



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO Y
NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS
CAROTENOIDES EN MICROORGANISMOS
AISLADOS DEL GOLFO DE MÉXICO**

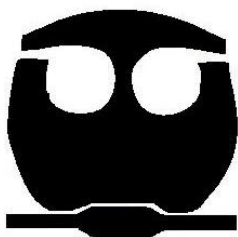
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LAURA BARRAGÁN TOLENTINO



MÉXICO. D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:** MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

VOCAL: **Profesor:** BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO LÓPEZ

SECRETARIO: **Profesor:** LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** NORMA ANGÉLICA CASTELLANO CHÁVEZ

2° SUPLENTE: **Profesor:** ROSALBA ESQUIVEL COTE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, LABORATORIO DE BIODIVERSIDAD Y
BIOPROSPECCIÓN MICROBIANA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

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

SUSTENTANTE: LAURA BARRAGÁN TOLENTINO
(nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por darme la oportunidad de un momento.

A la Facultad de Química, que junto con sus profesores hacen de mi educación la mejor en el área.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Proyectos ICMYL-612 Y DGAPA-PAPIIT-225407) por la obtención de muestras provenientes del Golfo de México para la realización de este trabajo, así como uso de las instalaciones.

A mis amigos de carrera (Alo y Jerry) con quienes compartí risas, exámenes, angustias, días enteros en la Fac, así como los mejores momentos de práctica de laboratorio, incluso los inexistentes (malta), pero que finalmente sirvieron para conocernos.

A mis tíos, primos, padrinos, abuelas y amigos por siempre ser importante dentro de sus vidas.

A Alex por ser como mi hermano y brindarme su apoyo en los momentos que necesité desahogar mis presiones académicas.

A Miriam cuya amistad ha sido incondicional, apoyándome en los momentos más adversos.

A César por su amor, ternura y comprensión.

A Fran por enseñarme a vivir cada momento y ver la vida desde otro punto, por ser ejemplo de valentía, entereza y amor.

A Esther (q.e.d) por creer siempre en mi y alentarme para cumplir cada una de mis metas.

A mis padres por su infinito amor y apoyo.

A mis Sinodales, por la gentileza al dedicarle tiempo a mi tesis.

A la Dra. Erika por sus múltiples puntos de vista para la mejora de mis trabajos, la enseñanza dentro del laboratorio y los buenos momentos de pláticas.

A mi tutor de tesis, Dr. Luis Maldonado, por su dirección en la realización de este trabajo, así como sus valiosos consejos, tanto académicos como de vida, por sus regaños, paciencia, confianza y por todas las oportunidades que me ha brindado, sin más, un ser humano extraordinario que deja en mí aprendizajes invaluable.

DEDICATORIA:

A mis padres (Pe y Re)

Quienes con su fortaleza, respeto, amor, sabiduría, confianza y todas sus virtudes han hecho que hoy y siempre les admire y sean mi mejor ejemplo.

Pero sobre todo porque han hecho de mí una mujer con grandes valores, y a su niña, la más feliz a cada momento.

Porque son lo mejor que tengo.

Y porque gracias a ustedes he recibido un regalo único y el mejor de los aprendizajes; un sueño de tantos se cumple.

Este es su trabajo.

Los amo.

PRESENTACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS:

Pósters

Barragán, L., Quintana, E.T. & Maldonado, L.A. 2008. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de pigmentos naturales en aislados de la clase *Actinobacteria*. VI Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Octubre 21-24, Reynosa Tamaulipas.

Barragán, L., Quintana, E.T. & Maldonado, L.A. 2009. Effect of different carbon sources on the carotenoid synthesis of marine *Actinobacteria*. En, Proceedings of the 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA-15). Agosto 20-25. Shanghai, China

En Extenso

Barragán, L., Quintana, E.T. & Maldonado, L.A. 2009. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de pigmentos naturales en aislados de la clase *Actinobacteria*. En, Avances en el Estudio de la Biotecnología. Narvaéz, J.A., Villegas-Hernández, M.C. & Mendoza, A. (Eds). Editorial Instituto Politécnico Nacional. ISBN-978-607-414-060-06, pág. 87-91.

Reconocimiento

Segundo Lugar, en el área de Biotecnología Alimentaria, modalidad póster. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de pigmentos naturales en aislados de la clase *Actinobacteria*. Dentro del VI Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Octubre 21-24, Reynosa Tamaulipas. 2008.

ÍNDICE

Datos del jurado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Presentaciones relacionadas con esta Tesis	iv
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Importancia de la micro-biodiversidad marina	4
2.2 Metabolitos secundarios y su uso en la biotecnología	9
2.3 Importancia de los pigmentos carotenoides	12
2.4 Filogenia bacteriana	14
2.5 La clase <i>Actinobacteria</i>	17
2.6 El género <i>Gordonia</i>	20
2.7 Planteamiento del problema	25
2.8 Objetivos	26
2.9 Hipótesis	27
3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	
3.1 Crecimiento y caracterización macroscópica, microscópica y quimiotaxonómica	29
3.2 Determinación de ácidos micólicos	29
3.3 Efecto en medio sólido de diferentes fuentes de carbono	31
3.4 Efecto en medio sólido de diferentes fuentes de nitrógeno	32
3.5 Efecto en medio líquido de glucosa, glicerol, maltosa y sacarosa	34
3.6 Extracción de DNA	35
3.7 Electroforesis horizontal	36
3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
3.9 Secuenciamiento de productos de la PCR	37
3.10 Construcción de árbol filogenético	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Crecimiento y caracterización macro y microscópica	38
4.2 Determinación de ácidos micólicos	40
4.3 Extracción de DNA, PCR y árbol filogenético	41
4.4 Efecto en medio sólido de diferentes fuentes de carbono	43
4.5 Efecto en medio sólido de diferentes fuentes de nitrógeno	53
4.6 Efecto en medio líquido de glucosa, glicerol, maltosa y sacarosa	60
5. CONCLUSIONES	69
6. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXO A	76
ANEXO B	77
ANEXO C	78
ANEXO D	80

1. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos amarillos-, naranjas- o rojos- formados por la condensación de unidades isoprenóicas. Éstos compuestos son producidos por una gran variedad de organismos (microorganismos y macroorganismos). En organismos fotosintéticos, estas substancias sirven como accesorios en la captura de luz absorbiéndola y transfiriéndola como energía hasta clorofila. En organismos fototróficos y no-fototróficos los carotenoides protegen a la célula de radicales oxigenados dañinos (foto-oxidación; Krinsky, 1989). La amplia presencia de carotenoides en bacterias no-fototróficas sugiere que la última función mencionada es crucial para la viabilidad de estos organismos en ambientes naturales.

Debido a su benéfico uso en actividades biológicas, los carotenoides tienen múltiples aplicaciones, especialmente, en las industrias alimentaria y farmacéutica. Actualmente, la producción comercial de carotenoides es realizada mediante la extracción de estos compuestos en tejidos de plantas o por síntesis química. Sin embargo, la producción de carotenoides por medio de microorganismos (en particular con bacterias) también tiene un gran potencial en términos de eficiencia y producción pero sobre todo por la diversidad molecular y de especies (Veiga-Crespo *et al.*, 2005).

El hecho de que exista una gran variedad de microorganismos y que muchos de ellos han sido estudiados en poco detalle, abre la posibilidad de su uso en algún aspecto de tipo industrial. En este sentido, microorganismos de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) -bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina- genéricamente conocidos como actinomicetos y en específico miembros del subgrupo actinobacteriano de los contenedores de ácidos micólicos- (MAC, por sus siglas en inglés) presentan la capacidad innata de sintetizar pigmentos carotenoides (Veiga-Crespo *et al.*, 2005). Por lo que es de suponer que aquellas aisladas de ecosistemas poco explorados en México muestren la capacidad para producir éste tipo de compuestos.

Los carotenoides representan la más amplia variedad de pigmentos naturales responsables de la mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos presentes en los alimentos tanto vegetales como animales. Está comprobado que estos colorantes proporcionan beneficios al ser consumidos ya que tienen capacidades anticancerígenas y retardadoras del envejecimiento. Los carotenoides pertenecen a la familia de los terpenos, están formados por unidades de isopreno (40 átomos de carbono), son parte de una familia que consta de aproximadamente 700 moléculas liposolubles que son producidas por algas, plantas, un limitado número de hongos y bacterias, entre éstas últimas se encuentran la clase *Actinobacteria*.

Por lo menos existen 600 carotenoides diferentes que son sintetizados de manera natural (Straub, 1987) y que cuentan con importantes funciones para la fotosíntesis y en nutrición. Las principales fuentes de pigmentos carotenoides utilizados en la industria son la astaxantina producida por *Xanthophyllomyces dendrohous* (Johnson & An, 1991) y la cantaxantina producida por *Phaffia rhodozyma* (Johnson, 2003).

El estudio y aprovechamiento de los recursos microbianos presentes en nuestros ecosistemas, por ejemplo del ambiente marino, permitiría profundizar en el estudio de microorganismos capaces de producir diversos metabolitos, entre ellos los carotenoides (biocolorantes), que pudieran ser empleados para la fabricación de algún bien o servicio a favor del ser humano, así como de estudiar de una forma precisa y objetiva cualquier forma de vida existente en los ecosistemas nacionales y por lo tanto del planeta.

El mercado de los pigmentos de grado alimentario por fermentación microbiana es amplio y aún se encuentra en etapa de desarrollo. Los biocolorantes se están convirtiendo en la parte más sensible de un alimento, no sólo por que ayudan a su apariencia, sino por la aceptación del consumidor al proceder de un recurso natural (Clydesdale, 1993; Veiga-Crespo *et al.*, 2005). Se

ha comprobado que los colorantes utilizados en la industria alimentaria no sólo crean una expectativa fisiológica sino también psicológica y éstos también ayudan o estimulan las actitudes que se pueden desarrollar al consumir un alimento “pigmentado”.

Por muchos años, el uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria ha sido controversial debido a sus efectos negativos. Una alternativa son los colorantes naturales los cuales a su vez tienen un efecto positivo en la salud humana. Esto abre la oportunidad de investigar seres microscópicos, en particular este proyecto plantea aquellos de la clase *Actinobacteria*, como productores de pigmentos carotenoides evaluando el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y sus modificaciones sobre los mismos, a fin de proponer una aplicación alimentaria y obteniendo un posible beneficio natural (biocolorantes) proveniente de los mares del territorio mexicano.

1. MARCO TEÓRICO

2.1 IMPORTANCIA DE LA MICRO-BIODIVERSIDAD MARINA

Los océanos representan cerca del 71% de la superficie total del planeta (Munn, 2004), y constituyen la parte más grande de la biosfera. Son ecosistemas con una enorme estabilidad con respecto a su temperatura y valores osmóticos (Lengeler, 1999) y en fechas recientes la búsqueda de nuevos productos comercialmente explotables provenientes de los mares, en particular del componente microscópico, se ha visto orientada hacia éste importante y poco explorado ecosistema.

Es reconocido que México cuenta con una gran diversidad de recursos naturales, sobre todo de los macroscópicos. Sin embargo, aquellos microscópicos son aún poco explorados y su valor es poco apreciado. Si bien se conoce menos del 1% de la población microbiana del Planeta y menos del 1% ha sido posible cultivar en el laboratorio, respecto a la parte acuática o marina de esta microbiodiversidad entonces podemos decir que existe un campo joven y amplio de exploración e investigación. A partir de este hecho es que surge el interés para investigar sedimentos del Golfo de México, sus microorganismos y sus posibles productos. En este proyecto el interés se centró en pigmentos carotenoides que pudieran ser sintetizados por microorganismos aislados del ambiente marino así como directrices hacia una posible optimización de dicha producción de pigmentos. La aplicación de estos biocolorantes fundamentalmente podría tener una aplicación en la industria alimentaria o cosmética y representar una nueva alternativa de importancia para la sociedad por las conocidas propiedades de este tipo de pigmentos.

La zona económica exclusiva de México (ZEE) al igual que otros países, se extiende a 200 millas náuticas (370.4 km) hacia el océano, a partir de la línea de costa, que define el nivel medio del mar de la zona litoral (Figura 1). México cuenta

con 2 946 825 km² de superficie marina, en la que ejerce libre soberanía para explorar, explotar, conservar y administrar los recursos de los fondos marinos, incluidos los del subsuelo y del agua superficial. Nuestro país también se reserva el derecho exclusivo y de jurisdicción para utilizar las islas arrecifales, establecer estructuras artificiales (plataformas petroleras) e implementar el desarrollo de actividades científicas, además de preservar el medio marino y eliminar los agentes contaminantes de esta zona (Cifuentes *et al.*, 1997; Gío, 1999).

La ZEE de México se divide en seis subprovincias, de acuerdo a sus características oceanográficas, geológicas, biológicas, físicas y químicas las cuales son: Baja California-Pacífico, Golfo de California, Región Panámica del Océano Pacífico, Suroeste del Golfo de México, Banco de Campeche y Caribe Mexicano. Éstas cuentan con un gran número de recursos como minerales, materia orgánica y sedimentos, sólo por mencionar algunos (<http://www.bibliotecadigital.ilce.edu.mx>).



Figura 1. Zona económica exclusiva del territorio mexicano.

Fuente: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=909&s=geo>, marzo 2009.

El agua (H₂O) es el compuesto químico más importante e indispensable para la vida. Dado que ésta cambia en cuanto a composición y disponibilidad de un medio acuático a uno terrestre, los organismos que viven en estos diferentes

ambientes, han podido desarrollar estrategias de protección. Por ejemplo, la desecación especialmente en ambientes extremadamente secos. Los organismos que viven dentro de grandes superficies de agua se encuentran no sólo protegidos de la desecación sino también de los cambios bruscos de temperatura, lo último si lo comparamos con su contraparte terrestre. En ambientes acuáticos la temperatura varía debido a la profundidad en alrededor de 18 °C. Por ejemplo, a una profundidad mayor a 2000 m la temperatura puede llegar a 3 °C, mientras que en la superficie llega a ser de 20 °C. En comparación con la superficie terrestre donde la variación de temperatura puede ser mayor a 40 °C, ya que el rango de temperatura en ecosistemas terrestres tiene un rango de -20 a 60 °C. De aquí el hecho de que el agua sea *per se* la base perfecta para la vida tanto macroscópica como microscópicamente.

El ambiente oceánico posee diferentes hábitats como por ejemplo a) las ventilas hidrotermales, b) los lodos marinos profundos, c) las zonas litorales y d) los géiseres. Es en el ecosistema marino donde residen millones de organismos desde los microscópicos hasta los mamíferos más grandes del planeta. Los seres vivos en el océano se separan en organismos *pelágicos* (los que se encuentran en la columna de agua) y *bentónicos* (los que viven en el suelo marino; Kennish, 2001).

El ambiente bentónico incluye: 1) el supralitoral, 2) el litoral, 3) el sublitoral, 4) el batial, 5) el 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* de 0 a 200 m, *mesopelágico* de 200 a 1,000m, el *batipelágico* de 1,000 a 2,000 m, el *abisopelágico* de 2,000-6,000 m y las regiones *hadalpelágicas* mayor a 6,000 m (Figura 2; Kennish, 2001).

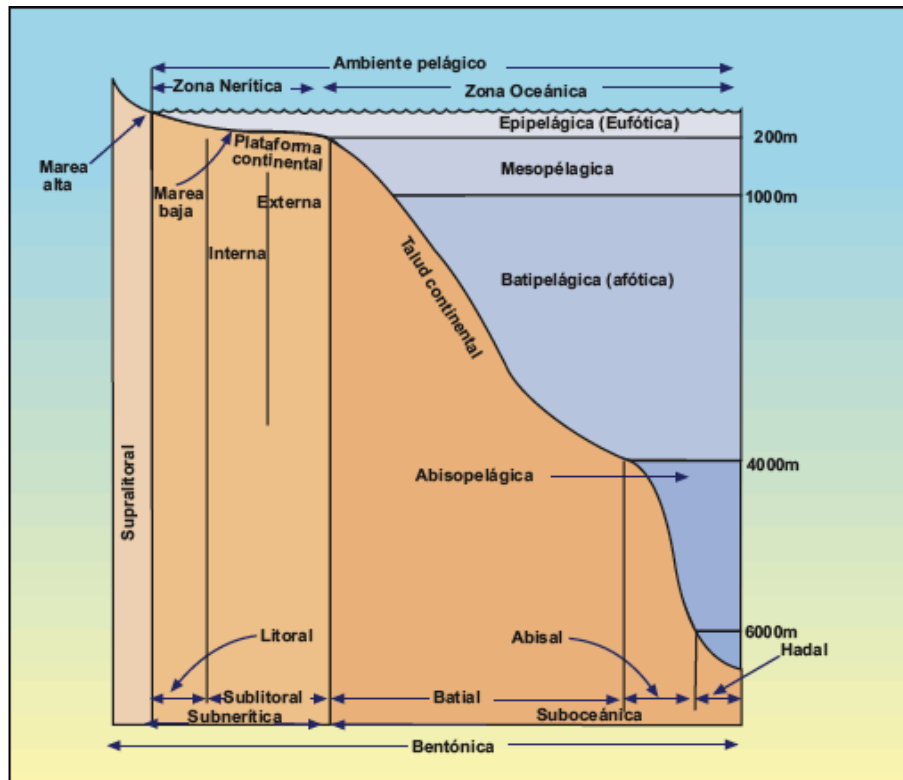


Figura. 2. Clasificación del entorno marino.

