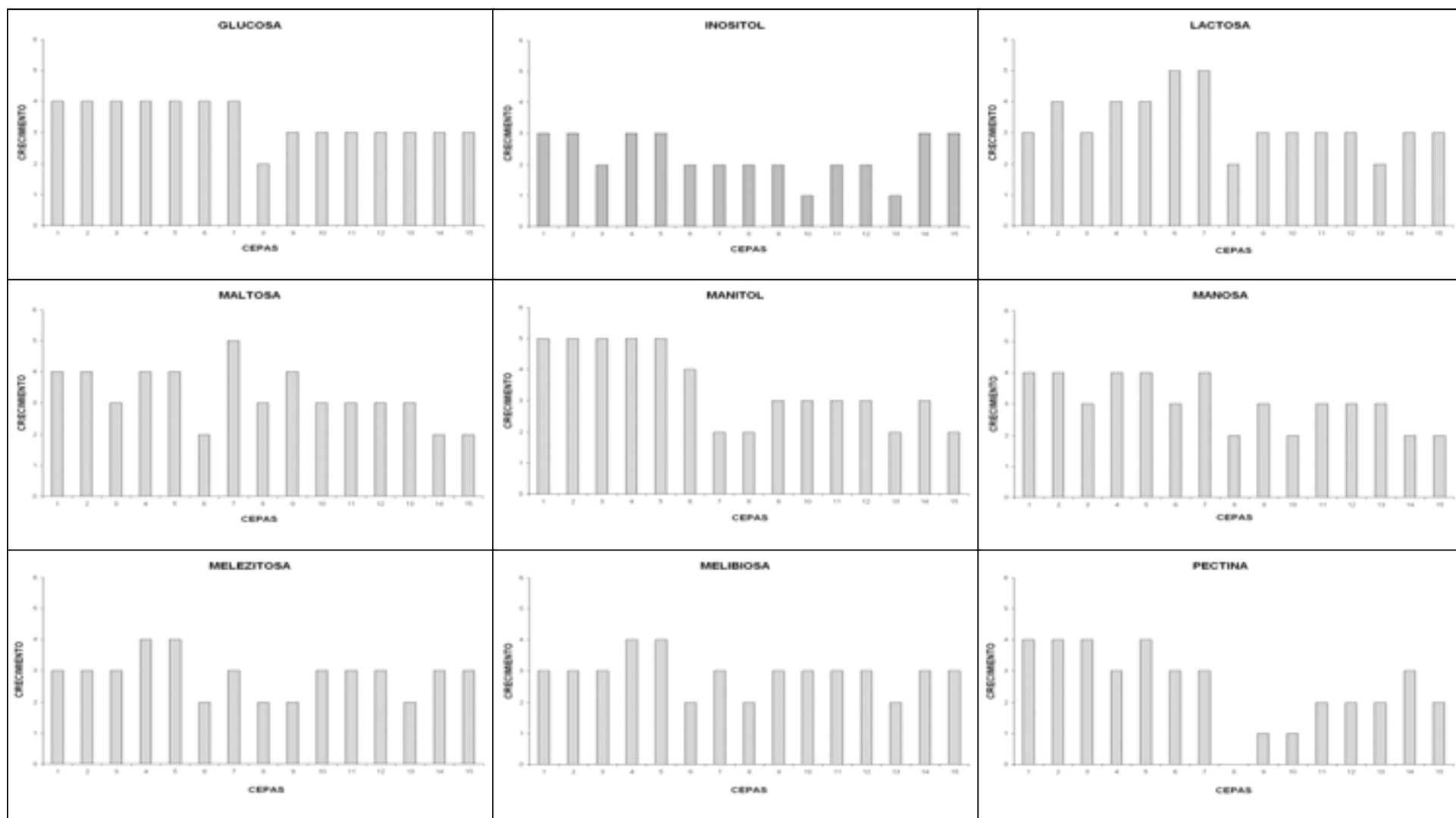


Figura 18. Continuación

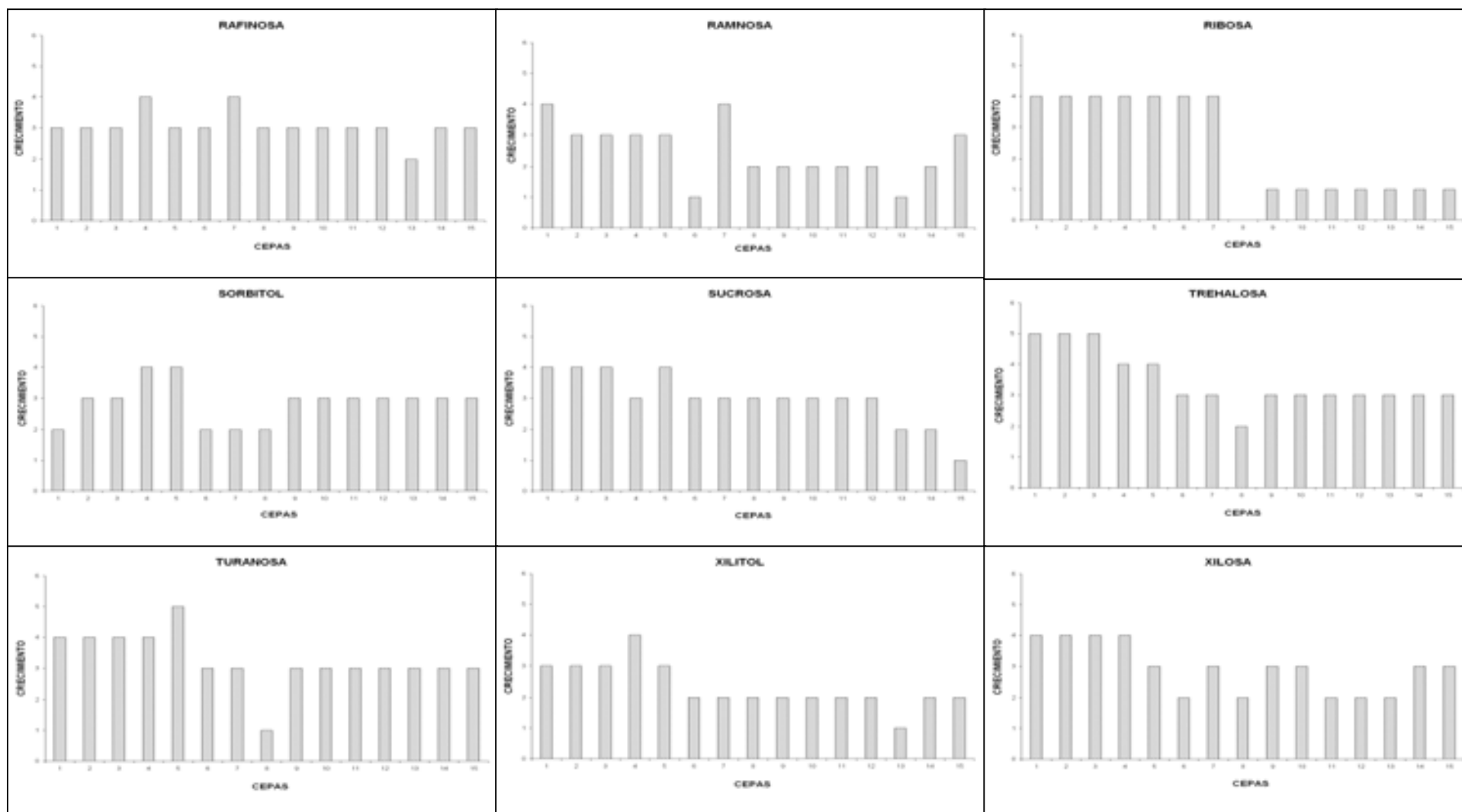


Figura 19. Continuación.....

4.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de nitrógeno

En la siguiente figura se muestra el crecimiento de las trece cepas con algunas de las fuentes de nitrógeno seleccionadas. Los platos se incubaron a 28°C durante 21 días registrándose el crecimiento a los 7, 14 y 21 días.

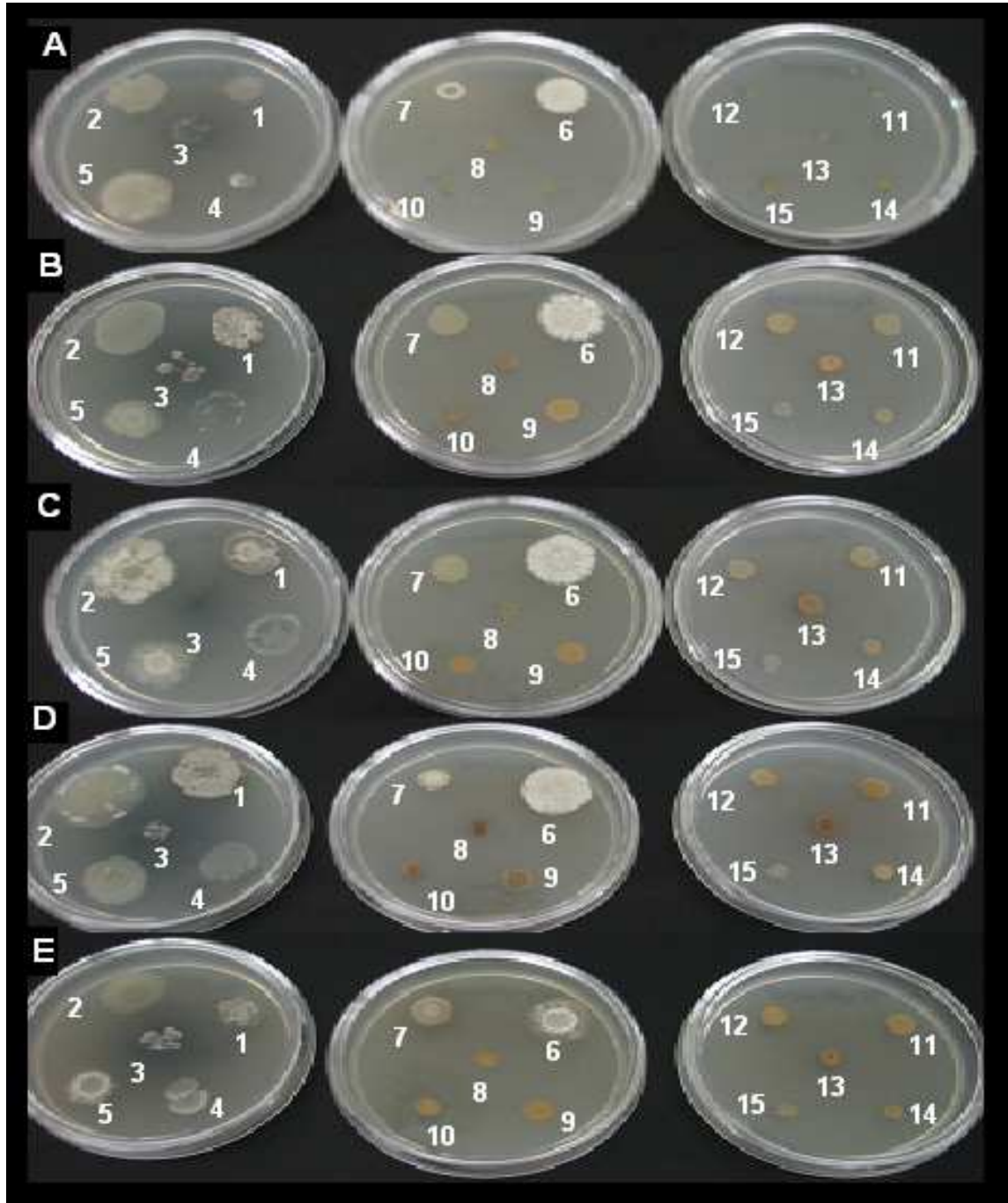


Figura 20. Medio basal más diferentes fuentes de nitrógeno y los microorganismos marinos. Nota: adenina (A), L-fenilalanina (B), L-isoleucina (C), L-prolina (D), L-serina (E) mostrando el crecimiento de las cepas AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

Observando las gráficas de las Figuras 21 y 22 y comparándolas con aquellas de las Figuras 17, 18 y 19 en general podemos observar que los microorganismos tienen un mejor crecimiento en las fuentes de nitrógeno que en las de carbono.