Fuente: http://www.mardechile.cl/educacion/index.php?option=com_content&task=view&id=347&Itemid=31
Septiembre, 2007.

Se sabe que entre el 90 y 98 % de la biomasa contenida en el océano pertenecen a organismos microscópicos (Sogin *et al.*, 2006), ya que si se pudieran separar todos los organismos vivos que habitan en el océano, los microbios serían los que ocupasen la mayor parte del peso, mientras que las otras formas de vida (superiores) sólo representarían del 2 a 10 % de la vida del océano. Esto es importante pues resalta el vasto mundo microscópico (micro-biodiversidad) presente en los ecosistemas marinos que podría ser descubierto y estudiado.

El hecho de identificar especies microbianas adaptadas metabólicamente al ambiente marino, esto es, *autóctonas* de dicho ecosistema, aumenta 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).

Las bacterias marinas son organismos unicelulares, microscópicos menores a 2 mm de diámetro y pueden ser divididas en autótrofas y heterótrofas. Las primeras obtienen su energía gracias a la fotosíntesis (fotótrofos) o a través de la oxidación de compuestos orgánicos (quimiolitótrofos) mientras que las heterótrofas, sapófitas y parásitas obtienen energía de otros compuestos orgánicos. Las bacterias aeróbicas heterótrofas se encuentran en la columna de agua (cuerpo de agua uniforme), flotando o adjuntas a partículas, en la capa superior de los sedimentos del suelo marino y/o tejidos de plantas o animales. Así las bacterias anaeróbicas habitan en profundidades mayores, como en los sedimentos y mares anóxicos o bien en zonas muy contaminadas (Kennish, 2001).

Las bacterias epibióticas colonizan la superficie de los sustratos marinos que sirven como recurso alimenticio para protozoarios y otros heterótrofos. Un gran número de bacterias viven en los sedimentos del suelo marino (Ward & Bora, 2006) que contienen cantidades limitadas de materia orgánica y algunos de ellos incluso contienen polímeros complejos como la quitina y/o la celulosa (Magarvey *et al.*, 2004).

La abundancia bacteriana así como su cuenta celular disminuye con el incremento de la profundidad y dentro de los primeros 20 cm de la columna de sedimento. Un mayor número de actinobacterias se encuentran en la interfase sedimento-agua en los primeros 2 cm de los sedimentos del fondo marino (Stach *et al.*, 2003) ya que existe correlación entre lo mencionado anteriormente y la concentración de materia orgánica. El número mayor de bacterias y reproducción de las mismas ocurre en sedimentos enriquecidos en materia orgánica o en concentraciones altas de carbono orgánico. Esto es debido a que las bacterias encuentran una mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento en estos medios o ambientes (Kennish, 2001).

2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU USO EN LA BIOTECNOLOGÍA

Por cientos de años nuestros ancestros han hecho uso de los microorganismos, ignorando que éstos se encontraban presentes, y más aún, sin conocer los procesos que llevaban a cabo. Originalmente estos procesos fueron desarrollados para la preservación de alimentos, como en el caso del queso, vinagretas y yogurt o bien para realzar el sabor de algún alimento (Lengeler, 1999). Pero la parte que menos se tomaba en cuenta cuando se estaban desarrollando estos productos, era el valorar que se estaba desarrollando un nuevo tipo de bien o servicio en algunos casos muy sofisticado para el gusto visual, sensorial y el paladar humano. Lo anterior dio como resultado productos como el pan, los vinos e incluso la cerveza que durante el siglo XX y el XXI han tenido un desarrollo magistral para satisfacer al paladar más exquisito (Demain, 2000).

Moléculas como el ácido láctico se pudieron desarrollar para fermentar-preservar plantas comestibles como la col al colocarla en recipientes de cerámica o de vidrio, agregándoles agua y sellando el producto. Bacterias presentes en la col (bacterias lácticas) asimilan los carbohidratos de la misma, dando como producto el ácido láctico el cual sirve para preservar el alimento. Otro producto de gran importancia y mercado mundial es el queso, un subproducto de la leche y una forma de preservación del valor nutricional de la misma. La obtención de quesos fermentados o madurados es gracias al uso de bacterias u hongos que desarrollan un sabor o apariencia específica (Weeks & Alcamo, 2008).

Otro organismo importante son las levaduras, las cuales han jugado durante varios siglos un papel fundamental en la vida del ser humano. No hubiera sido posible sin la ayuda de las levaduras elaborar vinos y cervezas y todas sus variedades. Éstas últimas han sido de gran importancia desde la época de los egipcios hasta nuestros días. Los microorganismos (bacterias y hongos) ahora se

sabe que son los responsables de la producción de moléculas de importancia industrial, como las enzimas (Weeks & Alcamos, 2008).

Antes de 1860 las aplicaciones biológicas eran basadas solamente en la práctica dada la ausencia de los conocimientos o fundamentos envueltos en dichos procesos. Fue hasta que Louis Pasteur demostró que los microorganismos eran los causantes de la fermentación del vino que se dio el primer paso para entender los procesos microbianos y los cuales abrieron brecha en el desarrollo de los procesos de fermentación industrial (Weeks & Alcamo, 2008).

Durante la primera guerra mundial, la población se vio empujada al desarrollo y obtención de nuevos productos como la acetona y el glicerol, ambos se obtuvieron por medio de un proceso de fermentación. Sin embargo, el descubrimiento que marca el desarrollo de productos de origen microbiano y de gran importancia en este caso para la medicina, fue el descubrimiento de la penicilina, por el británico Alexander Fleming en el año 1928 durante la segunda guerra mundial (Weeks & Alcamo, 2008).

En los años cuarenta, diferentes disciplinas como la bioquímica, microbiología e ingeniería contribuyeron al desarrollo de procesos de fermentación a nivel industrial, especialmente en la producción de los antibióticos. Una vez que el uso de la penicilina fue generalizado, las industrias farmacéuticas decidieron estudiar a los antibióticos microbianos con mayor énfasis. El aumento en el conocimiento del metabolismo microbiano dio pauta para que se utilizaran otras variedades de metabolitos (aminoácidos y polisacáridos) y enzimas (proteasas o amilasas), todos producidos por bacterias. Esta última etapa es la que se conoce como la segunda etapa de la biotecnología (Weeks & Alcamo, 2008).

En los años ochenta la microbiología aplicada trajo un gran avance con las técnicas de ingeniería genética. La capacidad de modificar los genes e insertarlos en otras bacterias a través de técnicas rápidas y mejoradas de clonado y

secuenciación del DNA permitieron producir proteínas humana, enzimas, fármacos y otras moléculas de interés industrial (Ingraham, 2000). Aún con esto es de importancia emplear la riqueza que la naturaleza aún nos puede ofrecer en términos de biodiversidad, lo que acompañado de una alta riqueza química, puede constituir una fuente potencial de compuestos por ser utilizados (Demain, 2000).

De 1990 a 1994 alrededor de 1000 nuevos metabolitos secundarios fueron caracterizados. Cerca de 6000 antibióticos han sido descritos, de los cuales 4000 provienen de actinomicetos, y se continúan descubriendo cerca de 500 por año. Los metabolitos secundarios son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas y que al parecer no cuentan con una función determinada dentro del ciclo de crecimiento celular (Demain, 2000). De hecho las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido la capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales podemos mencionar antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos y promotores del crecimiento en plantas y animales. De ésta gran variedad de compuestos un 42% es producida por hongos, 32% por actinomicetos (bacterias Gram positivas) y el resto por otros grupos bacterianos (Bull, 2004).

2.3 IMPORTANCIA DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES

La proporción de pigmentos naturales (carotenoides) usados en alimentos es creciente debido a la toxicidad de algunos de estos compuestos producidos de manera sintética. En México, el mercado estimado para los colorantes en general es cubierto en su mayor parte por los amarillo-naranja (55%) seguido por los rojos (25%). Si tomamos en cuenta que nuestro país es un productor exportador de estos colorantes y que los problemas de demanda se deben en parte a los costos que esto conlleva, alternativas para poder abatir éstos costos son una necesidad (García, 1993; Tao & Cheng, 2004).

Los carotenoides representan la más amplia variedad de pigmentos naturales produciendo colores que van desde el amarillo-pálido atravesando el naranja y terminando en el rojo oscuro. Por lo menos existen 600 carotenoides diferentes que son sintetizados de manera natural (Straub, 1987) y que cuentan con importantes funciones en la fotosíntesis y la nutrición.

Existen muchos tipos de carotenoides microbianos como: el β -caroteno, el licopeno, la cantaxantina, la astaxantina y la rodaxina. Actualmente sólo se producen para uso alimentario el β -caroteno y el licopeno, para intensificar o modificar el color de las grasas, aceites, quesos y bebidas. El β -caroteno, la luteína y otras xantofilas abundan en los vegetales verdes, en las algas, las cianobacterias y las bacterias fotosintéticas. En los años sesenta se desarrollaron procesos para la producción a gran escala de éste carotenoide, a partir de hongos, sin embargo no pudieron competir con la síntesis química (Byon, 2004).

La obtención de colorantes a partir de vías biotecnológicas tiene una serie de ventajas, ya que la obtención de pigmentos se realiza sin problemas de espacio, su producción no depende de las condiciones ambientales, sociales o culturales; además de que no presenta problemas en cuanto a la disponibilidad del producto o de su variabilidad (García, 1993).

Pigmentos del tipo carotenoide son producidos por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos, los actinomicetos. Estos ya han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, del inglés) y se utilizan como aditivos alimentarios en la alimentación de aves y peces; dichos carotenoides son producidos por Hoffmann-La Roche, Ltd. (Arenskötter *et al.*, 2004). Estudios previos sugieren que microorganismos que sintetizan ácidos micólicos (MAC) son excelentes candidatos para estudiar la producción de pigmentos carotenoides (de Miguel *et al.*, 2000; Veiga-Crespo *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, sin publicar). Actualmente se cuenta con información donde varios miembros de este grupo

mostraron la capacidad para sintetizarlos (de Miguel *et al.*, 2000; Veiga-Crespo *et al.*, 2005; Pérez-García, 2009).

En el campo de la producción de colorantes la biotecnología ha incidido en forma importante en últimos años, especialmente en aquellos productos destinados a los alimentos y al interés de los consumidores y las instituciones normativas por utilizar cada vez más productos naturales (Nelis & Leenher, 1991; Veiga-Crespo *et al.*, 2005). Es por ello que alternativas microbianas son necesarias para procesos de producción, donde se pueda satisfacer la demanda creciente de éstos productos y con materias primas adecuadas (García, 1997; Demain, 2000; Veiga-Crespo *et al.*, 2005).

Las principales fuentes de pigmentos carotenoides (biocolorantes) utilizados en la industria alimentaria son la astaxantina y la cantaxantina. El presente proyecto presenta una alternativa natural para producir de pigmentos carotenoides y evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la síntesis de este tipo de pigmentos.

2.4 FILOGENIA BACTERIANA

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 DNA, 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 genealogías moleculares que conducen a árboles filogenéticos. Éstos nos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos y ha dado una pauta a una visión tripartita del mundo microbiano, los dominios:

Eucarya, Bacteria y Archea (Woese *et al.*, 1990). Con la aparición de la biología molecular y la determinación de secuencias específicas de DNA, 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 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 la cual puede ser utilizada para generar el árbol universal de la vida.

El operón del RNA ribosomal se encuentra conformado de la siguiente manera (5' → 3'): rRNA 16S, espacio de región, rRNA 23S, espacio de región y rRNA 5S (Figura 3). Los genes de la subunidad 16S rRNA son similares en longitud en todos los miembros del dominio procarionte (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 los procariontes (Madigan & Martinko, 2006).

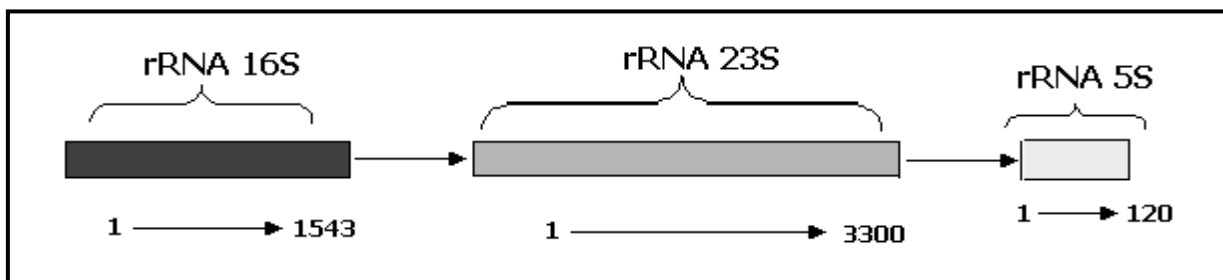


Figura 3. Operón del rRNA, cada rectángulo indica los genes del operón.

Nota: Las flechas indican la transcripción del operón, que va de izquierda a derecha y los números indican el tamaño aproximado de cada subunidad. Fuente: Maldonado, 2002.

El empleo de cebadores u oligos (primers, del inglés) universales que se unen complementariamente al inicio y final del gen del 16S rRNA permite que por medio de la cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction, del

inglés) se obtengan millones de copias que pueden ser purificadas y enviadas a secuenciar para su posterior análisis comparativo.

La PCR es un método que sirve para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de DNA a partir de cantidades muy pequeñas, amplificando exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario (Figura 4).

El secuenciamiento del DNA 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 constituyó 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 DNA de interés (Hardin, 2001).

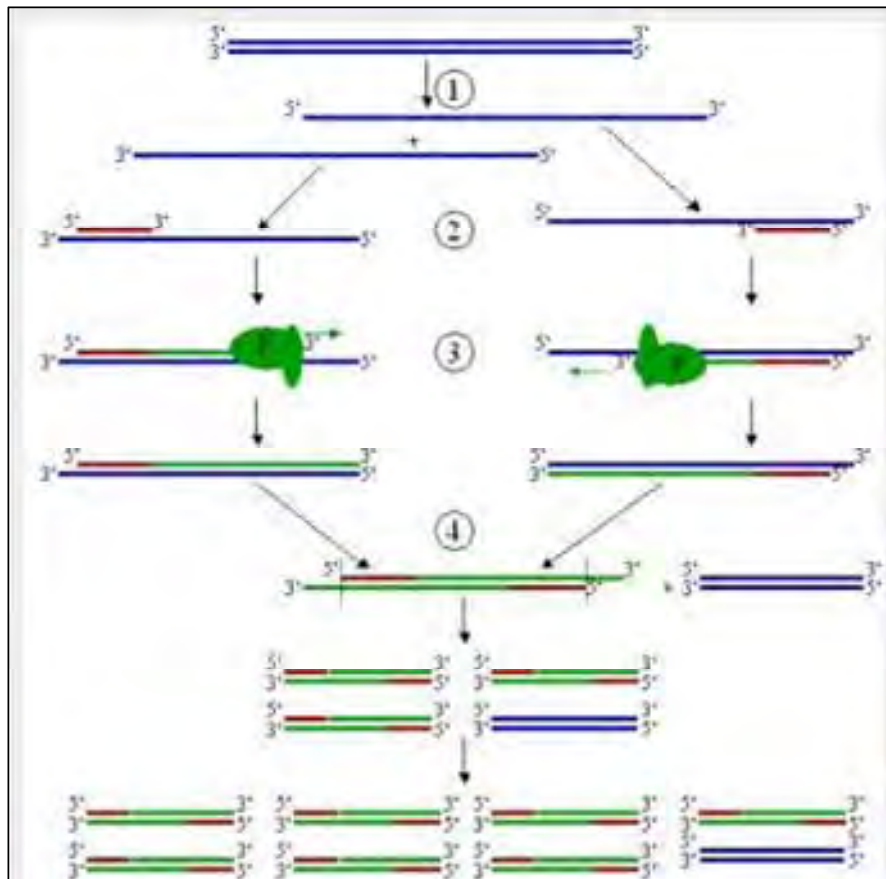


Figura 4. Diagrama de PCR. (1) Desnaturalización a 94-96 °C. (2) Hibridación a 68°C. (3) Extensión a 72°C. (4) Final del primer ciclo.

Fuente: <http://www.serc.carleton.edu/images/microbelife/research/>; Mayo 2009.

Es conocido que el ambiente alberga un vasto rango de diversidad que va desde los organismos procarióticos hasta los eucarióticos. Los primeros, son objeto de estudio del presente proyecto y llevar a cabo un adecuado estudio en un particular grupo taxonómico, se debe realizar o tener una clasificación, descripción, caracterización e identificación adecuada del mismo. Una gran parte de los criterios de clasificación dependen del crecimiento del microorganismo en diferentes fuentes de carbono, nitrógeno e incluso vitaminas y micronutrientes. Éstos deben estar en una forma metabólicamente accesible para ellos y de ahí la importancia de controlar factores como pH, temperatura, aireación y concentración de sales, entre otros.

2.5 LA CLASE *ACTINOBACTERIA*

Los actinomicetos son un grupo de bacterias que por muchos años han sido comúnmente confundidas como hongos debido a su similitud morfológica (ej. formación de hifas), tipo de reproducción y el crecimiento en medios de cultivo sólidos y líquidos. Su nombre proviene del griego *actis*: rayo de sol y *mykes*: hongo, por lo que dada su forma era fácil denominarlos “hongos radiados”. Numerosos estudios que incluyeron la comparación de secuencias ribosomales del gen 16SrRNA ribosomal ubicó a los actinomicetos dentro del dominio Bacteria y dentro del *phyla* de las bacterias Gram positivas (Figura 5a). Forman un grupo coherente filogenéticamente hablando lo que no sólo les da un significado taxonómico, sino también evolutivo (Figura 5b). La clase *Actinobacteria* es un grupo diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. En agosto del 2008, esta clase comprendía 51 familias y 253 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los actinomicetos se encuentran distribuidos en

prácticamente cualquier ecosistema, sin embargo el suelo contiene del 20 al 60% de la población actinobacteriana. El olor característico a tierra húmeda se debe a la producción de geosmina, un compuesto producido por actinomicetos y mayormente por miembros del género *Streptomyces*.

En el pasado se consideraba que las esporas producidas por algunas especies de actinomicetos eran arrastradas hacia ambientes acuáticos lo cual permitía encontrarlos en lagunas y mares. En la actualidad existe suficiente evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas del género *Salinispora* (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a éste ecosistema. Los actinomicetos muestran una innata actividad metabólica para producir antibióticos, pigmentos, terpenos y enzimas extracelulares (Lazzarini *et al.*, 2000; Bérdy, 1995).

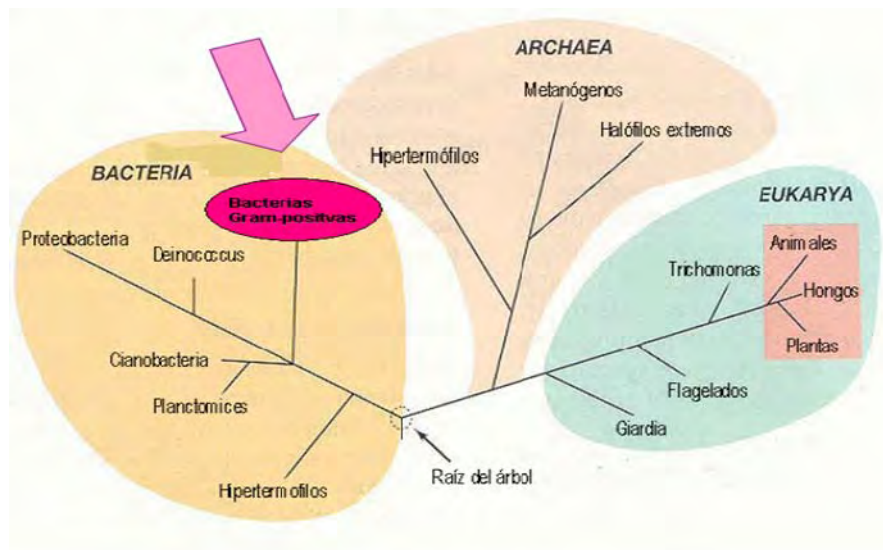


Figura 5a. Árbol de la vida construido a partir de secuencias de 16s rRNA.

Nota: Sólo algunos grupos de cada dominio son mostrados.
Fuente: Ligeramente modificada de Madigan & Martinko, 2006.



Figura 5b. Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S ribosomal.

Nota: La flecha indica la posición taxonómica de la clase *Actinobacteria* Stackebrandt *et al.* 1997 dentro de las Eubacterias.
Fuente: Madigan & Martinko, 2006.

La clase *Actinobacteria* presenta el contenido de GC más alto que se conoce en bacterias, son Gram positivas y su composición de DNA cae en el rango de 63 – 78% de Guanina y Citosina. Si bien en nuestro país éstas bacterias son pobremente estudiadas, es reconocido a nivel mundial el elevado impacto económico de este grupo bacteriano como productores prolíficos de metabolitos secundarios (-más del 70% de los antibióticos empleados en medicina provienen de éste grupo microbiano-; Bérdy, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000; Strohl, 2004; Watve *et al.*, 2001) así como poseedores de rutas metabólicas únicas relacionadas con la formación de compuestos carotenoides (Tao *et al.*, 2007). Lo anterior es ejemplificado por los géneros *Gordonia* (Figura 6; Arenskötter *et al.*, 2004; De Miguel *et al.*, 2000, 2001; Goodfellow & Maldonado, 2006) y *Rhodococcus* (Tao & Cheng, 2004; Goodfellow & Maldonado, 2006).

Se reconocen mundialmente tres géneros de la clase *Actinobacteria* como los predominantes en el ambiente marino, estos son: *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 mostrando que la biodiversidad actinobacteriana presentes en sedimentos marinos es por mucho, mayor a la que se estimaba y que no esta limitada a tres géneros únicamente (Stach *et al.*, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005b).

2.6 EL GÉNERO *GORDONIA*

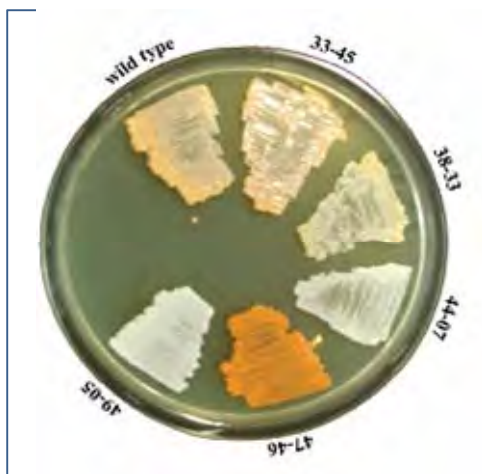


Figura 6. Mutantes con biosíntesis de carotenoides.

Fuente: Arenskötter *et al.* 2004.

El género *Gordonia* se ubica filogenéticamente en el suborden *Corynebacterineae* del orden *Actinomycetales*, en la clase *Actinobacteria*. En 1971, Tsukamura (un destacado actinomicetólogo japonés) propuso *Gordona* (*sic*) como un nuevo género para una bacteria corineforme aislada del esputo de pacientes con enfermedad

pulmonar. El nombre para este nuevo género fue elegido para honrar a la bacterióloga americana Ruth E. Gordon y su contribución a la biología de los actinomicetos; miembros de éste género presentaban características únicas. Después de seis años del nombramiento, Goodfellow y Anderson hicieron cambios de clasificación a partir de las diferencias presentadas en miembros de este género y organismos cercanamente relacionados, respecto a la composición de

ácidos micólicos, menaquinonas y el análisis del gen 16S rRNA. En 1997 Stackebrandt *et al.* proponen una corrección etimológica para el nombre *Gordona* la cual se corrige como *Gordonia* de acuerdo a la clasificación para la clase *Actinobacteria*.

Los miembros del género *Gordonia* son aeróbicos, Gram positivos, inmóviles, catalasa positiva, con metabolismo oxidativo para carbohidratos y no forman esporas. La morfología de las especies es variada respecto a su viscosidad, brillo, y tipo de superficie (lisa o rugosa), éstas van desde butiraceas pegajosas hasta cremosas rugosas dependiendo del medio de crecimiento. Microscópicamente pueden presentarse en forma de bacilos o cocos, incluso ambas. Los colores de las colonias descritas son amplios, incluyen blanco, amarillo, anaranjado, rojo marrones y rosa. En su pared celular contienen arabinosa y galactosa, lípidos polares compuestos por difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, algunas contienen menaquinonas dihidrogenadas con unidades variables de isopreno. Estas propiedades así como la longitud de las cadenas de los ácidos micólicos presentes en su pared celular son las que separan al género *Gordonia* de otros cercanamente relacionados como son *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Skermania*.

La membrana citoplasmática de los MAC está compuesta típicamente de fosfolípidos y proteínas además de una compleja membrana externa. Esta compleja membrana externa está unida a la membrana citoplasmática por una pared de polisacáridos (arabinogalactano-arabinomananas) que se “anclan” directamente sobre la pared del peptidoglicano (Figura 7).

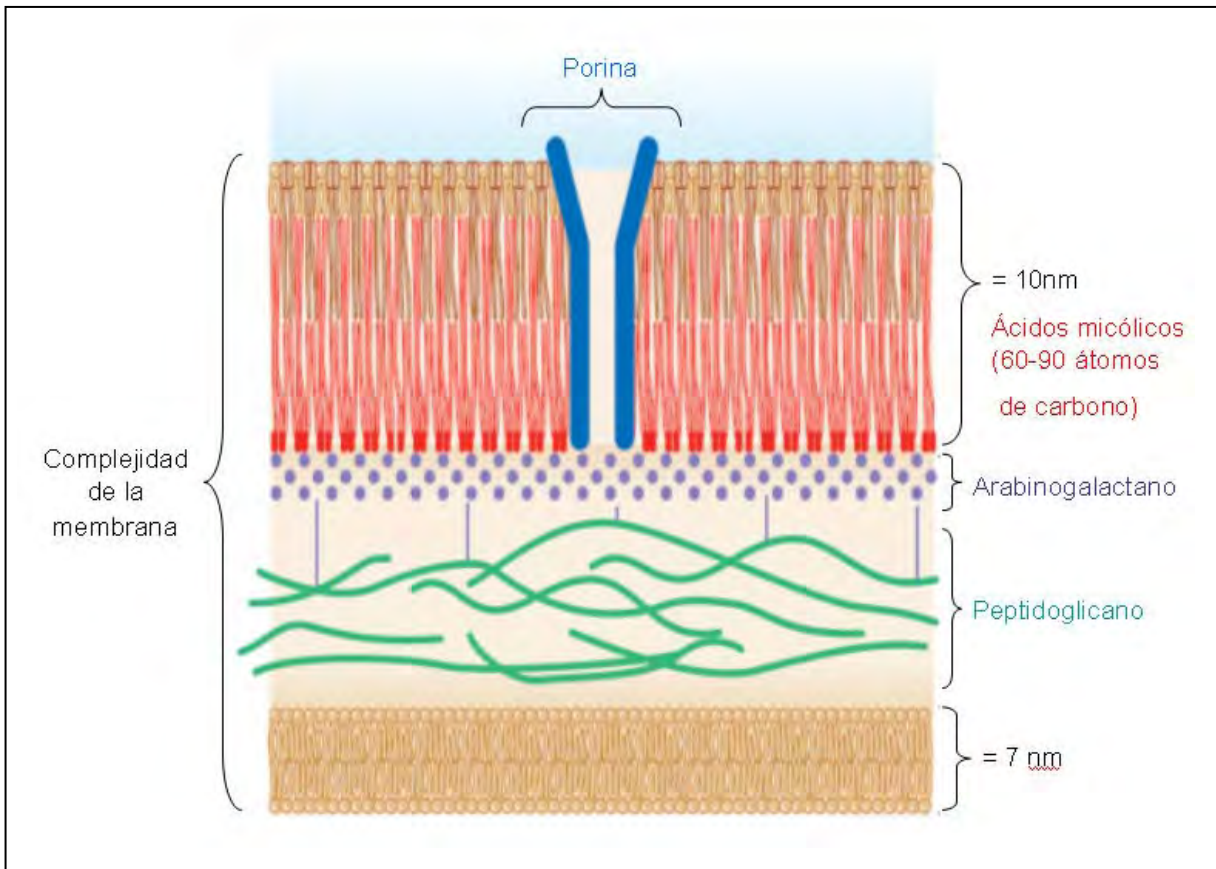
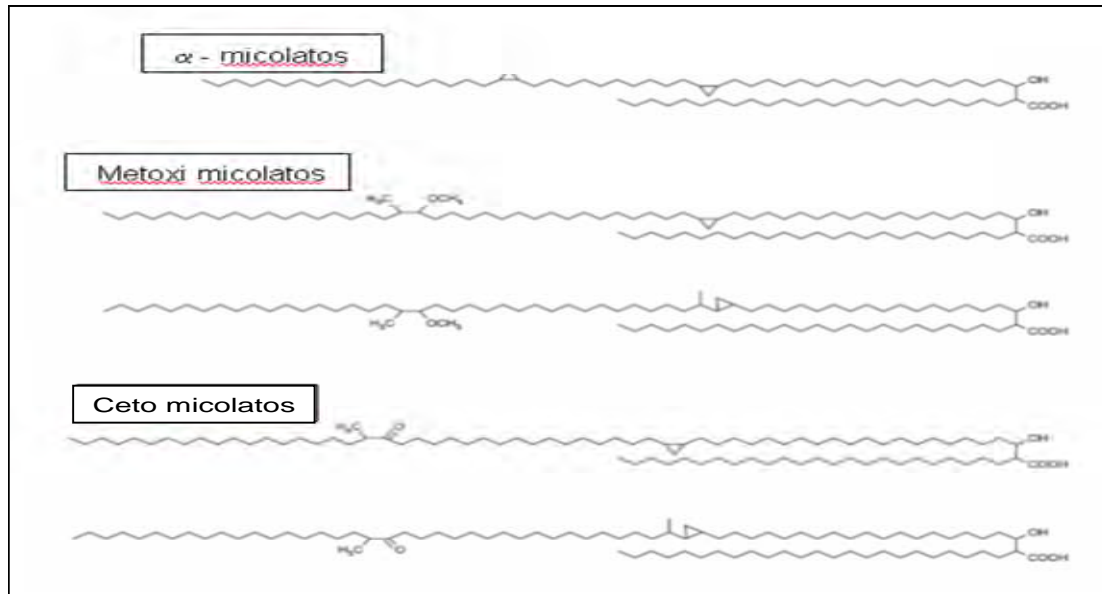


Figura 7. Esquema de pared celular de *Mycobacterium*

Fuente: Modificado de Saier, 2008

La pared más externa presenta estructuras solamente reportadas en bacterias Gram negativas ya que los sistemas de permeabilidad dependen exclusivamente de la presencia de porinas y de las estructuras únicas de estos taxa conocidas como “ácidos micólicos”. Los ácidos micólicos (reportados por



primera vez en *Mycobacterium* spp y de ahí el nombre) son cadenas largas de ácidos grasos α -alquil, β -hidroxi de longitudes hasta de cincuenta y seis carbonos -C₅₆- y una cadena α de longitud de C₂₀ a C₂₄. La longitud de la cadena de los ácidos micólicos varía de acuerdo al género. Mientras que *Mycobacterium* presenta la cadena más larga (de C₇₀ a C₉₀), *Nocardia* y *Rhodococcus* presentan cadenas de C₄₀ a C₆₄ y *Gordonia* de C₄₈ a C₆₆ (Goodfellow & Maldonado, 2006). Algunas estructuras químicas de los diferentes ácidos micólicos de miembros de los MAC se muestran en la siguiente figura.

Figura 8. Ácidos micólicos presentes es miembros MAC.

Fuente: Modificado de Saier, 2008.

Éstos son también largas cadenas de hidrocarburos con ligaduras sencillas y dobles conjugadas en un arreglo denominado “sistema de doble bandas conjugadas”. Los tipos y estructuras de carotenoides son los responsables de los colores de estos microorganismos pues son, precisamente, componentes también de su membrana celular.

Algunos miembros de este género presentan la capacidad innata de sintetizar compuestos carotenoides y es conocida la presencia de este grupo microbiano en los ecosistemas tanto terrestres como marinos. La presencia de estos microorganismos en el ecosistema marino ha sido reportada por Colquhoun *et al.* (2000) y Maldonado *et al.* (2005b). Sin embargo en ninguno de los estudios antes mencionados México o sus ecosistemas fueron estudiados. Por lo anterior, nuestro estudio para explorar los recursos microbianos acuáticos aislados del país representa una novedad y originalidad.

La capacidad para producir pigmentos naturales (carotenoides) en el género *Gordonia* ha sido pobremente estudiada con excepción de la generación de mutantes con la biosíntesis de carotenoides modificada (Arenskötter *et al.*, 2004). Miembros de este género contienen ácidos micólicos de 48 a 66 átomos de carbono y actualmente comprende 26 especies válidamente descritas las cuales se muestran en la Tabla 1.

El aislado nombrado '*Gordonia jacobaea*' MV-1 es un sintetizador de cantidades significativas de pigmentos carotenoides (Veiga-Crespo *et al.*, 2005). Ésta especie produce aproximadamente 200 microgramos de ketocarotenos todos *trans*-cantaxantina por gramo de microorganismo y pequeñas cantidades de *trans*-astaxantina. Por lo anterior, la presente propuesta de investigación pretende evaluar miembros del género *Gordonia* aislados de ambientes marinos en México, como productores biológicos de pigmentos carotenoides de posible aplicación a la industria alimentaria.