Los microorganismos AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 miembros de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces*, nuevamente se diferencian de CNH-643^T, CNB-440^T, AB-1, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1, BC-1, organismos de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*". Como observamos en la Figura 20 en presencia de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, ningún miembro de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* presenta crecimiento. Los microorganismos AB-1, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1, BC-1 presentaron un crecimiento aunque este se registró como muy pobre.

En presencia de L-alanina, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-ornitina, L-prolina y L-serina miembros de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* presenta un excelente crecimiento. Siendo para el género *Salinispora* uno registrado como muy bueno para L-alanina y L-histidina. Para L-fenilalanina, L-isoleucina, L-ornitina, L-prolina y L-serina ambos géneros (*Salinispora* y "*Solwaraspora*") presentaron un crecimiento registrado como bueno.

En presencia de adenina, en general el taxa *Streptomyces* presenta un buen crecimiento. AI-1, AE-1, BB-1 y BC-1 presentaron un crecimiento bajo y todas las cepas del género *Salinispora* un crecimiento muy bajo. Sin embargo es importante mencionar que a partir de esta gráfica se observa un claro comportamiento de organismos más relacionados al ambiente terrestre, aquellos más relacionados al ambiente marino y aquellos microorganismos marinos estrictos. La adenina es una base nitrogenada purica, que se encuentra formada por una ribosa, anteriormente observamos que la ribosa no es una fuente de carbono bien asimilada por los microorganismos *Salinispora* y "*Solwaraspora*" lo cual está muy en línea con estos resultados.

En L-alanina, L-isoleucina, L-prolina y L-valina, catalogados como aminoácidos alifáticos, los microorganismos de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*", presentan un buen crecimiento, la cepa CNB-440^T y AB-1 presentaron un mejor

crecimiento en presencia de L-alanina, la cepa CNH-643^T en L-prolina tuvo un crecimiento bajo. En cuanto a las cepas AI-1 y AE-1 presentaron un buen crecimiento, disminuyendo un poco el crecimiento AE-1 en presencia de L-valina y L-prolina.

En cuanto a los del género *Streptomyces* su crecimiento fue variado, AK-1 y AL-1 presentaron un excelente crecimiento en presencia de L-alanina, L-isoleucina y L-prolina, pero disminuyó en L-valina. La cepa BX-3 tuvo un excelente crecimiento en L-isoleucina, L-prolina y un buen crecimiento. AL-2 tubo un buen crecimiento en L-alanina, L-prolina, disminuyendo un poco en presencia de L-isoleucina y L-valina. BX-2 presentó un buen crecimiento en estos cuatro aminoácidos. Podemos observar que estas cepas tuvieron un mejor crecimiento en un aminoácidos alifáticos.

Miembros de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* presentaron un buen crecimiento en presencia de L-serina, mostrando AK-1, AL-1 y BX-3 un excelente crecimiento en este aminoácido. En cuanto a los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*" en general su crecimiento es bueno y mucho mejor en la cepa AN-1. Sin embargo la cepa CNH-643^T mostró un crecimiento bajo.

En presencia de L-arginina y L-histidina, aminoácidos catalogados como básicos, los microorganismos de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* presentaron un buen crecimiento y la cepa BX-3 presentó un excelente crecimiento en L-histidina. Los microorganismos del género "*Solwaraspora*" presentaron un crecimiento bueno en ambas fuentes de nitrógeno. Aquellos del género *Salinispora* un crecimiento bueno en presencia de L-arginina excepto CNH-643^T que presentó un bajo crecimiento. En L-histidina el crecimiento es variado, las cepas CNB-440^T y AB-1 aumentaron su crecimiento, para AP-1, AQ-1 es bajo y AN-1 presenta uno muy bajo. La cepa CNH-643^T no presentó crecimiento.

La L-ornitina como fuente de nitrógeno es muy bien asimilada por los microorganismos del género *Streptomyces*, todos presentaron un excelente crecimiento; las demás cepas presentan un buen crecimiento, excepto CNH-643^T que su crecimiento es pobre.

En L-fenilalanina y L-triptofano los géneros *Salinispora* y “*Solwaraspora*” tuvieron un buen crecimiento observando que en las cepas AP-1 y AQ-1 su crecimiento en presencia de L-triptofano se vio favorecido. En cuanto a los microorganismos de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* su crecimiento es bueno en presencia de L-fenilalanina, incluso en las cepas AK-1, AL-1 y BX-3 el crecimiento es excelente. En L-triptofano el crecimiento disminuyó en todos los casos, inclusive la cepa AK-1 presentó un crecimiento bajo, es posible que el L-triptofano al contar con una estructura química más compleja sea más difícil de asimilar por estos microorganismos.

En general observamos que los microorganismos miembros de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, presentan un mejor crecimiento en aminoácidos alifáticos y básicos. Para el género *Salinispora* se presentó un mejor crecimiento en aminoácidos alifáticos y aromáticos. Para el género “*Solwaraspora*” tiene un mejor crecimiento en presencia de aminoácidos alifáticos, aromáticos y básicos.

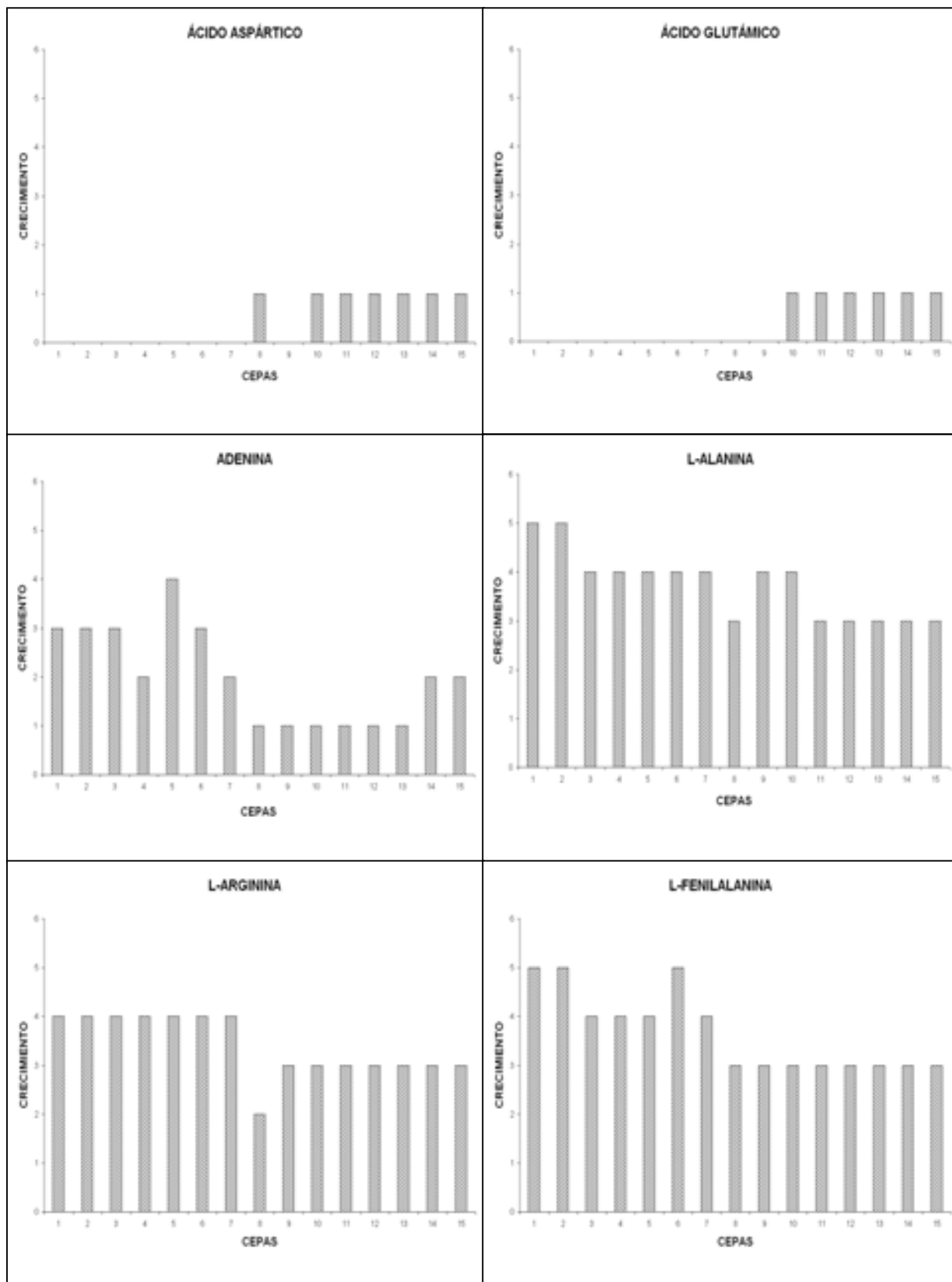


Figura 21. Diversas fuentes de nitrógeno y crecimiento de los microorganismos marinos.
 Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