Los actinomicetos del género *Gordonia* han adquirido un alto interés en años recientes por varias razones; muchas especies muestran la capacidad de degradar compuestos xenobióticos y contaminantes ambientales. Varias especies de *Gordonia* han sido caracterizadas dada su habilidad para desulfurizar el dibenzotiofeno o el benzotiofeno, usados como combustible inclusive algunas han sido estudiadas por su capacidad de degradar polímeros naturales y sintéticos (Arenskötter *et al.*, 2004).

Tabla 1. Especies del género *Gordonia* dentro de la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI, del inglés).

	Nombre de la especie	Color de la colonia	Longitud de ácidos micólicos	Sitio de aislamiento	Número de acceso en base de datos
1	<i>G. aichiensis</i>	Rosa a anaranjado	56-66	Muestra de esputo de paciente	X80633
2	<i>G. alkanivorans</i>	Anaranjado a Rojo anaranjado	47-58	Suelo contaminado de una fábrica en Alemania	Y18054
3	<i>G. amarae</i>	Blanco a beige	46-56	De espuma en superficie de tanques de aireación de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales	X80635
4	<i>G. amicalis</i>	Rojo	48-58	Suelo de jardín en Rusia	AF101418
5	<i>G. araii</i>	Blanco a beige	64-70	Muestra de paciente con disfunción renal	AB182800
6	<i>G. bronchialis</i>	Café	54-66	Muestra de esputo de paciente con enfermedad pulmonar	X75903
7	<i>G. defluvii</i>	No determinado	ND	De espuma tomada de tanques de lodo activado en Australia	AY650267
8	<i>G. desulfuricans</i>	Rosa	56-64	De suelo con muestra aceitosa cerca de minas en desuso en Escocia	AF101416
9	<i>G. effusa</i>	Blanco a beige	56-64	De paciente con enfermedad pulmonar	AB162799
10	<i>G. hirsuta</i>	Blanco- amarillo claro	60-64	De composta cerca de un biocontenedor	X93485
11	<i>G. hydrophobica</i>	Blanco a beige	54-62	De composta cerca de un biocontenedor	X87340
12	<i>G. lacunae</i>	Rosa-anaranjado	ND	De arena tomada de estuario en África	EF151959
13	<i>G. malaquae</i>	Ligeramente crema	ND	De lodo tomado de una planta de sedimentos	AM406674
14	<i>G. namibiensis</i>	Anaranjadas- rojo-rosa	54-62	De suelo de Namibia	AF380930
15	<i>G. otitidis</i>	Blanco- anaranjado pálido	58-64	De un paciente con otitis y bronquitis	AB122026
16	<i>G. paraffinivorans</i>	Anaranjada-rojo	52-62	De muestra de agua de un yacimiento petrolífero en China	AF432348
17	<i>G. polyisoprenivorans</i>	Crema beige- anaranjado pastel	58-64	Aislada de los desechos de una llantera alemana	Y18310
18	<i>G. rhizosphaera</i>	Rosa-Anaranjado	56-64	Aislada de la rizósfera de una planta cerca de un lago	AB004729
19	<i>G. rubripertincta</i>	Anaranjado a Rojo	48-62	Del suelo	X80632
20	<i>G. shandongensis</i>	Amarillo claro	ND	Del suelo de una granja en China	DQ420167
21	<i>G. sihwensis</i>	Blanco	48-56	Aislada de un reactor desnitrificador para tratamiento de agua en un lago en Corea	AJ416151
22	<i>G. sinesedis</i>	Crema	58-62	De suelo adyacente al río Támesis	AF380834
23	<i>G. soli</i>	Anaranjado pálido	ND	De suelo tomado de la universidad Chung Hsing en Taiwan	AY995560
24	<i>G. sputi</i>	Rosa	56-66	De muestra de esputo humano	X80634
25	<i>G. terrae</i>	Rosa a Anaranjado	52-64	De suelo	X79286
26	<i>G. westfalica</i>	Anaranjado pastel	54-62	Aislada de los desechos de una llantera alemana	AJ312907

Nota: ND, No determinado.

Éste género también es capaz de producir varios compuestos como la L-lisina (aminoácido) y algunos de sus análogos. También algunas cepas de *Gordonia* producen biosurfactantes como la cepa 321 (Arenskötter *et al.*, 2004) que produce expo-polisacáridos que ayudan reducir la actividad en la superficie de algunos medios de cultivo. Existen especies de *Gordonia* que por su color en su morfología colonial macroscópica muestran la capacidad de producir pigmentos del tipo carotenoides. Algunos de estos son empleados como aditivos alimentarios para la alimentación de aves y peces (Nelis & Leenher, 1991). Por lo que hablar de este género, es hablar de grandes posibilidades de aplicación dentro de la industria biotecnológica (Arenskötter *et al.*, 2004).

Existen reportes (aproximadamente 20 casos) de especies de *gordonias* patógenas. Sin embargo, las infecciones causadas por especies de éste género son menores en comparación con aquellas causadas por oportunistas patógenos como los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*.

2.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hecho de que hoy en día la industria alimentaria requiera sustituir algunos de sus ingredientes en particular los colorantes sintéticos por productos de origen natural y a que la demanda de éstos se ha visto favorecida, nos permite proponer el presente proyecto para estudiar microorganismos aislados de sedimentos marinos del Golfo de México como una alternativa importante para la obtención de biocolorantes (carotenoides).

Utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y diferentes concentraciones de éstos, el presente proyecto evaluó su efecto para la producción o síntesis de colorantes naturales del tipo carotenoide. Reportes recientes sugieren que algunos miembros de la clase *Actinobacteria* y en específico aquellos del género *Gordonia* cuentan con la capacidad innata de producir estos compuestos. En suma a lo anterior se sabe que los carotenoides tienen un efecto positivo en la salud humana y que éstos generan ganancias millonarias en el mercado mundial por lo que el presente trabajo de investigación estudió que diferentes pigmentos se producen por el género *Gordonia* en función de la fuente de carbono o nitrógeno utilizada así como la concentración de éstos; proponiéndose lo anterior como una alternativa para la obtención de dichos productos en el sector alimentario.

Si tomamos en cuenta que los mares representan un vasto e importante campo de estudio y que tenemos ante nosotros un gran campo para la investigación en particular de microorganismos entonces debido a que nuestro país cuenta con un amplísimo territorio marítimo y que en estudios recientes se han encontrado actinobacterias en sedimentos marinos del Golfo de México es momento de aprovechar este recurso no sólo para investigación, sino, para la obtención de productos microbianos de alto valor agregado y ¿por qué no? establecernos como pioneros de este tipo de investigaciones en México.

2.8 OBJETIVOS

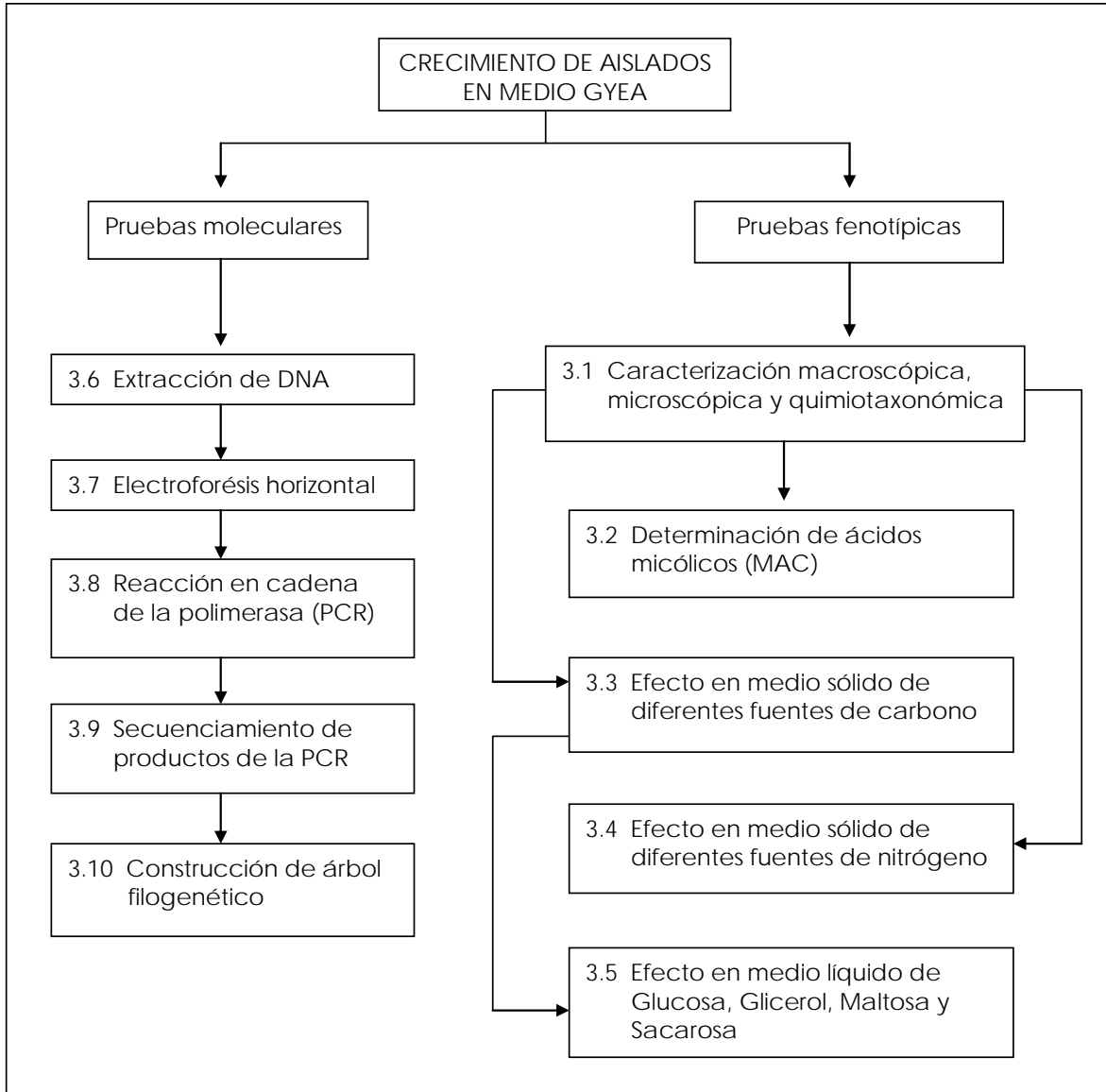
1. Caracterizar fenotípica y quimiotaxonómicamente microorganismos aislados del Golfo de México del subgrupo microbiano MAC
2. Evaluar en medio sólido el efecto de diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones de éstas para la producción de pigmentos carotenoides en miembros del subgrupo microbiano MAC
3. Evaluar en medio sólido el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes concentraciones de éstas para la producción de pigmentos carotenoides en miembros del subgrupo microbiano MAC
4. Seleccionar tres fuentes de carbono o nitrógeno así como las concentraciones de éstas para evaluar en medio líquido su efecto en la producción de pigmentos carotenoides en miembros del subgrupo microbiano MAC
5. Determinar las condiciones óptimas para la producción de pigmentos carotenoides de las actinobacterias estudiadas
6. Determinar el género y la especie de los microorganismos estudiados mediante PCR, secuenciamiento y BLAST
7. Construir el árbol filogenético correspondiente con las secuencias obtenidas de los microorganismos estudiados

2.9 HIPÓTESIS

Diferentes fuentes de carbono y nitrógeno así como diferentes concentraciones de éstas permitirán determinar su efecto para la producción de pigmentos carotenoides en bacterias del género *Gordonia* aisladas del Golfo de México

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

El siguiente diagrama muestra la estrategia experimental diseñada para el presente proyecto y cada uno de los pasos se detalla posteriormente.



3.1 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA Y QUIMIOTAXONÓMICA

Se aislaron cuatro actinomicetos en medio M3 utilizando métodos clásicos para aislamiento de microorganismos a partir de una muestra de sedimento marino recolectada en el Golfo de México a 500 metros de profundidad con la ayuda de una draga durante la campaña oceanográfica BIOREPES-2005 (Maldonado, comunicación personal). Los aislados se identificaron como: 32a.10.25, 35b.12.15, 32a.10.22 y 32a.10.14, respectivamente. Las cepas de referencia que se utilizaron durante el desarrollo del estudio fueron *Gordonia sihwensis* DSM 44576^T, *Rhodococcus corynebacteroides* DSM 20151^T y *R. jostii* DSM 44719^T. La caracterización de los aislados en conjunto con las cepas de referencia se llevó a cabo sembrándolas por estría cruzada en cajas de Petri de plástico estéril (90 x 15 mm; SyM, México) con medio Glucosa-Extracto de Levadura (GYEA, del inglés) de acuerdo con procedimientos establecidos por Goodfellow & Maldonado (2006). Las cajas Petri se incubaron durante 10 días a 30 °C en un incubador aerobio (Barnstead, USA). Al término de éste tiempo la caracterización parcial de cada aislado se realizó observando y registrando su morfología macroscópica colonial basada en las características que se muestran en el Anexo A, realizando la tinción de Gram con el método universalmente conocido y descrito en el Anexo B y evaluando y registrando la producción de pigmentos carotenoides si la colonia presentaba un color amarillo-, naranja- o rojo-

3.2 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS MICÓLICOS

100 µg de perlas de vidrio (106 micrómetros de diámetro y lavadas con ácido; Sigma, USA) se adicionaron en crio-viales de plástico (Axygen, USA; 2.0 mL) previamente esterilizados y etiquetados de acuerdo a la clave del aislado. Un mL de solución de hidróxido de tetrabutil amonio al 5% (TBHA, del inglés; Sigma-Aldrich, USA) se agregaron a cada crio-vial. Un asa de biomasa de cada

microorganismo crecido por 10 días a 30 °C en medio GYEA se introdujo en cada crio-vial. Éstos se mezclaron en un Vórtex (Daigger, USA) a máxima velocidad durante 10 minutos. Posteriormente se colocaron en un horno de convección a 100 °C durante 4 horas. Terminado este tiempo se retiraron del horno y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Los crio-viales se centrifugaron a 6000 rpm en una centrífuga Mini-Spin (Eppendorf, USA) durante 5 minutos. Posteriormente y con la ayuda de una micropipeta P20 (Gilson, Francia) se extrajo el sobrenadante el cual se transfirió a un crio-vial al cual previamente se le agregó 1 mL de diclorometano (Sigma, México) y 25 µl de yodometano (Sigma, USA). Los crio-viales se agitaron en un rotador de ángulo ajustable (Rotator AG, Daigger, USA) por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. La fase superior fue retirada con una pipeta Pasteur (Sigma, México) para cada muestra e inmediatamente después de su uso se desecharon. La fase orgánica (fase inferior) se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y estéril (ca. 1.5 mL; Axygen, USA) secando el extracto en un baño seco ajustado a 37 °C. Una pastilla seca de color naranja al final de secado constituye la porción extraída de los ácidos micólicos (MAC, del inglés).

Los MAC se reconstituyeron adicionando 50 µl de éter de petróleo 60-80 (Sigma, USA). Para observar la correcta extracción de los ácidos micólicos se realizó cromatografía de capa fina (TLC, del inglés) utilizando una placa de aluminio de 10 x 10 cm cubierta con sílica Gel 60 y factor F₂₅₄ (Merck, Alemania). Una línea de 1 cm a partir de la base del borde de la placa se dibujó utilizando un lapicero de 0.5 mm. Esta línea se dividió horizontalmente de acuerdo al número de muestras y con un espacio de 1 cm entre cada muestra. Una alícuota de 3 µl de cada extracto se aplicó en la placa de TLC por medio de micropipeta P2 (Gilson, Francia) aplicando una gota por vez y secándola por cinco segundos posterior a su aplicación con una secadora de cabello (modelo 165ES Conair, China). Lo anterior para evitar que la muestra se extendiera sobre la placa. La aplicación de la muestra se realizó repetidamente hasta completar los tres microlitros.

Como solución reveladora se utilizó una solución de éter de petróleo:acetona en una proporción 95:5 (v/v) la cual se colocó en un tanque para revelado de vidrio (Sigma, USA) y se permitió la saturación del tanque por 15 minutos. Posteriormente se colocó la placa de TLC. La placa se retiró del tanque una vez que la solución reveladora llegó a final de la placa y se dejó secar en una campaña de extracción durante 15 minutos. Lo anterior se repitió dos veces con la finalidad tener una correcta separación de los ácidos micólicos. Para la visualización de los ácidos micólicos la placa se roció con una solución de ácido molibdofosfórico al 5% disuelta en etanol preparado al 95% (Sigma, USA). La placa se dejó secar nuevamente por 15 minutos y posteriormente se calentó en un horno de convección a 100 °C durante 3 minutos. La presencia de los ácidos micólicos se confirmó al observar puntos oscuros en un fondo amarillo-verdoso. El r_f de cada muestra se registró comparándolos con aquellos de las cepas de referencia.

3.3 EFECTO EN MEDIO SÓLIDO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Biomasa de cada aislado se sembró por estría simple en cajas Petri de plástico estériles conteniendo agar GYEA , al cual se le sustituyó a la glucosa por cada una de las 9 fuentes de carbono empleadas (Tabla 2) y tres concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0%). La preparación de cada uno de los medios se encuentra detallada en el Anexo C.

Todos los medios se esterilizaron a 121°C a una presión de (1.6 kg/cm²) durante 15 minutos. Una vez completado el tiempo se dejaron enfriar a 45 °C aproximadamente, vaciando el medio en cajas Petri, previamente etiquetadas, dentro de una campana de flujo laminar horizontal (Mycotech, México).

El crecimiento y la pigmentación de cada microorganismo a los 7, 14 y 21 días de incubación, fueron evaluados para cada fuente de carbono y sus respectivas concentraciones, comparándolas con el control positivo (medio con glucosa).

3.4 EFECTO EN MEDIO SÓLIDO DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Cada uno de los aislados se sembró por estría simple en cajas Petri de plástico estériles (90 x 115 mm) las cuáles contenían el medio basal suplementado con cada una de las diferentes fuentes de nitrógeno (Tabla 3) y tres concentraciones (0.1, 0.5 y 1 %). El medio GYEA se utilizó como medio basal retirando de la formulación el extracto de levadura (Anexo C).

Tabla 2. Monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, alcoholes y polialcoholes empleados.

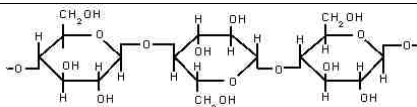
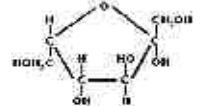
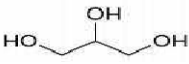
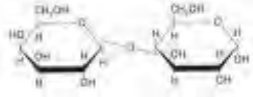
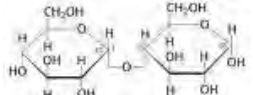
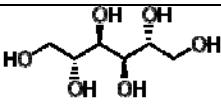
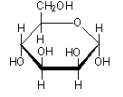
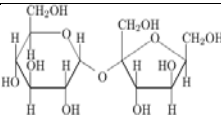
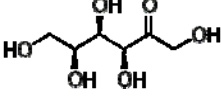
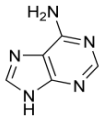
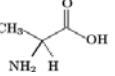
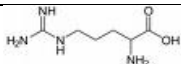

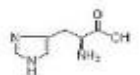
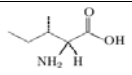
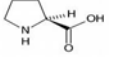
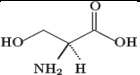
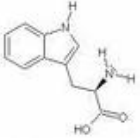
Fuente de carbono	Fórmula Química	Tipo
Celulosa		Polisacárido
Fructosa		Monosacárido
Glicerol		Alcohol
Lactosa		Disacárido
Maltosa		Disacárido
Manitol		Polialcohol
Manosa		Monosacárido
Sacarosa		Disacárido
Sorbosa		Monosacárido

Tabla 3. Aminoácidos, bases nitrogenadas e inminoaminoácidos empleados.

Fuente de nitrógeno	Fórmula Química	Tipo
Adenina		Base nitrogenada
L-Alanina		Aminoácido neutro
L-Arginina		Aminoácido básico
L-Fenilalanina		Aminoácido aromático
L-Histidina		Aminoácido básico
L-Isoleucina		Aminoácido neutro
L-Prolina		Inminoaminoácido
L-Serina		Aminoácido neutro
L-Triptófano		Aminoácido aromático

Los medios se esterilizaron a 121°C a una 15 lb de presión (1.6 kg/cm²) durante 15 minutos. Una vez completado el tiempo de esterilización, los medios se enfriaron a 45 °C aproximadamente, vaciando el medio en cajas Petri, previamente etiquetadas, dentro de una campana de flujo laminar horizontal.

La pigmentación de cada uno de los microorganismos en cada fuente de nitrógeno y en cada concentración fue evaluada a los 7, 14 y 21 días.

3.5 EFECTO EN MEDIO LÍQUIDO DE GLUCOSA, GLICEROL, MALTOSA Y SACAROSA

Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono en medio líquido se tomaron en consideración los cambios macroscópicos visibles frente a las fuentes de carbono en el medio sólido (punto 3.3 de este documento). Las fuentes de carbono seleccionadas para el medio líquido fueron Glucosa (como medio de referencia), glicerol, maltosa y sacarosa.

Los medios líquidos preparados se colocaron en alícuotas de 100 mL en matraces Erlenmeyer de vidrio con tapón de algodón y cubiertos con capuchones de papel aluminio. Posteriormente se sometieron a esterilización a 121°C a 15 lb de presión (1.6 kg/cm²) durante 15 minutos.

Los medios fueron inoculados en una campana de flujo laminar horizontal colocando en cada matraz un asa de cada microorganismo en estudio, los cuales previamente se sembraron e incubaron en medio GYEA a 30 °C por 7 días. Una vez inoculados los matraces se incubaron en un agitador de temperatura ajustable (New Brunswick Scientific, USA; anexo del laboratorio B de la Facultad de Química) a 30 °C y 220 rpm. La coloración- pigmentación de cada aislado creciendo en el medio líquido se observó cada tercer día hasta un periodo de 21 días. El color y biomasa producida se registraron evaluando la pigmentación (amarilla-, naranja-, rosa- o roja) de cada aislado y tomando fotografías de cada matraz.

3.6 EXTRACCIÓN DE DNA

Se prepararon y etiquetaron tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml para cada aislado, con 100 μg de perlas de vidrio (SIGMA, USA) y 500 μl de Búffer Glucosa-Tris-EDTA. Posteriormente a cada tubo se adicionaron dos asas de biomasa fresca. Los tubos se mantuvieron a 4 °C durante 12 horas. Al término de dicho tiempo los tubos se agitaron constantemente durante 15 minutos a máxima velocidad en un Vórtex (DAIGGER, USA). Los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, USA). El líquido de cada tubo (400-500 μl , aproximadamente) se transfirió a nuevos tubos Eppendorf estériles (1.5 ml). Los tubos con las perlas de vidrio y la biomasa residual se desecharon. A los nuevos tubos se les adicionó Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25: 24: 1; v/v; Sigma-Aldrich, USA) en proporción 1:1 respecto al volumen de líquido transferido. Los tubos con los dos componentes se mezclaron en un Vórtex a velocidad máxima durante 5 minutos para posteriormente centrifugarlos a 14,000 rpm durante 15 minutos y este paso se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril (1.5 ml) y los ácidos nucleicos se precipitaron con la adición de etanol absoluto (100%) frío en una relación 2:1 (v/v). Los tubos con alcohol se invirtieron suavemente 3 veces y se centrifugaron a una velocidad de 14,500 rpm por 15 minutos. El líquido residual se decantó y la pastilla de DNA (formada en el fondo del tubo) se lavó con 200 μl de etanol absoluto al 70%, repitiendo este paso 2 ocasiones. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 14,500 rpm y se decantó el etanol "*de lavado*". Los tubos se dejaron secar colocándolos de manera invertida sobre papel absorbente a temperatura ambiente por 12 horas. La reconstitución del DNA se llevó a cabo adicionando entre 80-100 μl de búffer Tris-EDTA 1X (TE). El DNA extraído se visualizó mediante una electroforesis horizontal la cual se describe en detalle a continuación.

3.7 ELECTROFORESIS HORIZONTAL

Se pesó 1 g de agarosa en balanza granataria y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de Buffer Tris-Boratos-EDTA 0.5X (TBE). La agarosa se disolvió por calentamiento en un horno de microondas hasta obtener una solución cristalina (de 60 a 80 segundos a temperatura alta, aproximadamente). La solución cristalina se dejó enfriar por 10 minutos en una campana de extracción y posteriormente se le agregaron 0.4 μ l de Bromuro de Etidio. La solución se agitó vigorosamente, se vació en una charola de electroforesis (Sigma, UK) y se dejó enfriar para permitir su completa polimerización.

La charola de electroforesis se colocó en una cámara de electroforesis cubriendo el gel en su totalidad con búffer TBE 0.5X. Se mezclaron entonces 4 mL muestra de DNA y 4 mL de búffer de carga que se agregaron en cada pozo del gel con la ayuda de una micropipeta Gilson de 20 microlitros (Gilson, Francia). El marcador molecular (1 μ L) de peso molecular 1kb (Invitrogen, USA) se colocó en el último pozo del gel. La cámara de electroforesis se ajustó a 100 Volts y el gel se dejó correr por 30 minutos. Una vez terminado el tiempo, el gel se observó en un transiluminador (Uvitec, UK) y la imagen capturada con un fotodocumentador (Bio-imaging systems, UK).

3.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del gen 16S rRNA de cada muestra se realizó utilizando los cebadores (primers) universales 27f y 1525r (Lane, 1991). La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 μ l de acuerdo a lo descrito en el Anexo D. La amplificación se realizó en un Termociclador (Techne, USA), bajo el programa 55-45-45-60. El producto de la PCR se observó realizando una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, a 100 Volts durante 30 minutos.

Una segunda amplificación para PCR pero empleando oligonucleótidos específicos para el género *Gordonia* (G1f y G2r, Dr. Gonzalo Cuesta, Universidad Politécnica de Valencia, comunicación personal), se llevó a cabo en un Termociclador (Techne, USA) bajo el programa Gord 68 45 x 3. El producto de amplificación se observó realizando una electroforesis horizontal en las mismas condiciones que se mencionaron previamente y permitió establecer rápidamente la identidad (a nivel de género) de los aislados mientras se esperaban los resultados del secuenciamiento.

3.9 SECUENCIAMIENTO DE PRODUCTOS DE LA PCR

Los productos de PCR para el gen 16S rRNA se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología (UNAM, C.U., D.F.). El secuenciamiento de las muestras se llevó a cabo en un secuenciador capilar (Applied Biosystems, USA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes y bajo las condiciones de la M. en C. Laura Márquez, responsable de la unidad de secuenciamiento de dicho Instituto.

3.10 CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO

Las secuencias nucleotídicas obtenidas del secuenciamiento se observaron y visualizaron con el programa Chromas (Technelysium Pty Ltd, Australia) que permite observar el cromatograma de la secuencia obtenida. Este texto se importó al programa Phydit que permite alinear con base en la estructura secundaria del gen 16S rRNA (Maldonado, comunicación personal). Para la comparación de las secuencias obtenidas, se accedió a la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information, (NCBI, del inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las secuencias correspondientes de aquellas especies de *Gordonia* y poder realizar una comparación, previo empleo de la opción BLAST de dicho sitio para encontrar las secuencias mas relacionadas

a las del presente estudio. Las secuencias se alinearon y se creó una matriz de similaridad entre especies del género *Gordonia* y los aislados del presente trabajo. Se construyó un árbol filogenético con base en el método del “vecino más cercano” (Neighbor-Joining; Saitou & Nei, 1987). La estabilidad del árbol filogenético resultante se estableció realizando 1000 réplicas según el análisis del bootstrap de acuerdo a lo sugerido por Felsenstein (1985).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA

La morfología macroscópica colonial de los cuatro microorganismos en estudio: 32a.10.25, 35b.12.15, 32a.10.22 y 32a.10.14, así como las cepas de referencia: *Gordonia sihwensis* DSM 44576^T, *Rhodococcus jostii* DSM 20151^T y *R. corynebacteroides* DSM 44719^T se evaluó en medio GYEA. El color del pigmento producido macroscópicamente por cada cepa de referencia, es decir, amarillo claro, amarillo fuerte, naranja claro, naranja fuerte, rosa claro, rosa intenso, rojo claro o rojo intenso se tomó como referencia de la producción de pigmentos tipo carotenoides. La Tinción de Gram se realizó para cada aislado.






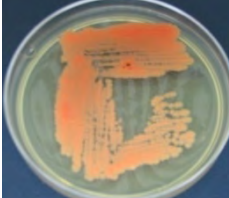
Se puede observar en la Tabla 4 la producción de pigmentos carotenoides en los cuatro microorganismos de estudio, cuando éstos se comparan con las cepas de referencia. La pigmentación de los aislados a simple vista, en algunos casos, es mayor a la de algunas cepas de referencia. La morfología y Gram de cada aislado y cepas de referencia se indican en la Tabla 4.

La morfología macroscópica de cada uno de los aislados corresponde o es similar a aquellas de las cepas de referencia. Ninguno de los aislados muestra formación de esporas. En tres de los aislados el crecimiento fue muy similar, en particular para los aislados 35b.12.15 y 32a.10.14.

Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados y cepas de referencia.

Microorganismo	Descripción morfología microscópica y Gram	Morfología y descripción colonial macroscópica
<i>Gordonia sihwensis</i> DSM 44576 ^T	Bacilos y cocos, positivos.	Corrugada, pastosa, mate. Amarillo-ligero
<i>Rhodococcus jostii</i>	Bacilos y cocos,, positivos.	Corrugada, seca, cremosa.



DSM 20151^T		Amarillo-muy ligero	
<i>Rhodococcus corynebacteroides</i> DSM 44719^T	Cocos, positivos	Ladrillada, extremadamente seca, opaca. Naranja intenso-rojo	
Aislado 32a.10.25	Cocos, positivos	Arrugada, poco brillante. Naranja fuerte-rojo claro.	
Aislado 35b.12.15	Bacilos, positivos	Arrugada, corrugada, mate. Naranja-rosa	
Aislado 32a.10.22	Cocos, positivos	Corrugada, cremosa, seca. Naranja fuerte	
Aislado 32a.10.14	Bacilos y cocos, positivos	Arrugada, cremosa, mate. Naranja claro-naranja intenso	

Nota: Todas las evaluaciones micro-macroscópicas se realizaron con microorganismos (cepas de referencia y aislados) a los 14 días de crecimiento.

El aislado que presentó un comportamiento ligeramente diferente fue el 32a.10.22 que en su superficie muestra arrugas u ondulaciones. Sin embargo, es interesante que el pigmento observado para cada aislado es distinto, siendo estas coloraciones desde un anaranjado fuerte hasta un naranja-rojizo. Para el caso de las cepas de referencia, los pigmentos presentan coloraciones desde amarillo-claro hasta un naranja-fuerte. Respecto a la caracterización microscópica se

observa en general dos tipos de morfologías: cocos y bacilos, lo que ocurre en general dentro de miembros de las actinobacterias.

4.2 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS MICÓLICOS

Todos los aislados en estudio presentaron ácidos micólicos en la pared celular cuando se compararon con las cepas de referencia. En la figura 9 se observan los puntos oscuros que corresponden a los MAC(→), los cuales presentan una cadena hidrocarbonada de alto peso molecular; sin embargo los FAMES separados de la mezcla se observan en la parte superior de la placa.

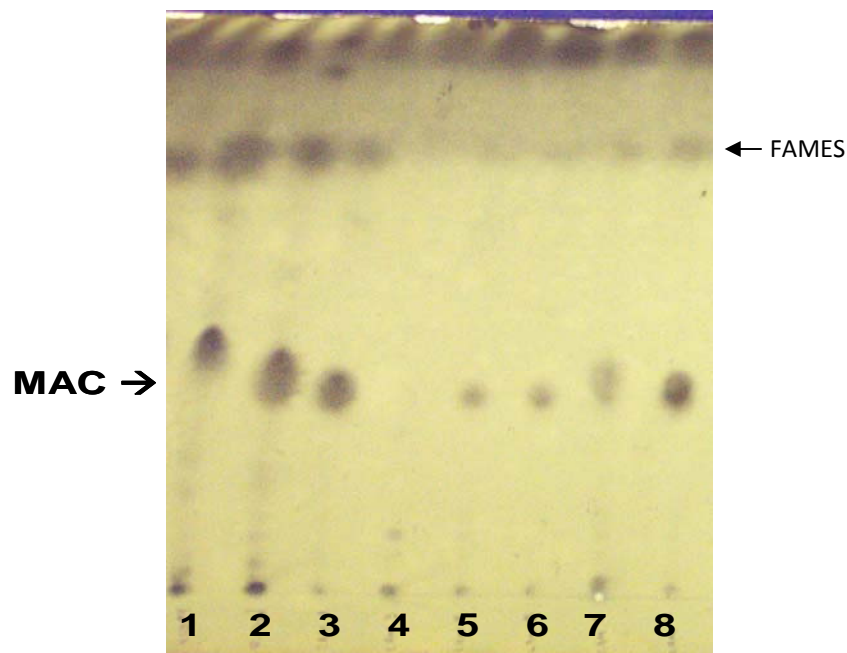


Figura 9. Placa TLC de ácidos micólicos.

1, *Gordonia sihwensis*; 2, *Rhodococcus jostii*; 3, *R. corynebacteroides*; 4, *Streptomyces griseus* (control negativo); 5, 32a.10.25; 6, 35b.12.15; 7, 32a.10.22; y 8, 32a.10.14. En la Tabla 4 se encuentran los códigos completos de las cepas de referencia.

Lo anterior confirma que nuestros aislados pertenecen al subgrupo MAC de la clase *Actinobacteria*. Además en la línea número 4 podemos observar la carencia de ácidos micólicos en *Streptomyces griseus* (control negativo).