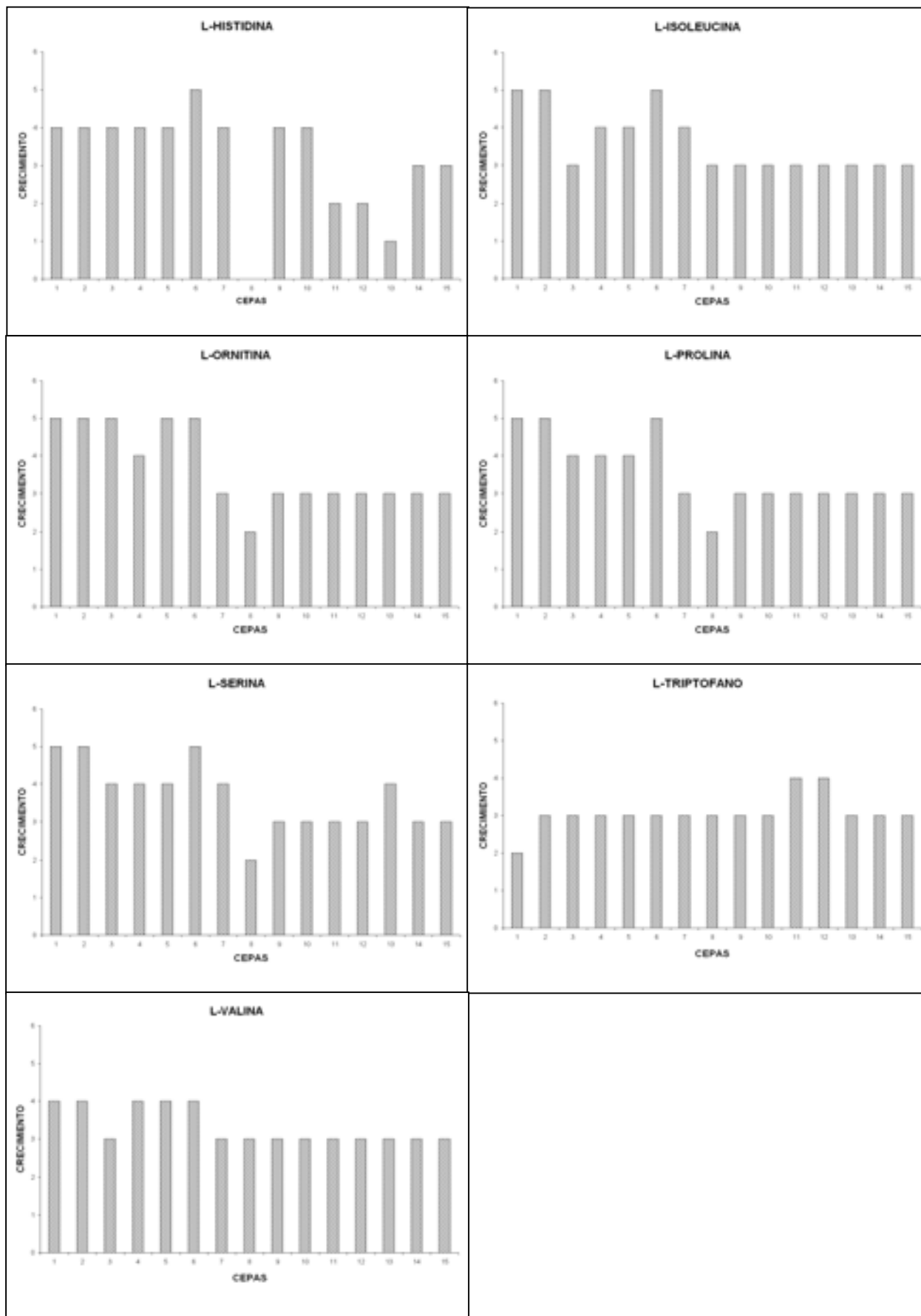


Figura 22. Continuación

4.5 Crecimiento a diferentes concentraciones de agua marina

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de agua marina artificial de las trece cepas y las dos de referencia. Los platos se incubaron a 28°C durante 21 días registrándose el crecimiento a los 7, 14 y 21 días. Podemos observar el crecimiento de las cepas en los diferentes concentraciones en las figuras de esta página y la Figura 25.

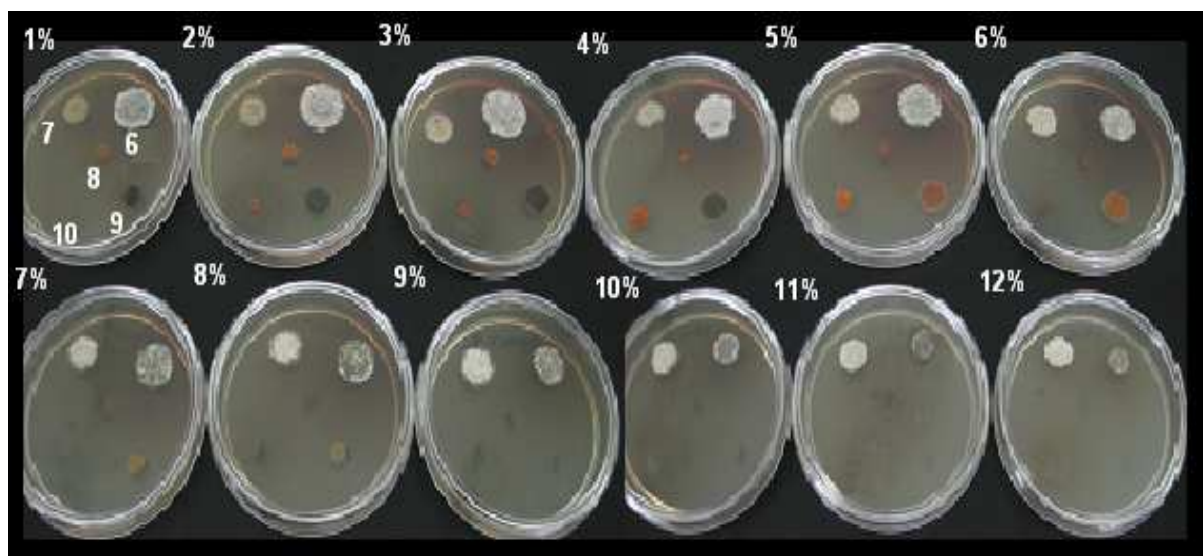
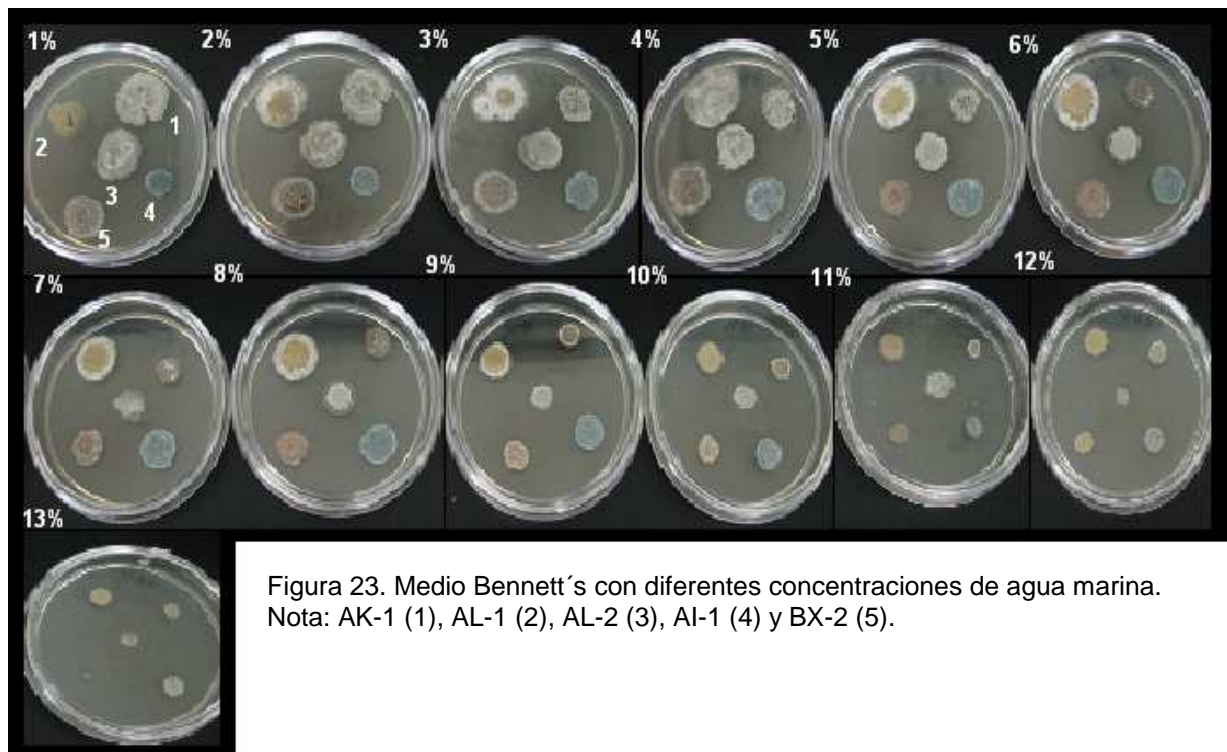




Figura 25. Medio Bennett's con diferentes concentraciones de agua marina.
Nota: AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

Podemos observar en las Figuras 26 y 27 que AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3 y AE-1 miembros de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces*, presentan un crecimiento óptimo a concentraciones de agua marina entre 2 y 4%. En 7% presentan crecimiento pero este disminuye, siendo evidente que comienza una dificultad para crecer. Sin embargo es evidente que hasta una concentración de 12% de estos microorganismos crecen y a 13% únicamente AL-1, AL-2, AI-1, BX-3 y AE-1 tienen capacidad de crecer aunque este es poco. Es interesante observar que estos microorganismos más relacionados al ambiente terrestre tenga la capacidad de tolerar concentraciones tan elevadas de agua marina y los que son marinos estrictos o más relacionados al ambiente marino no tengan la capacidad de crecer después de 8%.

Los microorganismos CNH-643^T, CNB-440^T, AB-1, AP-1, AQ-1, AN-1, BB-1, BC-1, de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*", que han sido reportados como marinos estrictos o exclusivamente del ambiente marino, respectivamente muestran un rango menos amplio en su crecimiento respecto a su tolerancia de sal marina. Aquellos del género "*Solwaraspora*" tienen un crecimiento óptimo al 1% de concentración de agua marina. Presentan crecimiento a 3% de agua marina pero este es menor. Las cepas del género *Salinispora* tienen un crecimiento óptimo entre 3 y 4% de agua marina lo cual es evidente estas han sido reportadas como microorganismos marinos estrictos. Después de 7% no presentan crecimiento, lo que es interesante ya que indica que su rango de tolerancia es mucho menor que los otros aislados.

Los aislados del género “*Solwaraspora*” en un medio sin presencia de agua marina presenta un mejor crecimiento y aquellos del género *Salinispora* no tuvieron crecimiento. Lo anterior está en línea con lo reportado por Maldonado *et al.* (2005a), Magarvey *et al.* (2004) y Mincer *et al.* (2002). En general ninguno de estos aislados presenta un crecimiento apropiado arriba de una concentración de 7% de agua marina.