4.3 EXTRACCIÓN DE DNA, PCR Y ÁRBOL FILOGÉNÉTICO

Una vez con la información de presencia de ácidos micólicos en la pared de los aislados de estudio, se procedió a ubicar los aislados dentro de un género del subgrupo MAC. La extracción del DNA para los aislados y las cepas de referencia se muestra en la figura 10a. Éste DNA se utilizó como templete para la amplificación por PCR del gen 16S rRNA (Figura 10b). Tanto la banda de DNA (mayor a 10 000 pb; Figura 10a) como la de PCR (1500 pb; Figura 10b) es posible visualizarlas en los geles de las correspondientes electroforesis horizontales realizadas para cada uno.

El producto de PCR y su secuencia (previo a un BLAST) se utilizó para realizar el respectivo alineamiento y éste para la construcción del árbol filogenético correspondiente. El método utilizado para la construcción del árbol fue por el del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987; Figura 11). En el árbol resultante se muestra que los aislados del Golfo de México pertenecen al subgrupo MAC dentro del género *Gordonia*. Es interesante resaltar que los 4 aislados de estudio están filogenéticamente relacionados a la especie *Gordonia terrae* (Figura 11) además de estar éstos altamente relacionados entre si (99%

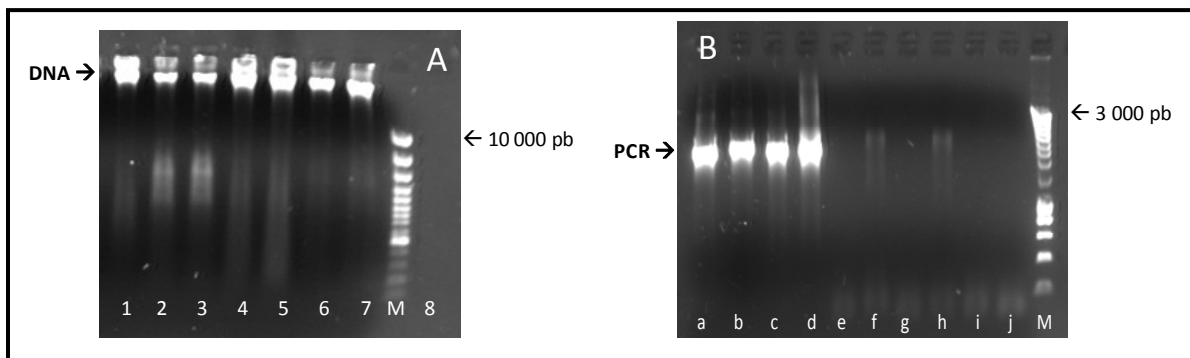


Figura 10 A y B. Extracción de DNA y productos de PCR.

1,a) 32a.10.25; 2,b) 35b12.15; 3,c) 32a.10.22; 4,d) 32a.10.14; 5) *G. sihwensis*; 6) *R. corynebacteroides*; 7) *R. jostii*; 8,j) control negativo; e-i) otros aislados marinos; M) marcador molecular.

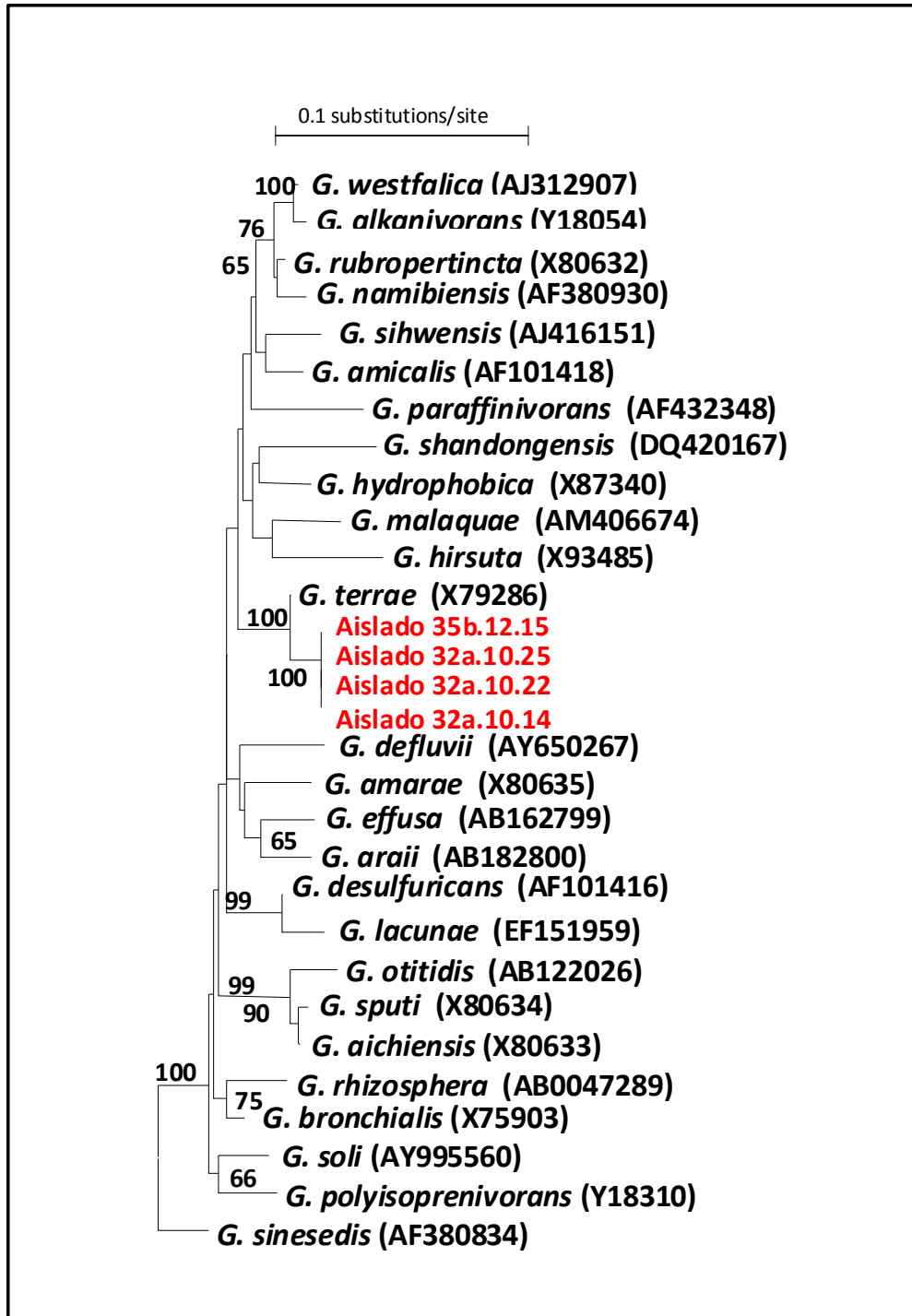


Figura 11. Árbol filogenético

Fuente: Construido con base en secuencias del gen 16S rRNA ribosomal del género *Gordonia* con base en el método del "vecino mas cercano" (Saitou & Nei, 1987).

4.4 EFECTO EN MEDIO SÓLIDO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Las Tablas 5 a 13 muestran los datos registrados para el crecimiento y color del pigmento carotenoide producido bajo las concentraciones 0.1, 0.5 y 1.0% de las diferentes fuentes de carbono de las cepas de referencia así como de los 4 aislados en estudio. La evaluación y el registro se llevaron a cabo a los 7, 14 y 21 días de crecimiento en cada medio.

Tabla 5. Cepas de referencia y aislados crecidos en celulosa como fuente de carbono.

CELULOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	3+	3+	1+	4+	4+	4+	3+	2+	3+*	4+	4+	4+	3+	3+	2+	4+	4+	4+
R. jostii	1+	1+	1+	3+	3+	3+	1+	1+	2+	4+	4+	4+	2+	2+	3+	4+	4+	5+*
R. corynebacteroides	2+	1+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	4+	3+	5+	2+	2+	3+	4+	3+	5+
32a.10.25	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+*	2+*	2+
35b.12.15	2+	1+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	2+
32a.10.22	2+	1+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	5+*	4+	4+	3+	2+	2+	5+	4+	4+
32a.10.14	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	4+	4+	4+

Tabla 6. Cepas de referencia y aislados crecidos en fructosa como fuente de carbono.

FRUCTOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	2+	3+	5+	3+	3+	3+	2+	3+	5+	3+	3+	3+	3+	3+	5+	4+	4+	4+
R. jostii	1+	2+	3+	3+	3+	4+	1+	3+	3+	4+	4+	4+	1+	3+	3+	4+	5+	5+
R. corynebacteroides	2+	3+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	3+	5+	5+*	5+*	1+	2+	4+	5+	5+*	5+
32a.10.25	2+	3+	4+	2+	1+	1+	2+	3+	5+	3+	2+	4+	2+	3+	5+	4+	3+	4+
35b.12.15	3+	3+	3+	1+	1+	2+	3+	2+	4+	3+	3+	5+*	3+	2+	4+	3+	3+	5+*
32a.10.22	1+	2+	3+	3+	2+	2+	1+	2+	4+	4+	5+	5+*	1+	2+	4+	4+	5+	5+*
32a.10.14	1+	2+	4+	3+	1+	1+	2+	3+	5+	3+	4+	4+	2+	3+	5+	3+	4+	5+*

Tabla 7. Cepas de referencia y aislados crecidos en glicerol como fuente de carbono.

GLICEROL	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	3+	3+	1+	4+	4+	3+	4+	4+	2+	4+	3+	3+	3+	3+	1+	4+	4+	5+*
R. jostii	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	5+*	5+*	4+	4+	4+	5+	5+*	5+*
R. corynebacteroides	3+	3+	3+*	4+	4+	3+*	4+	5+	5+*	5+	5+	5+	3+	4+	5+	4+	5+	5+
32a.10.25	1+	1+	2+	1+*	1+*	1+*	2+	3+*	3+*	2+*	2+*	2+*	1+	3+	5+	4+	4+	5+*
35b.12.15	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	3+	3+	3+	1+	2+	3+	3+	3+	3+
32a.10.22	1+	2+	2+	4+	4+	4+*	2+	2+	4+	5+*	5+*	5+*	1+	2+	4+	5+*	5+*	5+*
32a.10.14	1+	1+	2+	1+	1+	1+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	5+	4+	4+	4+

Tabla 8. Cepas de referencia y aislados crecidos en lactosa como fuente de carbono.

LACTOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	2+	3+	4+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	3+	3+	3+
R. jostii	2+	3+	4+	1+	2+	4+	2+	3+	5+	2+	3+	5+	2+	3+	5+	2+	3+	5+
R. corynebacteroides	2+	2+	3+	2+	2+	2+*	2+	2+	3+	3+	4+*	4+*	2+	2+	3+	3+	3+	4+*
32a.10.25	2+	2+	3+	1+	2+	2+	2+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	2+	2+	2+
35b.12.15	3+	4+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	2+*	3+	3+	3+	3+	4+	2+*	3+	3+	3+

32a.10.22	2+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	4+	4+	4+
32a.10.14	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	4+	4+	4+	1+	1+	2+	5+*	5+*	5+*

Tabla 9. Cepas de referencia y aislados crecidos en maltosa como fuente de carbono.

MALTOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	2+	2+	2+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	4+	4+	4+
R. jostii	1+	3+	1+	3+	3+	3+	1+	2+	2+	4+	4+	4+	1+	2+	2+	4+	4+	4+
R. corynebacteroides	2+	1+	2+	4+	4+	4+	2+	2+	3+	5+	5+	5+*	2+	2+	3+	5+	5+	5+*
32a.10.25	1+	2+	2+	1+	1+	1+*	1+	2+	3+	4+	4+	5+*	1+	3+	3+	4+	5+*	5+*
35b.12.15	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	3+	1+	2+	2+	2+	2+	3+	1+	2+	2+
32a.10.22	1+	2+	3+	5+	5+	5+*	4+	4+	5+*	1+	1+	1+	1+	1+	3+	4+	4+	5+*
32a.10.14	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	2+	2+	4+	5+	5+	5+

Tabla 10. Cepas de referencia y aislados crecidos en manitol como fuente de carbono.

MANITOL	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	1+	1+	3+	3+	3+	3+	1+	2+	3+	3+	3+	3+	1+	2+	3+	3+	3+	3+
R. jostii	2+	3+	5+	2+	3+	4+	2+	3+	5+	2+	3+	5+	2+	4+	5+	2+	4+	5+
R. corynebacteroides	3+	4+	5+	5+	5+	5+	3+	4+	5+	5+	5+	5+	3+	4+	5+	5+	5+	5+
32a.10.25	2+	3+	5+	1+	2+	3+	2+	3+	5+	2+	2+	5+	2+	3+	5+	3+	2+	5+
35b.12.15	1+	3+	4+	2+	2+	3+	1+	3+	4+	2+	3+	4+	1+	4+	5+	2+	3+	4+
32a.10.22	1+	3+	4+	3+	3+	4+	1+	3+	4+	3+	4+	4+	1+	3+	4+	3+	5+	5+
32a.10.14	2+	4+*	5+	3+	3+	4+	2+	4+*	5+	3+	4+	4+	2+	4+*	5+	5+	5+	5+

Tabla 11. Cepas de referencia y aislados crecidos en manosa como fuente de carbono.

MANOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	3+	3+	4+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	5+	4+	4+	4+
R. jostii	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	4+	4+	4+	2+	2+	2+	4+	4+	5+
R. corynebacteroides	2+	3+	3+	3+	4+	4+	2+	3+	5+*	5+	5+	5+	2+	3+	5+	5+*	5+*	5+*
32a.10.25	1+	1+	1+*	1+	1+	1+	2+	3+	4+	4+	4+	4+	2+	3+	4+	4+	4+	4+*
35b.12.15	2+	2+	1+	2+	1+	1+	3+	2+	2+	4+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	3+	4+
32a.10.22	1+	1+	1+	4+	3+	2+	1+	1+	1+	3+	3+	4+	1+	1+	1+	2+	2+	3+
32a.10.14	2+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	3+	3+	3+	3+	1+	1+	3+	3+	3+	3+

Tabla 12. Cepas de referencia y aislados crecidos en sacarosa como fuente de carbono.

SACAROSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	3+	4+	3+	2+	2+	4+	3+	4+	3+	2+	2+	5+*	3+	4+	3+	2+	2+	5+
R. jostii	2+	3+	1+	1+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	3+	2+	3+	2+	1+	2+	3+
R. corynebacteroides	2+	5+*	5+	5+	5+	5+	2+	5+	5+	5+	5+*	5+	2+	5+	5+	5+	5+*	5+
32a.10.25	3+	3+	5+	3+	2+	4+	3+	3+	5+	3+	2+	4+	3+	3+	5+	3+	2+	5+
35b.12.15	3+	3+	5+	3+	2+	5+	3+	3+	5+	3+	2+*	5+	3+	3+	5+	3+	2+*	5+
32a.10.22	1+	3+	5+	2+	3+	4+	1+	3+	5+	1+	2+	3+	1+	3+	5+	2+	3+	5+
32a.10.14	1+	3+	5+	1+	2+	4+	1+	3+	5+	2+	3+	4+	1+	3+	5+	3+	4+	5+*

Tabla 13. Cepas de referencia y aislados crecidos en sorbosa como fuente de carbono.

SORBOSA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
G. sihwensis	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	5+	5+	5+
R. jostii	3+	1+	1+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	5+	5+	5+
R. corynebacteroides	4+	4+	3+*	4+	4+	4+	2+	2+	3+	4+	3+*	3+*	3+	3+	3+	4+	4+	4+*
32a.10.25	1+	1+	1+	1+	1+	1+	3+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	1+
35b.12.15	2+	2+	1+	1+	1+	1+	3+	2+	1+	1+	1+	1+	3+	2+	1+	3+	3+	3+
32a.10.22	2+	1+	1+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	4+	3+*	2+	3+	2+	1+	4+	3+	2+
32a.10.14	2+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	3+	3+	3+*	2+	2+	1+	3+	3+	3+

El crecimiento (producción de biomasa) y la producción de pigmento se evaluaron comparando cada aislado creciendo en las diferentes fuentes de carbono respecto a su crecimiento en la placa con medio control (GYEA con glucosa). El valor de uno (1) indica el menor crecimiento (biomasa) o menor pigmentación respecto a las cepas de referencia, un valor de cinco (5) indica la mayor cantidad de biomasa y de pigmentación (producción de carotenoides). Valores que presentan un asterisco (*, en rojo) muestran una variable importante, como ejemplo, un cambio importante en la pigmentación, ya sea cambio de intensidad o bien en la morfología macroscópica colonial del aislado.