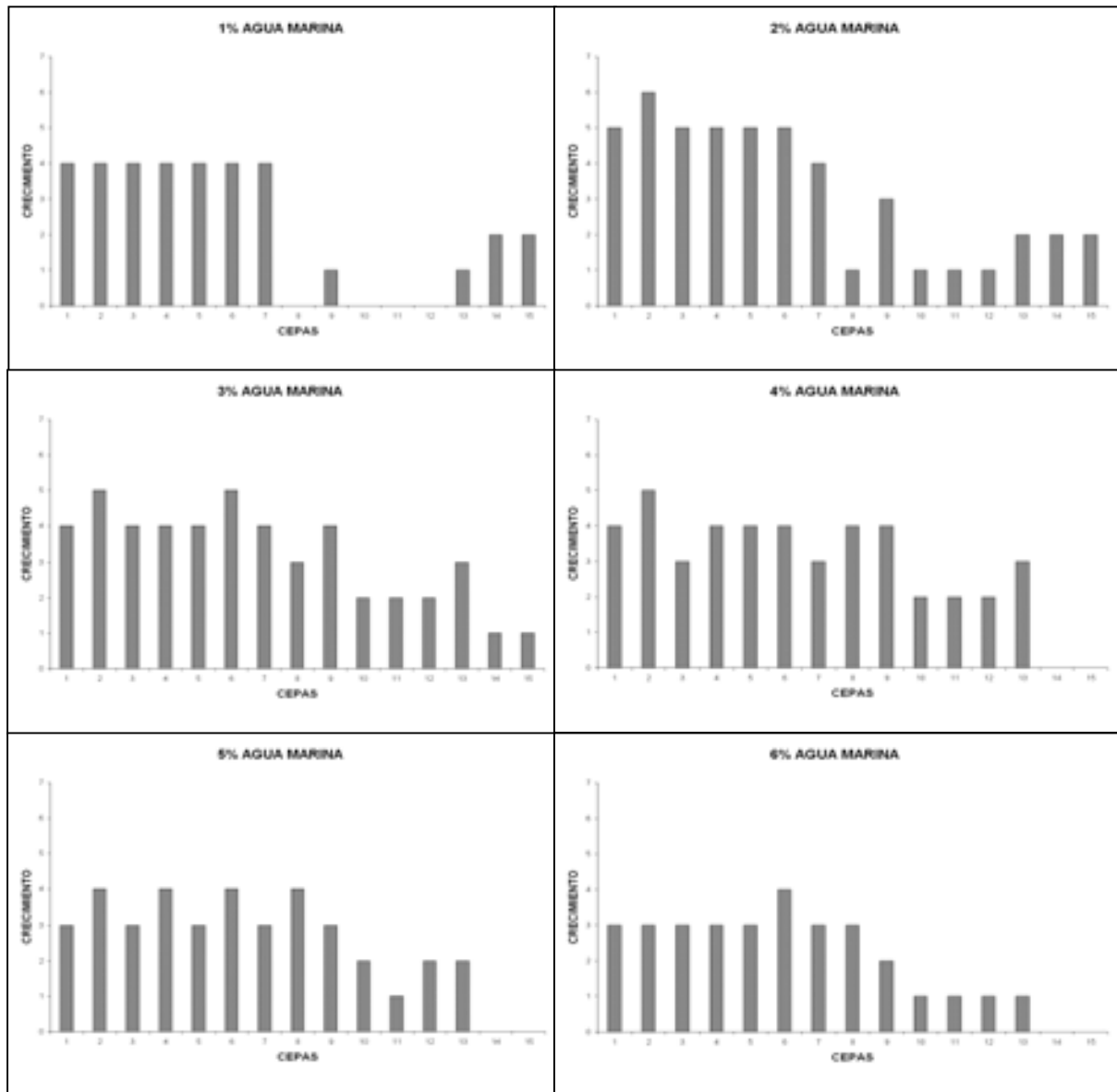


Figura 26. Crecimiento de los aislados marinos en diferentes concentraciones de agua marina.
 Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

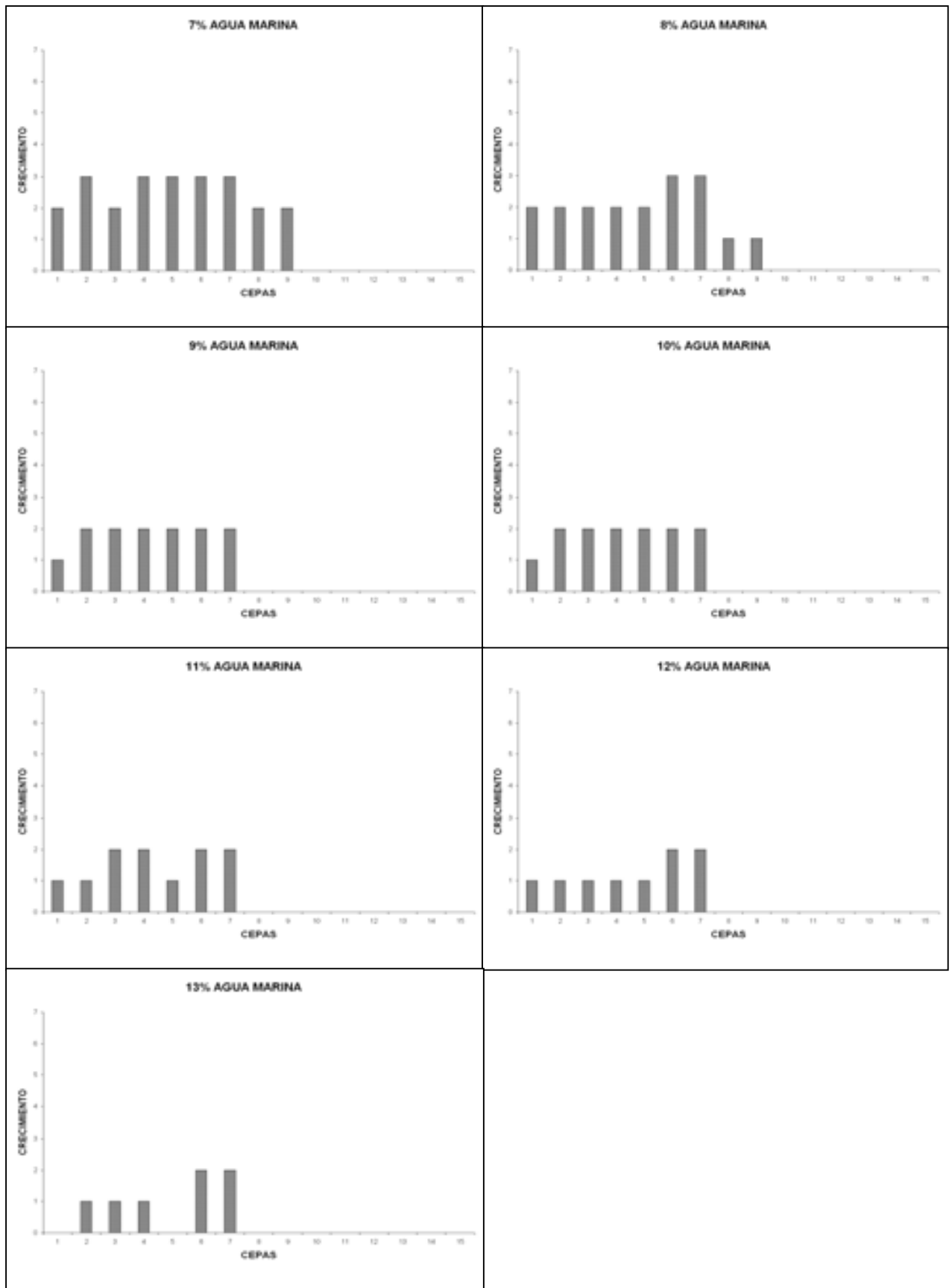


Figura 27. Continuación.....

4.6 Sensibilidad a diferentes antibióticos

En las siguientes figuras se muestran algunas de las pruebas de sensibilidad de algunos antibióticos aplicados a diez de los trece aislados marinos y a las dos cepas tipo. Los platos se incubaron a 28°C durante 21 días registrándose el crecimiento a los 7, 14 y 21 días.



Figura 28. GYEA más ácido nalidíxico $\mu\text{g/mL}$ a 16 (A), 32 (B) y 48 (C).
Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9) y AB-1 (10).



Figura 29. GYEA más clortetraciclina $\mu\text{g/mL}$ a 16 (A), 32 (B) y 48 (C).
Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9) y AB-1 (10).

Es evidente por nuestros resultados y las gráficas de las Figuras 30 y 31 que el género "*Solwaraspora*" es sensible a todos los antibióticos y concentraciones utilizadas. En ninguno de los diez antibióticos y sus respectivas concentraciones los miembros de este género presentaron crecimiento.

Respecto al género *Salinispora* este es sensible a clortetraciclina, demeclociclina, eritromicina, estreptomina, neomicina y penicilina G en las tres concentraciones utilizadas. En contraste este género resiste ácido nalidíxico, kanamicina, rifampicina y vancomicina al menos en dos de las tres concentraciones. El mejor crecimiento de estos microorganismos se presenta en vancomicina después en ácido nalidíxico y finalmente en rifampicina.

Para los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* prácticamente en todos los antibióticos utilizados hay crecimiento. En demeclociclina y eritromicina este es heterogéneo sin embargo en ácido nalidíxico, clortetraciclina, eritromicina, estreptomina, kanamicina, neomicina, penicilina G, rifampicina y vancomicina su crecimiento es en general de manera homogénea.

Es interesante observar que en ácido nalidíxico y rifampicina hay una clara tendencia en cuanto al crecimiento de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* respecto a aquellos de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*". Los primeros más relacionados con microorganismos terrestres a diferencia de los segundos los cuales han sido reportados únicamente en el ambiente marino.

Es evidente por nuestros resultados que los antibióticos utilizados nos proporcionaron suficiente información para la caracterización fenotípica de los aislados marinos del Golfo de California así como para determinar cuáles de ellos sería interesante incluir en estudios futuros para el aislamiento de taxa específicos.

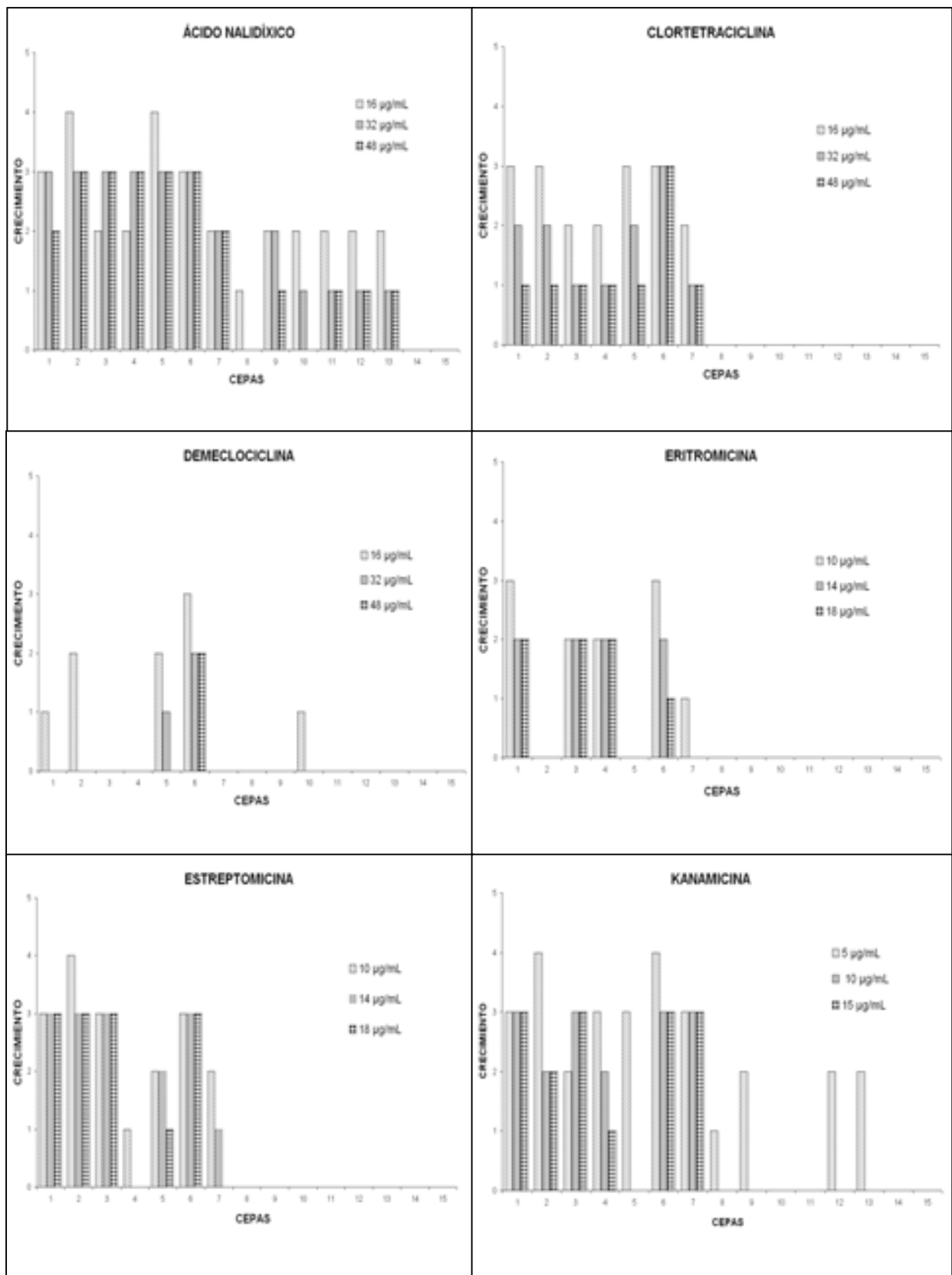


Figura 30. Sensibilidad a diferentes antibióticos de los microorganismos marinos.
 Nota: AK-1 (1), AL-1 (2), AL-2 (3), AI-1 (4), BX-2 (5), BX-3 (6), AE-1 (7), CNH-643^T (8), CNB-440^T (9), AB-1 (10), AP-1 (11), AQ-1 (12), AN-1 (13), BB-1 (14) y BC-1 (15).

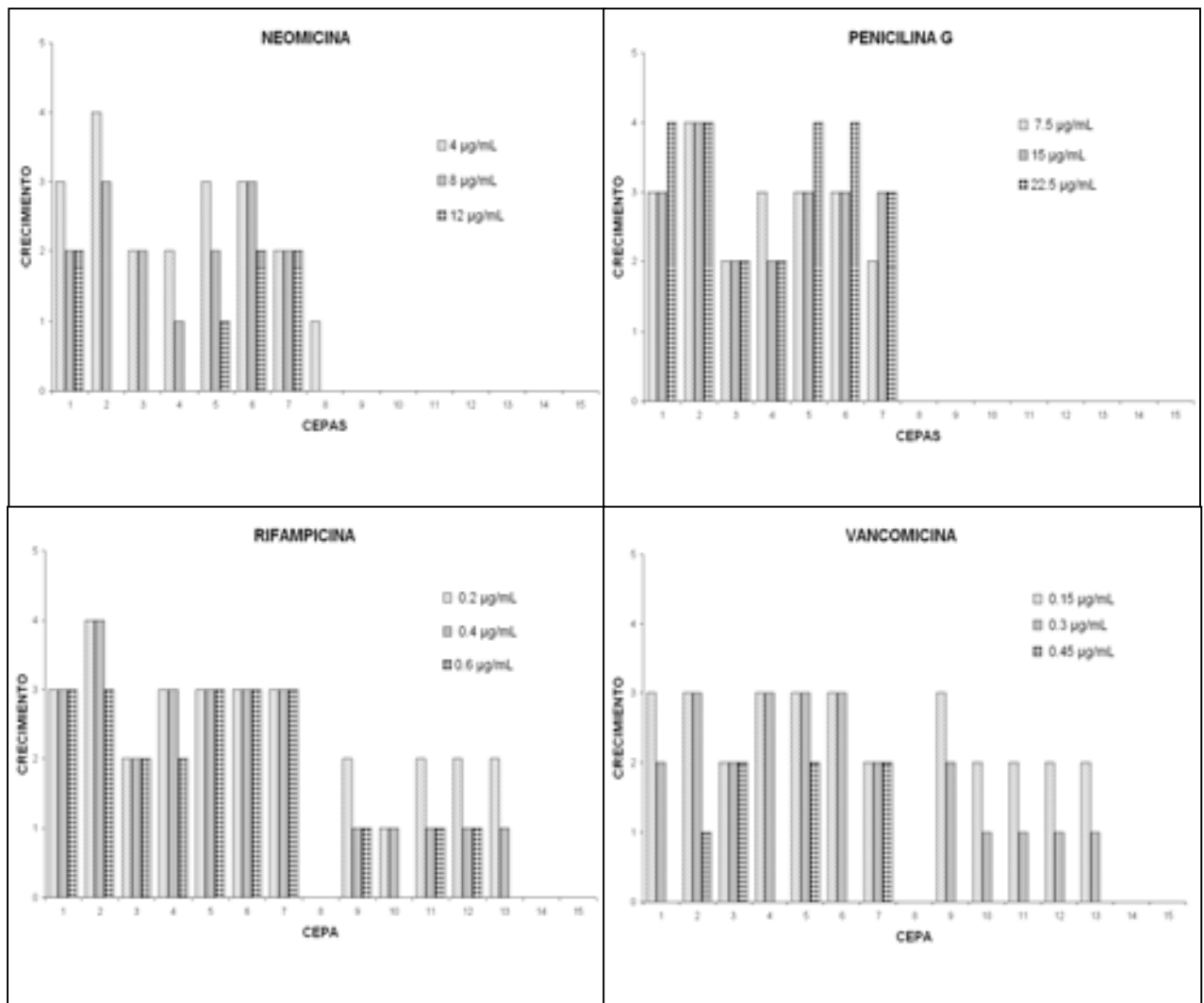


Figura 31. Continuación.....

4.7 Estudio molecular y construcción de árboles filogenéticos

El material genético de los trece aislados y de las dos cepas de referencia se extrajo con éxito. La electroforesis en gel de agarosa (1%) se muestra en la Figura 32. La amplificación del material genético por PCR se muestra en la Figura 33.

La secuencia del gen 16S rRNA de cada uno de los trece aislados (AK-1, AL-1, AL-2, AI-1, BX-2, BX-3, AE-1, AB-1, AN-1, AP-1, AQ-1, BB-1 y BC-1) se comparó con aquellas depositadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El resultado de la comparación nos indicó que los aislados corresponden a miembros de los géneros: AK-1, AL-1, AL-2, BX-2 y BX-3 a *Streptomyces*, AI-1 a *Saccharopolyspora*, AE-1 a *Saccharomonospora*, AB-1, AN-1, AP-1, AQ-1 a *Salinispora* y BB-1 y BC-1 a “*Solwaraspora*”.

Los árboles filogenéticos se construyeron basados en el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987) previo a un alineamiento manual de las secuencias recuperadas del NCBI y los respectivos aislados. Las posiciones filogenéticas se muestran en las Figuras 34, 35, 36, 37 y 38, respectivamente. Es evidente que AI-1, AE-1, BB-1 y BC-1, AN-1 y AP-1, AL-1, BX-2 y AK-1 representan nuevos núcleos de variación taxonómica en los géneros *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Salinispora* y “*Solwaraspora*”. Nuestros resultados demuestran la alta diversidad microbiana de los ecosistemas marinos nacionales que está presente y que aún hay por descubrir.

Por otra parte, estos resultados fortalecen la idea de que los ecosistemas marinos no se limitan únicamente al subgrupo *Micromonospora-Rhodococcus-Streptomyces* ya que nuevas especies microbianas de actinomicetos estrictamente marinos fueron aisladas de sedimentos marinos nacionales, *Salinispora*, así como especies del género “*Solwaraspora*” que únicamente habían reportadas en muestras sedimentos de Papa Nueva Guinea y finalmente una especie del género *Saccharomonospora* que representa el primer reporte de su tipo de ambientes marinos nacionales.

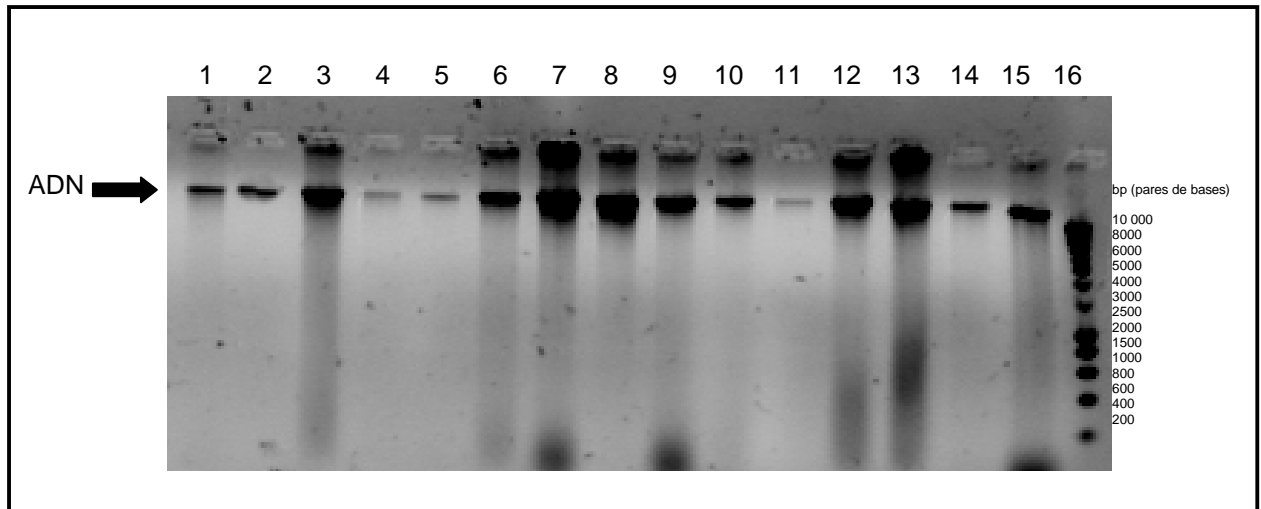


Figura 32. ADN extraído de los aislados del Golfo de California en gel de agarosa al 1%.
 Nota: CNB-440^T (1), cepa CNH 643^T (1), AB-1 (3), AN-1 (4), AQ-1 (4), AP-1 (6), BB-1 (7),
 BC-1 (8), AK-1 (9), AL-1 (10), AL-2 (11), BX-2 (12), BX-3 (13), AE-1 (14), AI-1 (15) y M,
 (marcador molecular, 16).

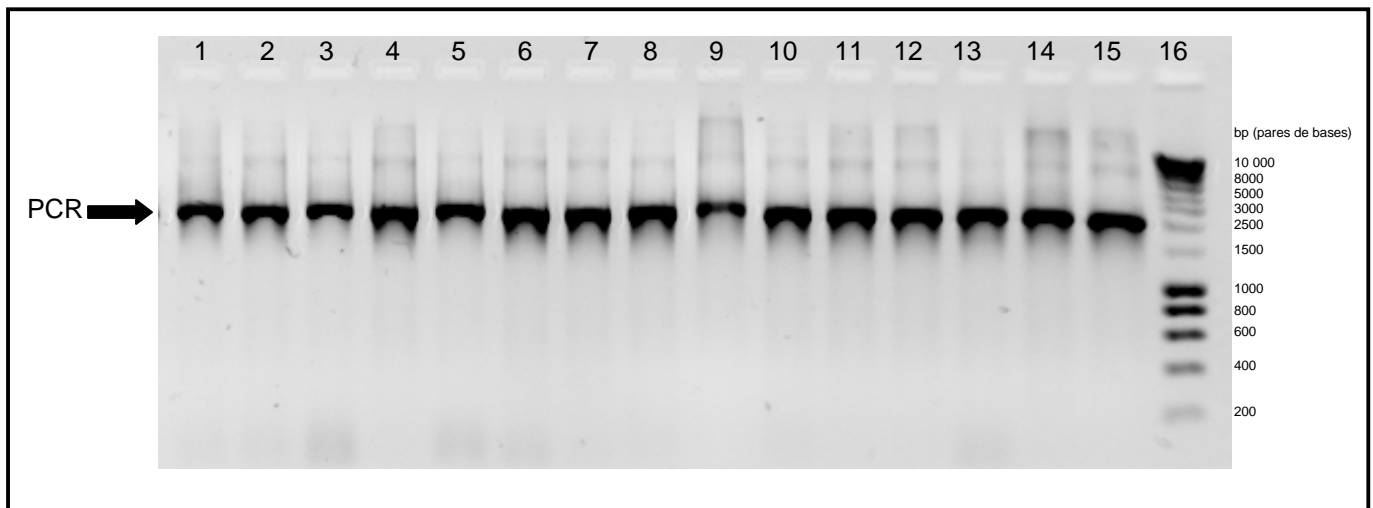


Figura 33. Productos de PCR del gen 16S rRNA de los aislados marinos.
 Nota: CNB-440^T (1), cepa CNH 643^T (2), AB-1 (3), AN-1 (4), AQ-1 (5), AP-1 (6), BB-1 (7),
 BC-1 (8), AK-1 (9), AL-1 (10), AL-2 (11), BX-2 (12), BX-3 (13), AE-1 (14), AI-1 (15) y M,
 (marcador molecular, 16).