En las Tablas 5 a 13 es posible distinguir como los microorganismos presentan diferentes y notorios cambios tanto en su crecimiento (biomasa producida) como en la pigmentación de los carotenoides producidos cuando éstos están creciendo en las diferentes concentraciones de las fuentes de carbono. Por ejemplo, el aislado 32a.10.14 y el 32a.10.22 se diferencian de los aislados 32a.10.25 y 35b.12.15 después de 14 días de incubación y se acercan a los valores de mayor producción de pigmento respecto a las cepas de referencia, en particular con *R. corynebacteroides* (Tablas 5-7). Esto es interesante ya que se sabe que *R. corynebacteroides* es un prolífico productor de pigmentos carotenoides, en particular de β -caroteno. Otra característica de crecimiento es la observada para el aislado 32a.10.25 donde el pigmento producido al utilizar celulosa es menor con respecto a las cepas de referencia, al tiempo además de que se observa la producción de un líquido blanco sobre la colonia. Durante el desarrollo del proyecto el líquido blanco no pudo ser estudiado sin embargo este microorganismo podría ser de interés para estudios futuros (Tabla 5). Para el caso del aislado 35b.12.15 en sacarosa (Tabla 12) desde los 7 días de incubación fue notorio un alto crecimiento y una pigmentación intensa y diferente respecto a las frente a otras fuentes de carbono. La producción de biomasa y pigmentación es directamente proporcional a las condiciones utilizadas.

En general para todos los aislados y las fuentes de carbono empleadas la producción de biomasa y de pigmento aumenta conforme aumenta la concentración de la fuente de carbono, es decir, mínima para 0.1%, media para 0.5% y máxima para 1.0%. La producción de biomasa de la colonia aumenta constantemente, hasta transcurridos los 14 días de incubación, ya que pasado este tiempo el crecimiento se mantiene. Lo anterior indica además indirectamente la cinética de crecimiento del microorganismo. Respecto a la pigmentación del aislado ésta es constante hasta los 21 días, por ejemplo para el aislado 32a.10.22 (Tabla 8) y 32a.10.25 (Tabla 10).

Es importante mencionar que en la Tabla 9 se observa que el aislado 32a.10.14 tiene una mayor pigmentación a los 21 días de incubación bajo las 3 concentraciones de maltosa, el color del pigmento es muy similar; mientras que para los aislados 32a.10.25 y 32a.10.22 se observa que ocurre así: estos aislados presentan un mejor crecimiento a los 14 días y se observa una mayor pigmentación a los 21 días bajo la mayor concentración de esta fuente de carbono (1%).

El crecimiento de la mayoría de los aislados al utilizar manosa como fuente de carbono (Tabla 11) no es el deseable. La pigmentación en algunos de ellos se ve altamente afectada y es prácticamente igual a la del medio de referencia (glucosa). Respecto a la sorbosa (Tabla 13) ésta no permite que los aislados en estudio crezcan de manera óptima ni produzcan gran cantidad de carotenoides cuando éstas se comparan con las cepas de referencia, las cuales muestran crecimiento a los 21 días calificados con cinco (5) considerado como mayor pigmentación y mejor crecimiento.

Los datos mostrados en las tablas de las diferentes fuentes de carbono son la base de referencia para poder evaluar su efecto en los aislados y las cepas de referencia. Sin embargo los resultados se complementan con las Figuras 12a y

12b, donde visualmente se puede apreciar tanto la biomasa como las pigmentaciones de cada uno de los microorganismos.

En la Figura 12a se reportan las 9 fuentes de carbono empleadas con sus respectivas concentraciones (0.1, 0.5 y 1%). Es notorio que para cada aislado existe un cambio en la producción de pigmentos como también en las texturas de los mismos (morfología colonial macroscópica y biomasa). Lo anterior se puede observar claramente en la Figura 12a B, C, E, F, G y H que corresponden a la fructosa, glicerol, maltosa, manitol, manosa y sacarosa, respectivamente.

En sacarosa H), el pigmento es ténue en 0.1% pero éste va aumentando conforme aumenta la concentración. Se observa que al emplear 0.5% de la fuente de carbono existe mayor biomasa y el color del pigmento aumenta considerablemente con un cambio dramático al llegar a 1%. Lo anterior sugiere que no sólo cambiando la fuente de carbono se producen diferentes efectos en la síntesis de pigmentos carotenoides, sino que también la concentración de éstos aumenta y/o favorece la producción de éstos.

Aunque lo anterior en general se observó para la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas, es interesante mencionar que lo opuesto ocurrió para la celulosa A). Por ejemplo para el aislado 32a.10.25 su crecimiento es menor pero se observa un efecto distinto en su pigmentación. Esto nos hace proponer que es fundamental elegir y evaluar diferentes tipos de fuentes de carbono (polisacáridos como la celulosa o disacáridos como la maltosa) que estimulen la producción de diversos pigmentos carotenoides. La celulosa fue la fuente de carbono que afectó de manera clara el crecimiento de los microorganismos y a su vez la producción de los carotenoides. Seguramente esto se debe a que la celulosa es un polisacárido complejo de metabolizar por los aislados estudiados.

Para el aislado 35b.12.15 un efecto notorio es observado en glicerol C), ya que el color del pigmento naranja producido por el aislado incrementa conforme la concentración de dicha fuente aumenta. Sin embargo al colocar este aislado en presencia de celulosa A) tanto el crecimiento como la pigmentación no se ven favorecidas. Caso contrario sucede bajo maltosa E) en la cual a partir de la concentración de 0.1% del disacárido hasta 1% la pigmentación es intensa.

Si observamos el pigmento del aislado 35b.12.15 en manosa G) es notorio que bajo las tres concentraciones empleadas es similar, al tiempo que no difiere del presentado al utilizar el medio de referencia (glucosa). Esto se pudiera deber a que la manosa sólo difiere de la glucosa en la estereoquímica del carbono 2. En contraste, cuando se utiliza sorbosa I), la pigmentación cambia totalmente a un naranja-café en donde la mayor producción de biomasa se presenta a la utilización de 0.5%. En el medio con lactosa D) ambos aislados, 32a.10.25 y 35b.12.15 muestran un crecimiento de biomasa intermedio y la intensidad de los carotenoides es similar a la observada bajo glucosa.

En la Figura 12b para el aislado 32a.10.22 también se observan distintos efectos al modificar la fuente de carbono. Por ejemplo, en el caso de glicerol C), el pigmento cambia de naranja a naranja-intenso. En el caso de fructosa B), la pigmentación cambia de naranja-claro a naranja con un crecimiento escaso a uno abundante. Respecto a sacarosa H), la pigmentación cambia de un amarillo-ligero (0.1%) hasta naranja (1.0%) el cambio es realmente significativo.

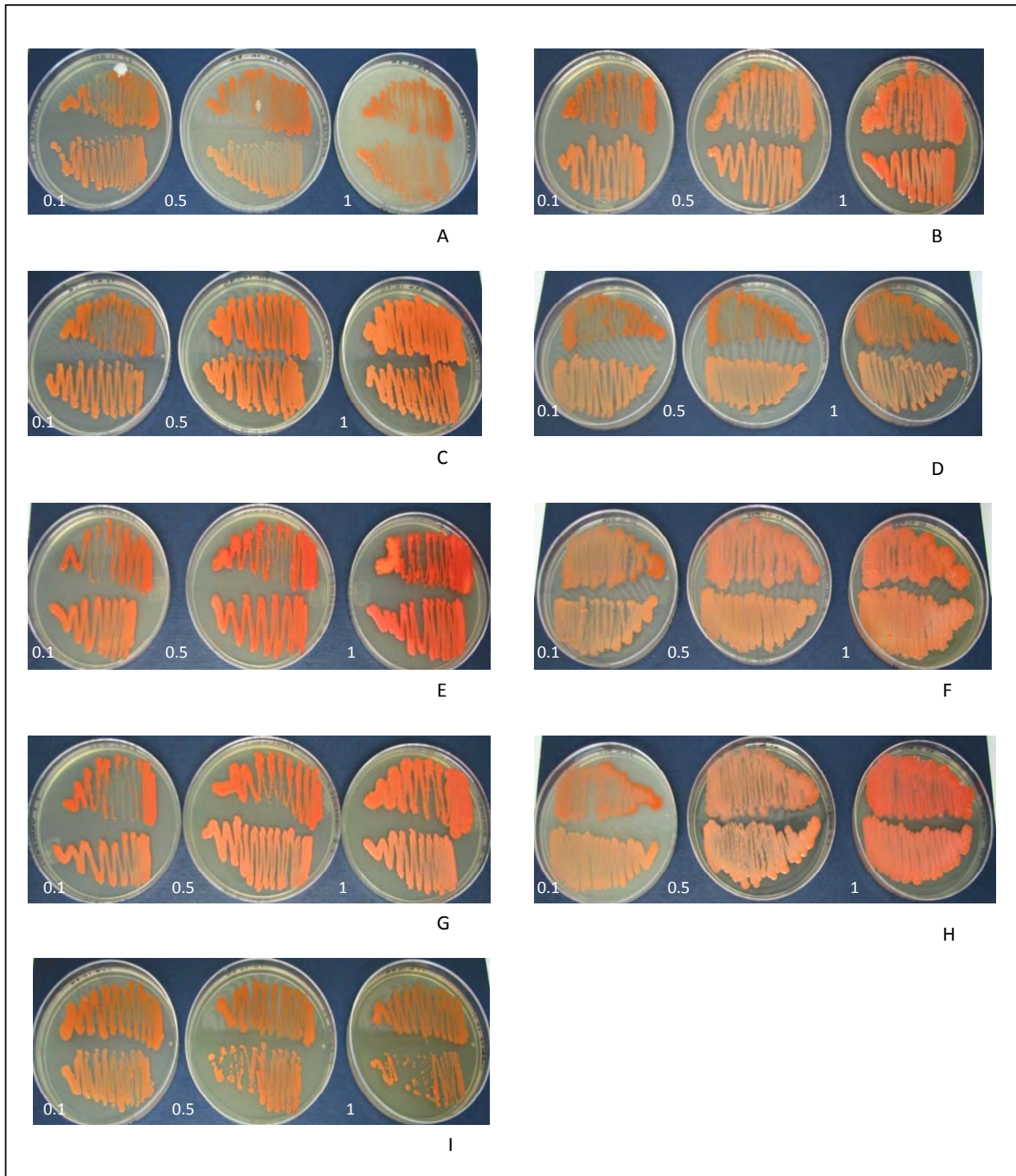


Figura 12a. Efecto de las fuentes de carbono.

Aislados 32a.10.25 (superior) y 35b.12.15 (inferior) en: A) Celulosa, B) Fructosa, C) Glicerol, D) Lactosa, E) Maltosa, F) Manitol, G) Manosa, H) Sacarosa, I) Sorbosa; como fuentes de carbono con (0.1, 0.5 y 1.0 %) de la misma.

Nota: Las imágenes fueron tomadas a los 14 días de incubación.

Es importante mencionar que al igual que en los casos anteriormente analizados la pigmentación en general aumenta al mismo tiempo que la concentración de la fuente de carbono empleada se incrementa. Contrastando, esta tendencia no ocurre para sorbosa I), como posiblemente podríamos esperar, lo que nos indica que cada aislado aprovecha de distinta manera la fuente de carbono, manifestándose tanto en la introducción de los pigmentos producidos como en su crecimiento.

Para el aislado 32a.10.14 es importante mencionar que bajo lactosa D), el pigmento pasa de naranja-intenso a naranja-rojizo, aunque el crecimiento es realmente escaso. Lo contrario ocurre respecto a la sacarosa H) en donde a 0.1% hay mejor crecimiento y una mejor pigmentación sobre todo en el borde de la colonia, que finalmente al estar a una concentración de 1%, el crecimiento es uniforme y de una pigmentación naranja-intenso. Otra característica importante se observa al evaluar este mismo aislado en Maltosa E), su pigmentación cambia a un naranja muy intenso expresado bajo las 3 concentraciones empleadas. Con sorbosa I) la pigmentación de los aislados 32a.10.22 y 32a.10.14 es tenue así como el crecimiento escaso.

Los resultados permiten distinguir fácilmente que para los cuatro aislados las distintas fuentes de carbono empleadas les confieren diversos cambios tanto en crecimiento como en pigmentación, con lo que para este proyecto en particular y para los aislados consideramos que no sería necesaria una modificación genética para una mayor producción de compuestos tipo carotenoides como se ha realizado en otros casos de actinomicetos productores de éstos pigmentos. El hecho de que visiblemente se observen cambios en la pigmentación de los aislados, puede deberse a que la producción de carotenoides es una mezcla; dentro de la cual al emplear distintas fuentes de carbono, favorecerán a la producción mayoritaria de un tipo de pigmento carotenoide.

Dadas las coloraciones observadas, en el presente trabajo, se podría esperar la presencia mayoritaria de estructuras lineales como el licopeno, en los

casos de pigmentaciones naranja-rojizas como las observadas en el aislado 32a.10.14 utilizando lactosa y maltosa.

En las pigmentaciones naranja-intensas observadas para aislado 32a.10.22 con glicerol y maltosa, así como en los aislados 32a.10.25 y 35b.12.15 bajo utilización de maltosa la estructura bicíclica del β -caroteno sería mayoritaria dentro de la mezcla de carotenoides. Sin embargo las tonalidades anaranjadas-naranjas de los aislados de la Figura 12b se esperan mezclas más proporcionadas de estructuras cíclicas y oxigenadas. Como ejemplo, para las pigmentaciones del aislado 32a.10.22 con fructosa, manitol y manosa, se favorecerían las xantofilas como la violaxantina y cantaxantina, ya que son conocidas las tonalidades de las mismas, no dejando de ser sólo estas estructuras las presentes en el aislado, sino parte de una mezcla.

Lo anterior es basado en las longitudes de las cadenas que cada pigmento carotenoide puede presentar así como sus dobles enlaces y los grupos funcionales con los que se encuentren ligados que, finalmente afectan la estructura de los mismos y por ende las pigmentaciones obtenidas de cada uno de los aislados al ser sometido a distintas fuentes de carbono.

Para corroborar dichas proporciones un análisis con cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) sería adecuado para tener un análisis cuantitativo de dichos carotenoides y xantofilas presentes en cada uno de los aislados; lo que, para estudios posteriores de la producción de pigmentos carotenoides sería de importancia en el momento de escalar las mismas. Los resultados indican que con medios de cultivo económicos pero bien diseñados se pueden evaluar cambios visibles para la producción de pigmentos carotenoides. En realidad cambios que nos proporcionan una gran variedad de pigmentos que presentan un amplio rango desde los más tenues como el amarillo-claro pasando por naranja o naranja-fuerte hasta los rojos o rojos-intensos.

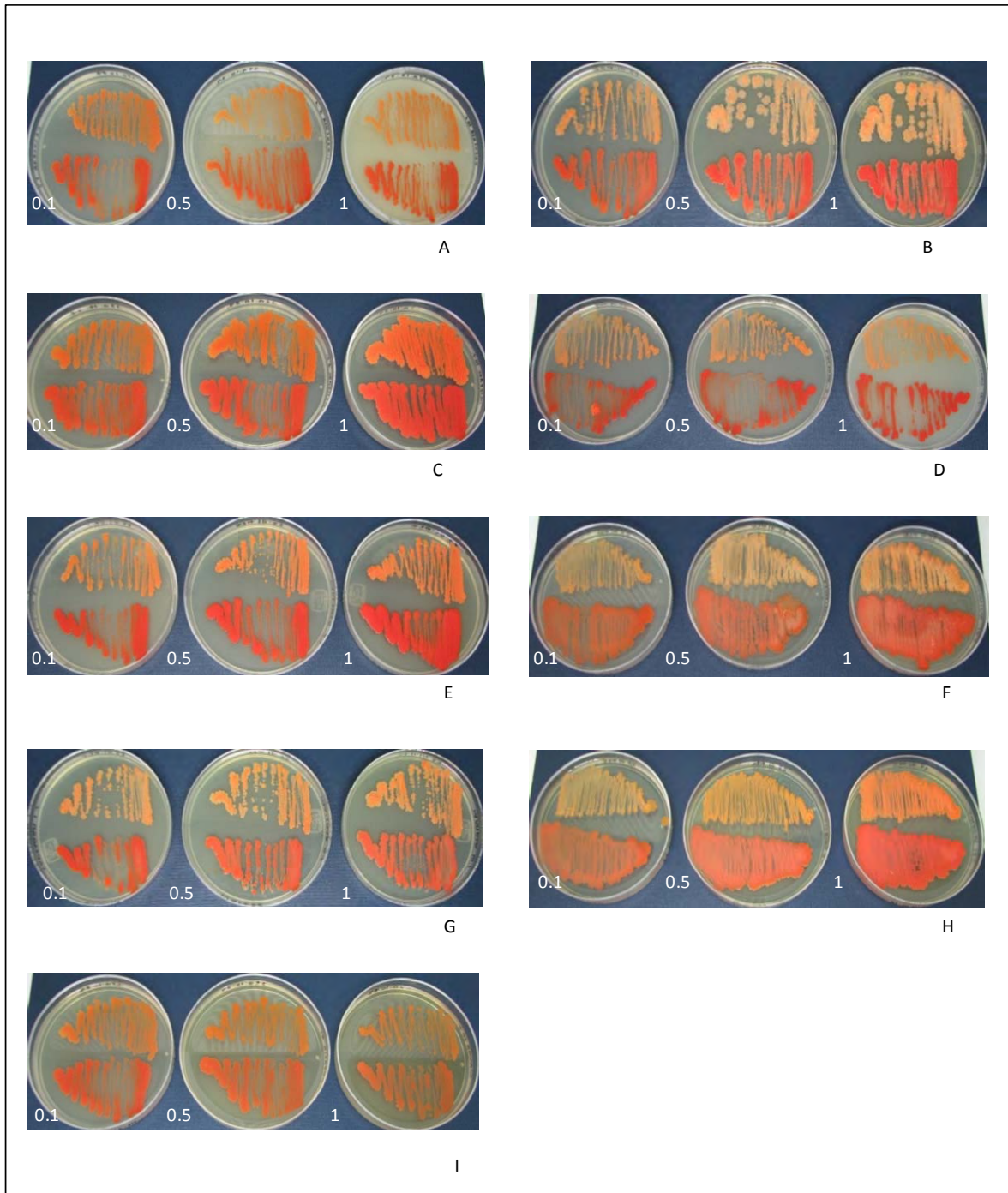


Figura 12b. Efecto de las fuentes de carbono

Aislados 32a.10.22 (superior) y 32a.10.14 (inferior) en: A) Celulosa, B) Fructosa, C) Glicerol, D) Lactosa, E) Maltosa, F) Manitol, G) Manosa, H) Sacarosa, I) Sorbosa; como fuentes de carbono con (0.1,0.5 y 1.0 %) de la misma.