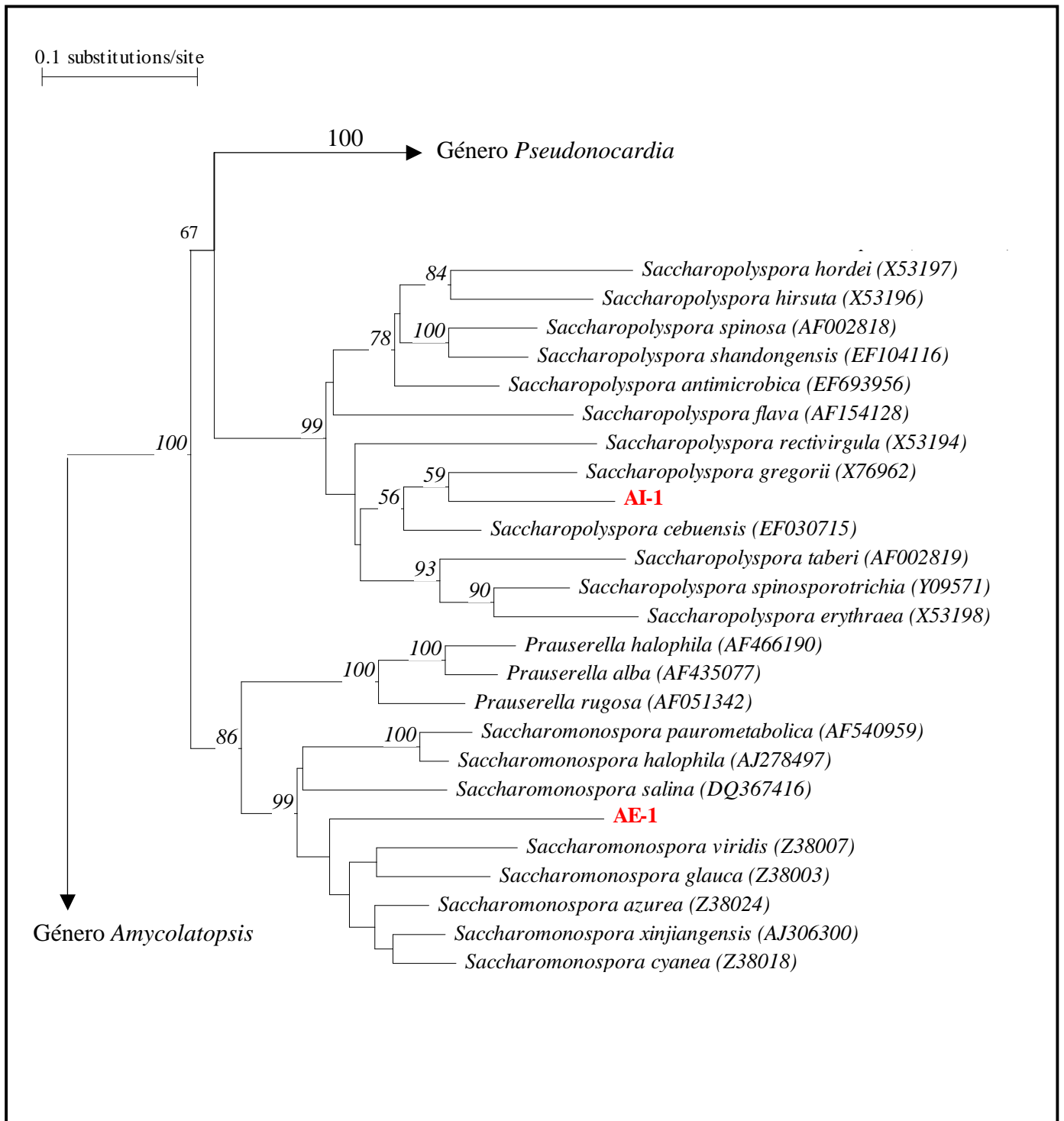


Figura 34. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen 16S rRNA de actinomicetos aislados de Golfo de California (cepa AI-1 y AE-1) y las especies validamente descritas de la familia *Pseudonocardiaceae*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

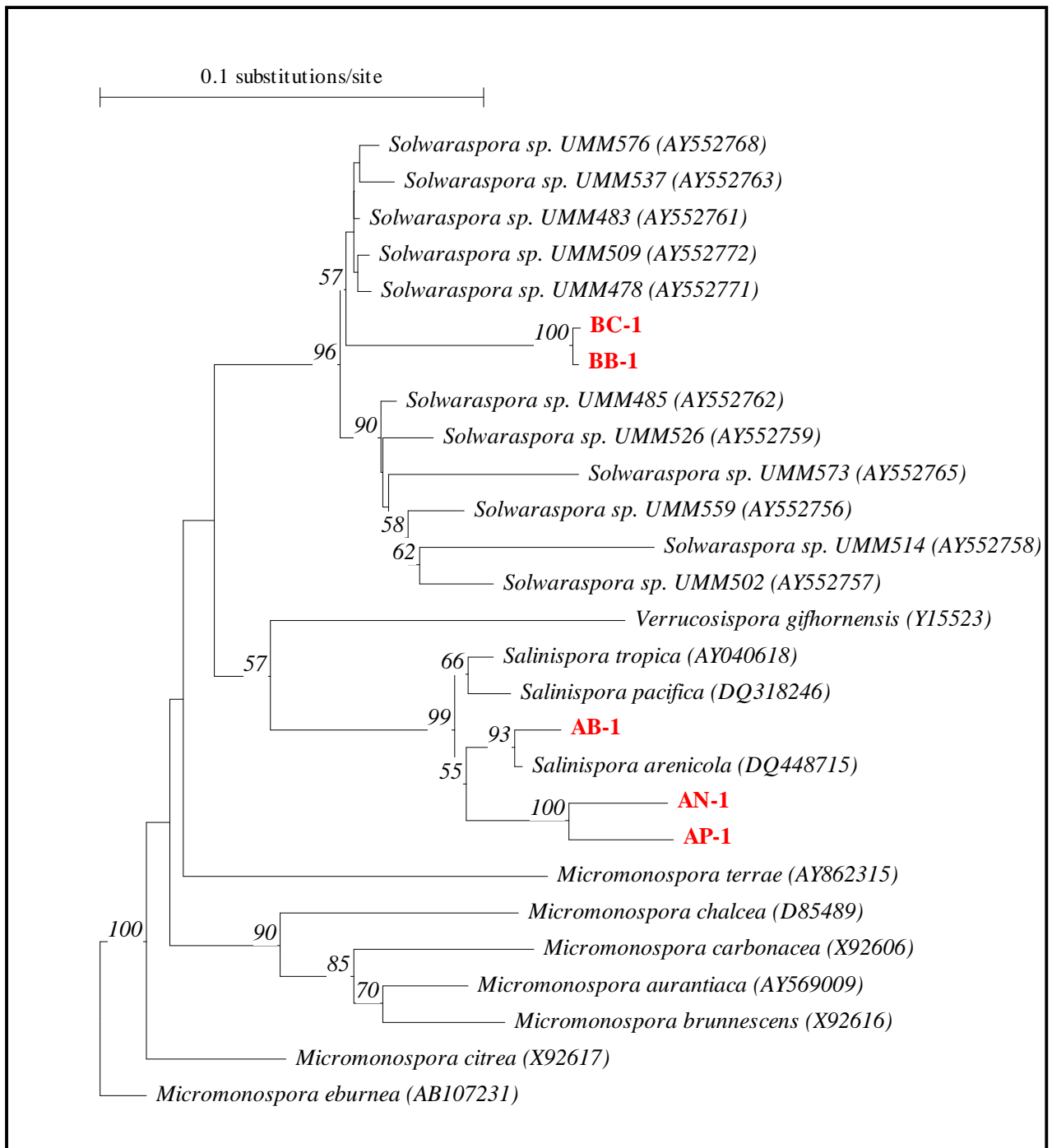


Figura 35. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen 16S rRNA de actinomicetos aislados de Golfo de California (cepa AB-1, AN-1, AP-1, BC-1 y BB-1) y las especies validamente descritas de la familia *Micromonosporae*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

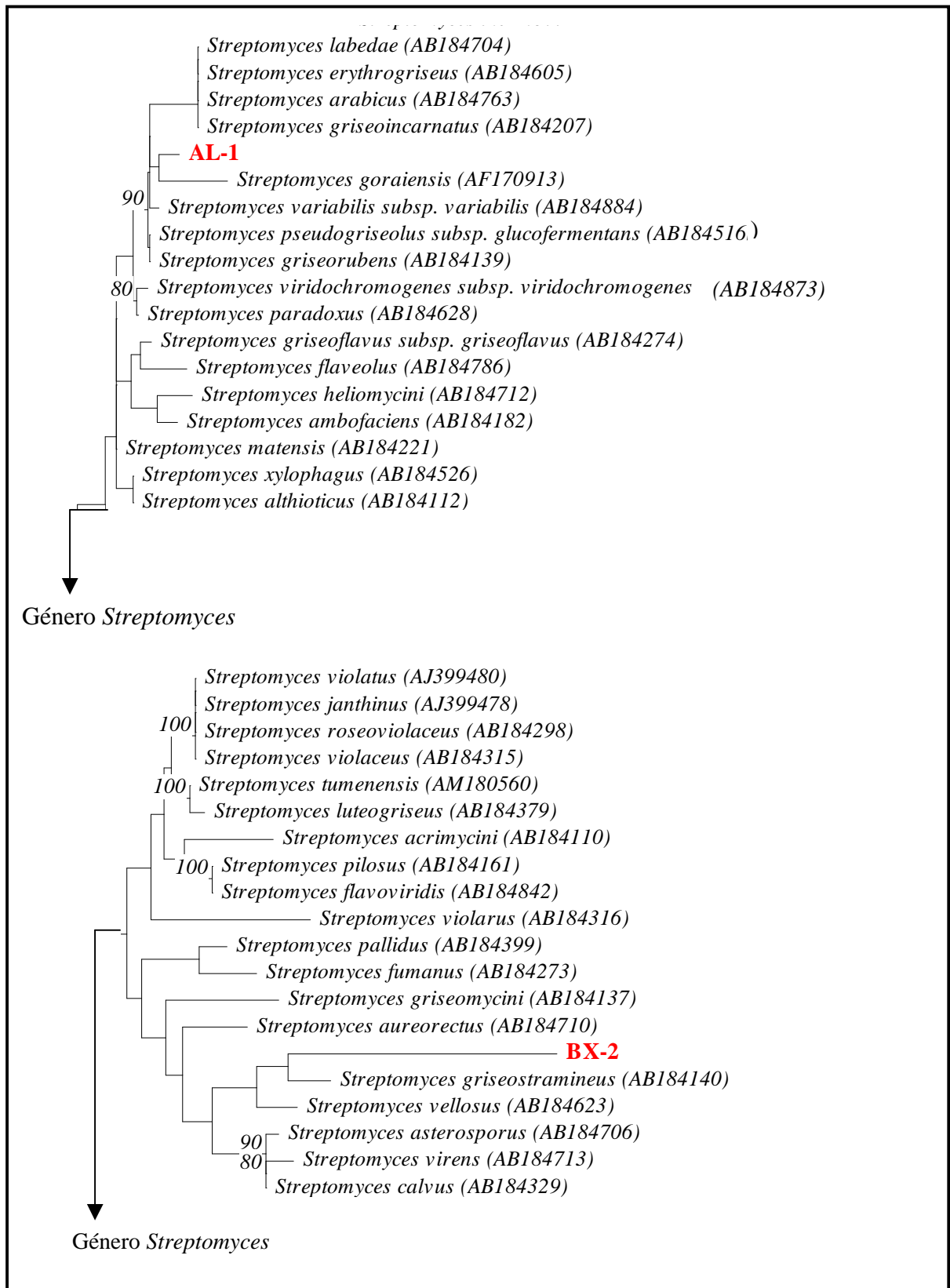


Figura 36. Relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen 16S rRNA actinomicetos aislados del Golfo de California (cepas AL-1 y BX-2) y las especies validamente descritas del género *Streptomyces*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

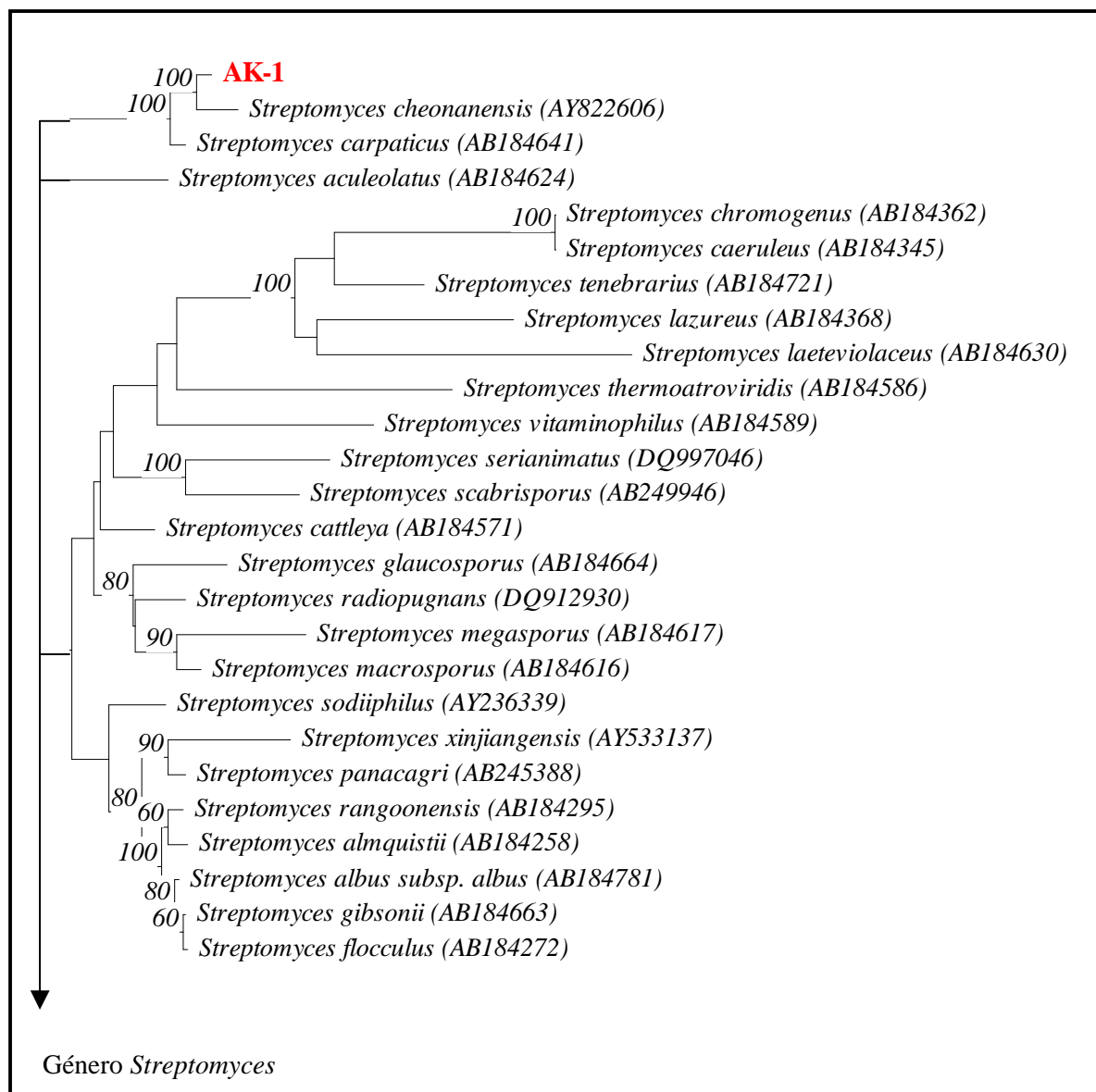


Figura 37. Relaciones filogenéticas entre la secuencia del gen 16S rRNA del actinomiceto aislado de Golfo de California (cepa AK-1) y las especies validamente descritas del género *Streptomyces*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

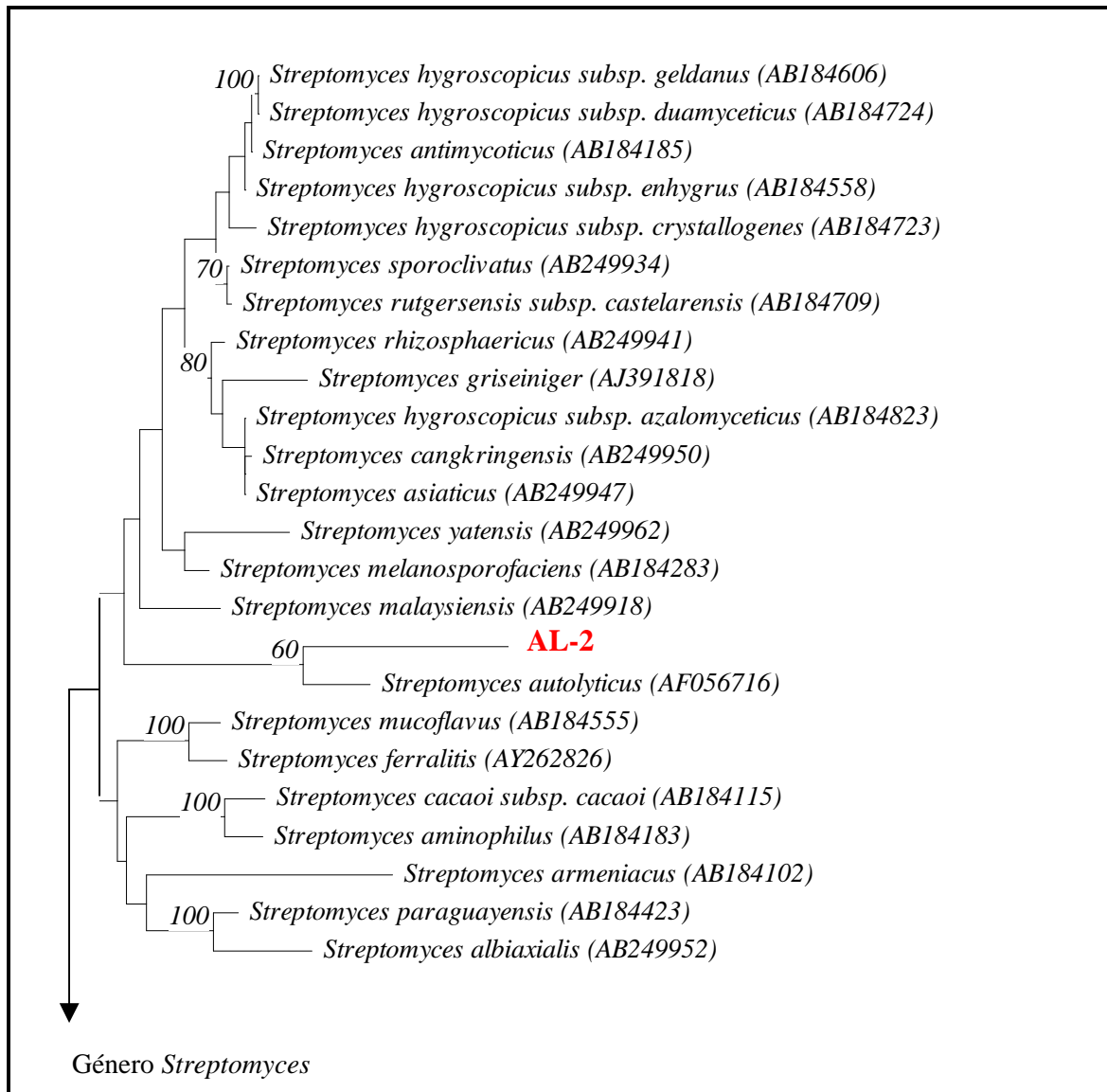


Figura 38. Relaciones filogenéticas entre la secuencia del gen 16S rRNA del actinomiceto aislado de Golfo de California (cepa AL-2) y las especies validamente descritas del género *Streptomyces*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

5. CONCLUSIONES

- ✓ La presente propuesta de investigación representa el primer trabajo realizado en México para estudiar aislados de origen marino del Golfo de California de la clase *Actinobacteria*.
- ✓ En el presente proyecto se reporta por primera vez la presencia del género *Saccharomomospora* de muestras de origen marino.
- ✓ Se aislaron miembros de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*" de muestras nacionales las cuales habían sido únicamente reportadas estar presentes en muestras de sedimentos recolectados en las Bahamas y en Papa Nueva Guinea.
- ✓ Es evidente que miembros de los géneros *Salinispora* y "*Solwaraspora*" tienen una mayor distribución que como se consideraba anteriormente.
- ✓ Cepas del género *Streptomyces* aisladas del Golfo de California presentan un mejor crecimiento en medio preparado con agua marina, que nos indica que al menos estos aislados tienen preferencia al ambiente marino de donde fueron aislados.
- ✓ Los aislados estudiados en este proyecto representan ser nuevos núcleos de variación taxonómica de los géneros *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, "*Solwaraspora*" y *Streptomyces* lo cual nos indica la gran diversidad presente y por descubrir en el ecosistema marino Mexicano.

6. INNOVACIÓN E IMPACTO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por muchos años se consideró que la tierra y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos. Sin embargo, estudios recientes han reportado que es específicamente el océano donde existe un mayor número de organismos microscópicos y posiblemente los más diversos del planeta. La diversidad biológica o biodiversidad, y particularmente su componente microbiano, se sabe esta íntimamente ligado con el sostén y la sustentabilidad de planeta. Estos seres microscópicos son los responsables de llevar a cabo las reacciones básicas dentro de los ecosistemas para permitir el desarrollo y crecimiento de organismos superiores (entre ellos el ser humano).

Nuestro planeta está cubierto por $\frac{3}{4}$ partes de agua y que cerca del 70% lo constituye el agua del océano. Lo anterior nos hace pensar que no es raro avistar la posibilidad de una enorme cantidad de microorganismos desconocidos y por descubrir en este ecosistema. Es claro entonces que el inmenso mundo marino representa *per se* una fuente inexplorada de descubrimiento y constituye un extraordinario reservorio microbiano. Tampoco resulta difícil pensar que el ecosistema marino Mexicano con un área de mayor extensión que la terrestre (a partir de 1975) es una posibilidad para el descubrimiento de microorganismos.

En particular en las últimas dos décadas miembros de la clase *Actinobacteria* han sido aislados de ecosistemas marinos y muchos de ellos han revelado su capacidad de producir nuevos antibióticos y anticancerígenos. La búsqueda de microorganismos de origen marino no es una ciencia ficción sino una realidad y habiendo pocos grupos de investigación en México que se dedican al saber de este tema es que la presente propuesta significa el primer estudios de su tipo, en particular para estudiar microorganismos aislados de sedimentos marinos del Golfo de California establecer su estatus taxonómico y descubrir nuevas especies microbianas relacionadas al ambiente marino.

Las disciplinas biológicas entre ellas la microbiología, han tenido grandes avances en los últimos años, inclusive, algunas han sido completamente revolucionadas con el resultado de la aplicación de la biología molecular.

México como país Megadiverso ha, es, sigue y seguirá siendo presa de diversos grupos extranjeros que exploran nuestros ecosistemas, tanto los terrestres como los marinos, en la búsqueda de nuevos microorganismos con oportunidades biotecnológicas y por lo tanto económicas.

Es claro que investigaciones como la que aquí se presenta deberían ser una prioridad en México. No solo por la importancia de conocer el vasto mundo microbiano presente en nuestros ecosistemas, sino porque es evidente que personal de alta calidad especializado en esta importante rama del conocimiento, como la microbiología marina y molecular, representa un tema inagotable de estudio, de vanguardia y sobre todo de oportunidad para su aplicación en la investigación en México.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Es altamente recomendable que los nuevos núcleos taxonómicos descubiertos en la presente propuesta de investigación sean descritos formalmente como nuevas especies microbianas de los taxa *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora* y *Streptomyces*.
- ✓ Es necesario describir formalmente al género "*Solwaraspora*" junto con los miembros aislados en la presente propuesta y aquellos aislados de sedimentos de Papua Nueva Guinea.
- ✓ Sería adecuado diseñar una estrategia para el aislamiento selectivo basada en la información fenotípica generada del presente trabajo para microorganismos marinos estrictos y aquellos altamente relacionados con el ecosistema marino.

8. REFERENCIAS

1. Anderson A. S. & Wellington E. M. H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:797-814.
2. Baltz R. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the Future. *Microbe*. 2:125-131.
3. Bode H. B. & Müller R. 2005. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angewandte Chemie*. 14:6828-6846.
4. Bolívar F. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Editorial Colegio Naional, 718 pp.
5. Bull A., Stach J., Ward A. & Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87:65-79.
6. Bull A., Ward A. & Goodfellow M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:573-606.
7. Challis L.G. & Hopwood A.D. 2003 Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:14555-14561.
8. Chun J. & Goodfellow M. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:240-245.
9. Demain A. L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*. 18:499-514.
10. Euzéby P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Accessed June 2008. <http://www.bacterio.cict.fr/>
11. Goodfellow M. & Haynes J. A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. and Yakoleff V. (eds), Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Academic Press, Orlando, 453-472 pp.
12. Gordon R. E. & Mihm M. J. 1962. Identification of *Nocardia caviae* (Erikson) nov. comb. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 98:628-636.
13. Guo Y., Zheng W., Rong X. & Huang Y. 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58:149-159.

14. Hardin S. H. 2001. DNA sequencing. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing group, EUA. 5 pp.
15. Helmke E. & Weyland H. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34:127–138.
16. Hoffman L., D'Argenio D., Bader M. & Miller S. 2007. Microbial recognition of antibiotics: ecological, physiological and therapeutic implications. *Microbe*. 2: 175-181.
17. Hunter-Cevera J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*. 1:278-285.
18. Kennish J. M. 2001. Practical handbook of marine science. CRC Press. New Jersey, USA. 441-444 pp.
19. Koneman E. W., Allen S. D. Janda W. M., Schreckenberger P. C. & Winn W. C. 1999. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1432 pp.
20. Korn W. F. & Kutzner H. J. 1992. The Family *Streptomycetaceae*. En Balows A., Trüper H. G, Dworkin M., Harder W. & Schleifer K. H. (eds). *The Prokaryotes*. SpringerVerlag. Vol 1. 921-995 pp.
21. Lam K. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Elsevier*. 9:245-251.
22. Lam K. 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *TRENDS in Microbiology*. 15:279-289.
23. Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. & Goodfellow (eds). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Nueva York, EUA. 115-175 pp.
24. Lanoot B., Vancanney M., Cleenwerck I., Wang L., Li W., Liu Z. & Swings J. 2002. The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 823-829.
25. Lanoot B., Vancanney M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y., Liu Z. & Swings J. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 84-92.

26. Lanoot B., Vancanney M., Hoste B., Vandemeulebroecke K. Cnockaert M.C., Dawyndt P., Liu Z., Huang Y. & Swings J. 2005. Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology*. 156: 755-762.
27. Logan N. 1994. Bacterial systematics. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 272 pp.
28. Loria R., Joshi M. & Moll S. 2007. *Streptomyces*: not just antibiotics. *Microbiology today*. Mayo:64-67.
29. Madigan M. T. & Martinko J. M. 2006. Brock Biology of microorganisms. 11th Ed. Pearson Prentice Hall, USA.
30. Magarvey N. A, Keller J. M., Bernan V., Dworkin M. & Sherman D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:7520-7529.
31. Maldonado L. A. 2002. Polyphasic taxonomy of members of the genus *Nocardia*. Ph.D. Thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, England UK. 28 pp.
32. Maldonado L. A. 2007a. El 70% de los antibióticos comerciales provienen de un solo grupo bacteriano. Boletín UNAM-DGCS-469 Ciudad universitaria. Localizado en red: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2007_469.html
33. Maldonado L. A. 2007b. Un grupo bacteriano provee 70% de antibióticos. Artículo La jornada. Localizado en red: <http://www.jornada.unam.mx/2007/08/09/index.php?section=ciencias&article=a03n2cie>
34. Maldonado L. A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:1759-1766.
35. Maldonado L. A., Stach J. E., Pathom-aree W., Ward A. C., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87:11-18.
36. Micklos D. A. & Freyer G. A. 1990. DNA Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1-477.
37. Mincer T. J., Jensen P. R., Kauffman C. A. & Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:5005-5011.

38. Ørskov J. 1923. Investigation into the morphology of the ray fungi. 135. Levin & Munksgaard. Copenhagen, Denmark.
39. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M. & Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*. 190:4050-4060.
40. Ômura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C. Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y. & Hattori M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:12215-12220.
41. Prescott M. L., Harley P. J. & Klein A. D. 1999. Microbiology. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España. 525-537 pp.
42. Quintana R. T., Wierzbicka K., Mackiewicz P., Osman A., Fahal A.H., Hamid M.E., Zakrzewska-czerwinska J., Maldonado L.A. & Goodfellow M. 2007. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93:305-313.
43. Rheims H., Schumann P., Rohde M. & Stackebrandt E. 1998. *Verrucosispora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48:1119-1127.
44. Rodríguez C. 2004. Selective isolation and characterisation of novel members of the family *Streptomycetaceae*. PhD Tesis. University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, Englang UK. 53-61pp.
45. Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
46. Shirling, E. B. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16: 313-340.
47. Skerman V. B., Mc Gowan V. & Sneath P. H. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30:225-420.
48. Sneath P.H.A. 1993. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43: 626-629.
49. Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. & Herndl G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the

- underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 32:12115-12120.
50. Stach J.E.M, Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M. & Bull A.T. 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6189-6200.
 51. Stackebrandt E., Rainey F. A., & Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47:479-491.
 52. Staneck L. J. & Roberts D.G. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*. 28:226-231.
 53. Van de Peer Y. & DeWachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications for Biological Sciences*. 10: 569-570.
 54. Walsh C. 2003. Antibiotics. Actions, origins, resistance. ASM Press, EUA. 335 pp.
 55. Ward A. C. & Bora N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 9:1-8.
 56. Waksman A. S. & Henrici T. A. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *Journal of Bacteriology*. 46:337-341.
 57. Woese C. R., Kanler O. & Wheelis M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:4576-4579.

9. APÉNDICES

A) Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua marina artificial (Instant Ocean, USA), a menos que se indique otra cosa. Los medios fueron esterilizados a 15 lb, 121° durante 15 minutos.

Agua marina	
Sales marinas	35g
Agua destilada	1000 mL

A1 (Mincer <i>et al.</i> , 2002)	
Almidón	10 g
Extracto de levadura	4 g
Peptona	2 g
Agar	12 g
Agua marina	1000 mL
pH 7	

Bennett's (Jones, 1949)	
Lab lemco	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
Triptosa	2 g
Glucosa	10 g
Almidón	400 mg
CaCO ₃	400 mg
CoCl ₂	Trazas
Citrato ferrico de amonio	Trazas
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0	

GYM (Agar glucosa extracto de levadura y malta; Catálogo DSMZ, 2001)	
Glucosa	4 g
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Carbonato de calcio	2 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0-7.2	

GYEA (Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon & Mihm, 1962)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.2	

GYEA marino (Gordon & Mihm, 1962)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar	12 g
Agua marina	1000 mL
pH 7.2	

Medio basal (Shirling & Gottlieb, 1966)	
D-glucosa	10 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ •H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	18 g
Agua marina	1000 mL
pH 7.4	

ISP-2 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Dextrosa	4 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.2	

ISP-3 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
Avena comercial	20 g
Agar	15 g
Solución sales traza (Pridham τ Gottlieb)	1 mL
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0-7.2	

ISP-4 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
• Solución 1	
Almidón	10 g
Hacer una masa con una pequeña cantidad de H ₂ O fría. Llevar a 500 mL	
• Solución 2	
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄)SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Solución sales traza (Pridham τ Gottlieb)	1 mL
Agar	15 g
Agua destilada	500 mL
pH 7.0	
Mezclar soluciones 1 y 2.	

ISP-5 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
L-asparagina	1 g
Glicerol	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Solución sales traza (Pridham τ Gottlieb)	1 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0	

ISP-7 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
Glicerol	15 g
L-tirosina	0.5 g
L-asparagina	1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0	

ISP-9 (Shirling & Gottlieb, 1966)	
(NH ₄)SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	5.65 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.0 g
Solución sales traza	1 mL
(Pridham τ Gottlieb)	
Agar	18 g
Agua marina	1000 mL
pH 6.8-7.0	

TCG (Mincer <i>et al.</i> , 2002)	
Triptona	3 g
Casitona	5 g
Glucosa	4 g
Agar	12 g
Agua marina	1000 mL
pH 7	

B) Soluciones y Buffers

GTE (100mL; Micklos & Freyer, 1990)	
Glucosa al 40% (m/v)	2.27 mL
EDTA 0.5M pH 8	2.0mL
Tris-HCl pH 8	2.5 mL
H ₂ O	93.23 mL

Buffer TBE 10X (Micklos & Freyer, 1990)	
Tris base	11.6g
Ácido bórico	8.42 g
EDTA sódico	0.98g
H ₂ O	1000mL