Nota: Imágenes tomadas a los 14 días de incubación

4.5 EFECTO EN MEDIO SÓLIDO DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Las Tablas 14 a 22 muestran los datos registrados para el crecimiento e intensidad del pigmento carotenoide producido por los microorganismos estudiados y las cepas de referencia bajo las concentraciones 0.1, 0.5 y 1.0% de las diferentes fuentes de nitrógeno. La evaluación y el registro se llevaron a cabo a los 7, 14 y 21 días de crecimiento en cada medio.

Tabla 14. Cepas de referencia y aislados crecidos en adenina como fuente de nitrógeno.

ADENINA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^T	1+	0	2+	0	0	1+	2+	1+	2+	2+	0	1+	2+	1+	2+	2+	0	2+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^I	1+	0	0	0	0	0	2+	1+	2+	2+	0	1+	2+	1+	2+	2+	0	2+
32a.10.25	2+	0	1+	1+	0	0	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+
35b.12.15	1+	0	0	0	0	0	2+	0	0	1+	0	0	2+	0	1+	2+	0	1+
32a.10.22	1+	0	0	0	0	0	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+
32a.10.14	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+	2+	0	1+

Tabla 15. Cepas de referencia y aislados crecidos en alanina como fuente de nitrógeno.

ALANINA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^T	2+	2+	2+	1+	0	0	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^I	2+	1+	1+	1+	1+	0	2+	2+	2+	1+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.25	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
35b.12.15	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	2+
32a.10.22	1+	1+	1+	0	0	0	2+	2+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+
32a.10.14	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	3+	2+	2+

Tabla 16. Cepas de referencia y aislados crecidos en arginina como fuente de nitrógeno.

ARGININA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^T	1+	1+	1+	0	0	1+	1+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^I	1+	2+	1+	0	1+	1+	1+	2+	1+	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.25	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
35b.12.15	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	4+	4+
32a.10.22	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	2+
32a.10.14	1+	1+	1+	1+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	2+

Tabla 17. Cepas de referencia y aislados crecidos en fenilalanina como fuente de nitrógeno.

FENILALANINA	7 días						14 días						21 días					
	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^T	1+	1+	1+	0	1+	3+	2+	1+	3+	1+	1+	3+	1+	1+	2+	1+	1+	2+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^I	1+	1+	1+	0	0	0	2+	2+	2+	0	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.25	1+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+	1+	2+	1+	1+	2+
35b.12.15	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	3+	1+	1+	2+	2+	1+	3+
32a.10.22	1+	0	1+	2+	0	0	2+	1+	2+	3+	1+	2+	2+	1+	2+	3+	2+	1+
32a.10.14	2+	1+	1+	2+	2+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	3+	2+	3+

Tabla 18. Cepas de referencia y aislados crecidos en histidina como fuente de nitrógeno.

HISTIDINA	7 días						14 días						21 días					
Efecto	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^f	2+	1+	1+	2+	1+	0	2+	1+	1+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	3+	1+	1+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^f	2+	2+	1+	2+	1+	0	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
132a.10.25	1+	1+	1+	2+	1+	0	2+	2+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+
35b.12.15	1+	1+	1+	1+	0	0	2+	2+	1+	2+	1+	0	1+	1+	1+	2+	1+	1+
32a.10.22	1+	0	0	1+	0	0	2+	2+	1+	1+	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	0
32a.10.14	1+	1+	0	1+	0	0	2+	1+	1+	1+	1+	0	2+	1+	1+	3+	1+	1+

Tabla 19. Cepas de referencia y aislados crecidos en isoleucina como fuente de nitrógeno.

ISOLEUCINA	7 días						14 días						21 días					
Efecto	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^f	1+	1+	1+	0	0	0	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^f	1+	1+	1+	0	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.25	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
35b.12.15	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.22	1+	2+	1+	0	0	0	1+	2+	1+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.14	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+

Tabla 20. Cepas de referencia y aislados crecidos en prolina como fuente de nitrógeno.

PROLINA	7 días						14 días						21 días					
Efecto	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^f	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^f	1+	1+	1+	0	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.25	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
35b.12.15	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+
32a.10.22	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+
32a.10.14	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	2+

Tabla 21. Cepas de referencia y aislados crecidos en serina como fuente de nitrógeno.

SERINA	7 días						14 días						21 días					
Efecto	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^f	1+	1+	0	0	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^f	1+	1+	1+	0	0	0	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	0	0	0
32a.10.25	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
35b.12.15	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
32a.10.22	1+	1+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	2+	1+	1+	2+	2+	1+	1+	1+
32a.10.14	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	1+	2+	2+

Tabla 22. Cepas de referencia y aislados crecidos en triptófano como fuente de nitrógeno.

TRIPTOFANO	7 días						14 días						21 días					
Efecto	Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento			Crecimiento			Pigmento		
Concentración (%)	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
<i>G. sihwensis</i> DSM 44576 ^f	2+	1+	1+	3+	2+	2+	2+	1+	2+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	3+	2+	2+
<i>R. corynebacteroides</i> DSM 44719 ^f	1+	0	0	1+	0	0	1+	0	0	1+	0	0	2+	1+	0	1+	0	0
32a.10.25	2+	1+	0	1+	0	0	2+	1+	0	2+	0	0	2+	1+	0	2+	1+	0
35b.12.15	2+	1+	0	1+	1+	0	2+	1+	0	1+	0	0	2+	1+	0	1+	0	0
32a.10.22	2+	1+	0	1+	0	0	1+	0	0	1+	0	0	1+	1+	0	1+	0	0
32a.10.14	1+	1+	0	1+	0	0	2+	1+	0	1+	1+	0	1+	1+	0	1+	1+	0

La ponderación de cada uno de los valores presentados en cada una de las tablas es sencilla, ya que las características observadas son: 1) el crecimiento (biomasa) y 2) pigmentación de los carotenoides por los aislados bajo las diferentes fuentes de nitrógeno, siendo el valor de cero (0) cuando no se observó ninguna de las 2 características antes mencionadas y cinco (5) cuando el crecimiento y la pigmentación fue el valor máximo.

Al utilizar adenina (Tabla 14) para todos los microorganismos evaluados se observó un bajo crecimiento en la concentración 0.1 y 1.0%. Esto fue tanto a 7, 14 como 21 días ocurriendo algo similar para la producción de los pigmentos, ya que si no hay crecimiento tampoco hay pigmentación. Este caso es interesante ya que la fuente de nitrógeno empleada es una base nitrogenada. Existe cierta inconsistencia para esta fuente de nitrógeno ya que a 0.1% todos los microorganismos presentan crecimiento y producción de carotenoides y prácticamente ningún microorganismo creció a 0.5% y mencionamos la inconsistencia ya que a 1.0% nuevamente se observa crecimiento y producción de pigmentos carotenoides. Lo anterior indica que la adenina no es una fuente de nitrógeno fácilmente utilizable para los microorganismos evaluados. Sin embargo a la utilización de Alanina (Tabla 14). Existe una mayor producción de biomasa y también una mayor pigmentación que no es mayor que un valor de (2). En contraste, para el aislado 35b.12.15 al utilizar arginina (Tabla 16) si hay una producción considerable de pigmento. Lo anterior mayormente bajo la concentración de 1% aunque el crecimiento de biomasa no es el más deseable; pero si es notoria la pigmentación del aislado.

Si observamos la Tabla 20 es evidente que la prolina no es favorable como fuente de nitrógeno ni para el crecimiento ni para la producción de pigmentos, ésto, para ninguno de los aislados ya que los valores en la tabla no son mayores de dos (2). Lo anterior también se puede observar para la utilización de histidina e isoleucina (Tablas 18 y 19), respectivamente.

Una característica notable es la reportada en la Tabla 18 si observamos el crecimiento del aislado 32a.10.14 este va decreciendo a medida que la concentración de la fuente de nitrógeno aumenta y el pigmento varía poco pero en función de la disminución de este a medida que aumenta la concentración de la fuente de nitrógeno.

En general al observar los efectos de las diferentes fuentes de nitrógeno, vemos que influyen de una manera negativa en el crecimiento de todas las cepas de referencia y de los 4 aislados en estudio, lo que por causa efecto hace que la producción de pigmentos sea mínima para todos los casos. En las figuras 13a y 13b se complementa la información de las tablas.

Los datos reportados en las tablas de las diferentes fuentes de nitrógeno empleadas son una buena base para poder descartar alguna de éstas para la producción de carotenoides ya que su uso no representa ningun beneficio para los aislados. En la Figura 13a podemos observar que el crecimiento para los aislados 32a.10.25 y 35b.12.15 en adenina A), es mínimo, incluso hasta los 21 días. La mayor pigmentación se ve reflejada al utilizar alanina B), aunque tampoco nos permite observar grandes cambios en cuanto a la intensidad. Destacando que aunque las fuentes de nitrógeno no son excelentes sustratos para el crecimiento y la pigmentación en comparación de las fuentes de carbono, no existe una correspondencia lógica u homogénea, en cuanto a mayor cantidad de fuente empleada, mayor crecimiento como ocurrió para las fuentes de carbono.

Al utilizar histidina E), se ve claramente que a una mayor concentración el crecimiento es menor. Así al observar la fenilalanina D), se observa que es una de las fuentes de nitrógeno que podría representar ser una opción para un mejor crecimiento de los aislados en estudio, y por ende también la producción de pigmentos tipo carotenoides pero que en realidad para fines de producción no serían los ideales. En este caso observamos que no influyen de manera positiva las estructuras de las fuentes de nitrógeno empleadas y que no nos permiten

observar claros efectos entre concentraciones de los pigmentos carotenoides y la biomasa producida.

Revisando la Figura 13b observamos que los aislados 32a.10.22 y 32a.10.14 presentan el mayor crecimiento y pigmentación al utilizar arginina C), pero aun con ello no se alcanza el crecimiento observado en el medio GYEA o bien el utilizado con las distintas fuentes de carbono. Cuando se utilizó alanina B), el crecimiento y pigmentación para los 2 aislados no se pudo apreciar haciendo notar que para los 2 aislados existe cierta preferencia de la menor concentración para tener una mayor producción de biomasa. Lo que indica que una concentración mayor o igual a 1.0% no es capaz de ayudar al desarrollo de los aislados en estudio ni tampoco a la producción de pigmentos carotenoides.

Esto muestra que realmente las fuentes de carbono son mejores que las de nitrógeno para observar un efecto claro en la modificación de los pigmentos de los aislados en estudio, y son las primeras las que nos podrían ofrecer una amplia gama de pigmentos y una fuente biotecnológica de alto impacto y valor económico.

Por los resultados obtenidos al comparar las diversas fuentes de carbono y nitrógeno en medio sólido se diseñó el siguiente experimento, donde se seleccionaron tres fuentes de carbono como: 1) glicerol, ya que el aislado 32a.10.22 muestra una mayor intensidad de su pigmentación llegando a observar zanahoria, mientras que bajo ésta misma fuente el aislado 35b.12.15 cambia su pigmento a un naranja-intenso, 2) maltosa, el aislado 32a.10.14 da un pigmento de tonalidad rojizo y en el aislado 32a.10.25 la apariencia de la colonia se ve modificada, mostrándose con una superficie un tanto líquida y brillante y 3) sacarosa, en la cual el aislado 32a.10.22 muestra tonalidades diferentes frente a cada concentración desde un amarillo hasta un naranja; mientras que el aislado 32a.10.25 muestra también diferentes pigmentos debido a las concentraciones.

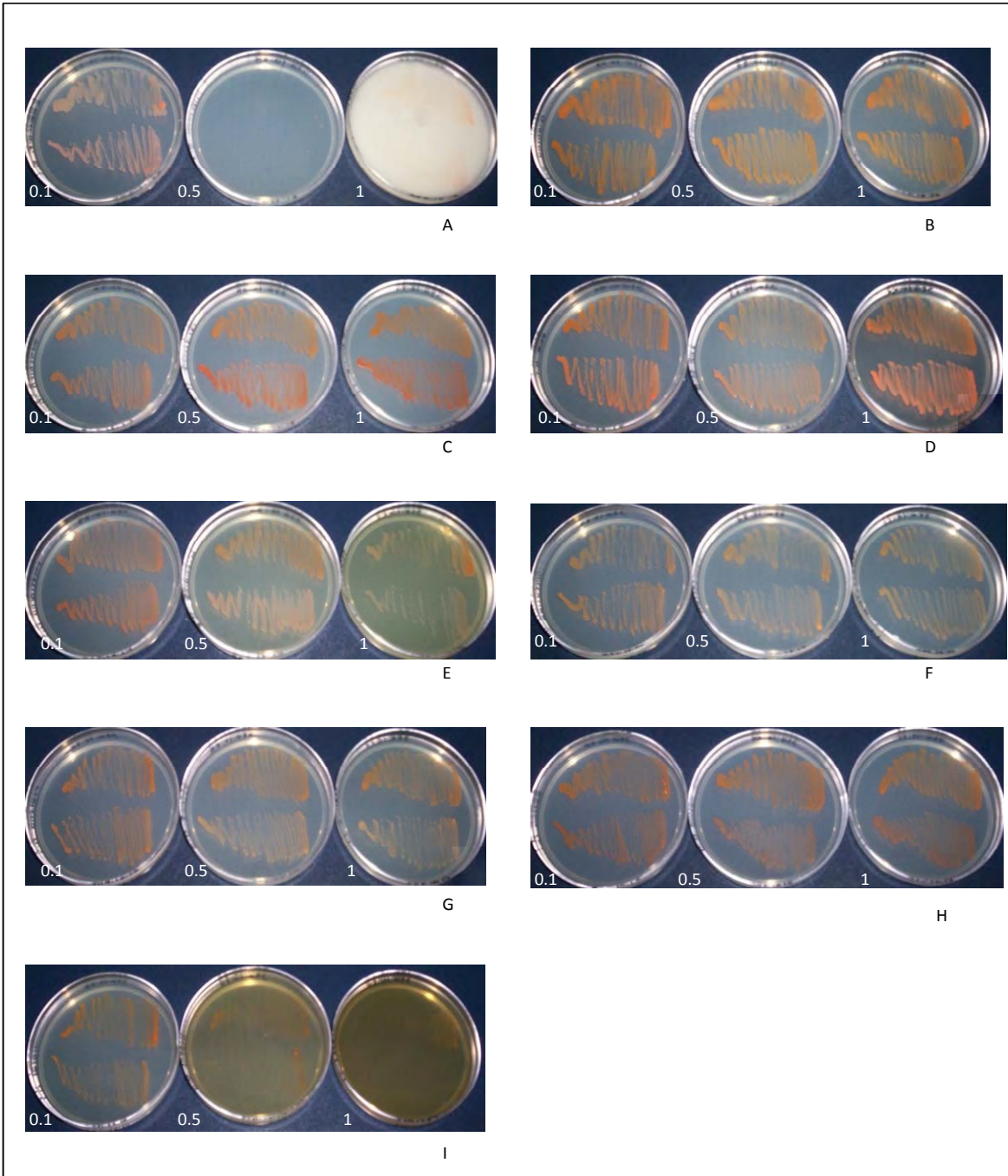


Figura 13a. Efecto de la Fuente de nitrógeno

Aislados 32a.10.25 (superior) y 35b.12.15 (inferior); en: A) Adenina, B) Alanina, C) Arginina, D) Fenilalanina, E) Histidina, F) Isoleucina, G) Prolina, H) Serina, I) Triptófano como fuente de nitrógeno con (0.1, 0.5 y 1.0 %) de la misma.

Nota: Las imágenes fueron tomadas a los 14 días de incubación.

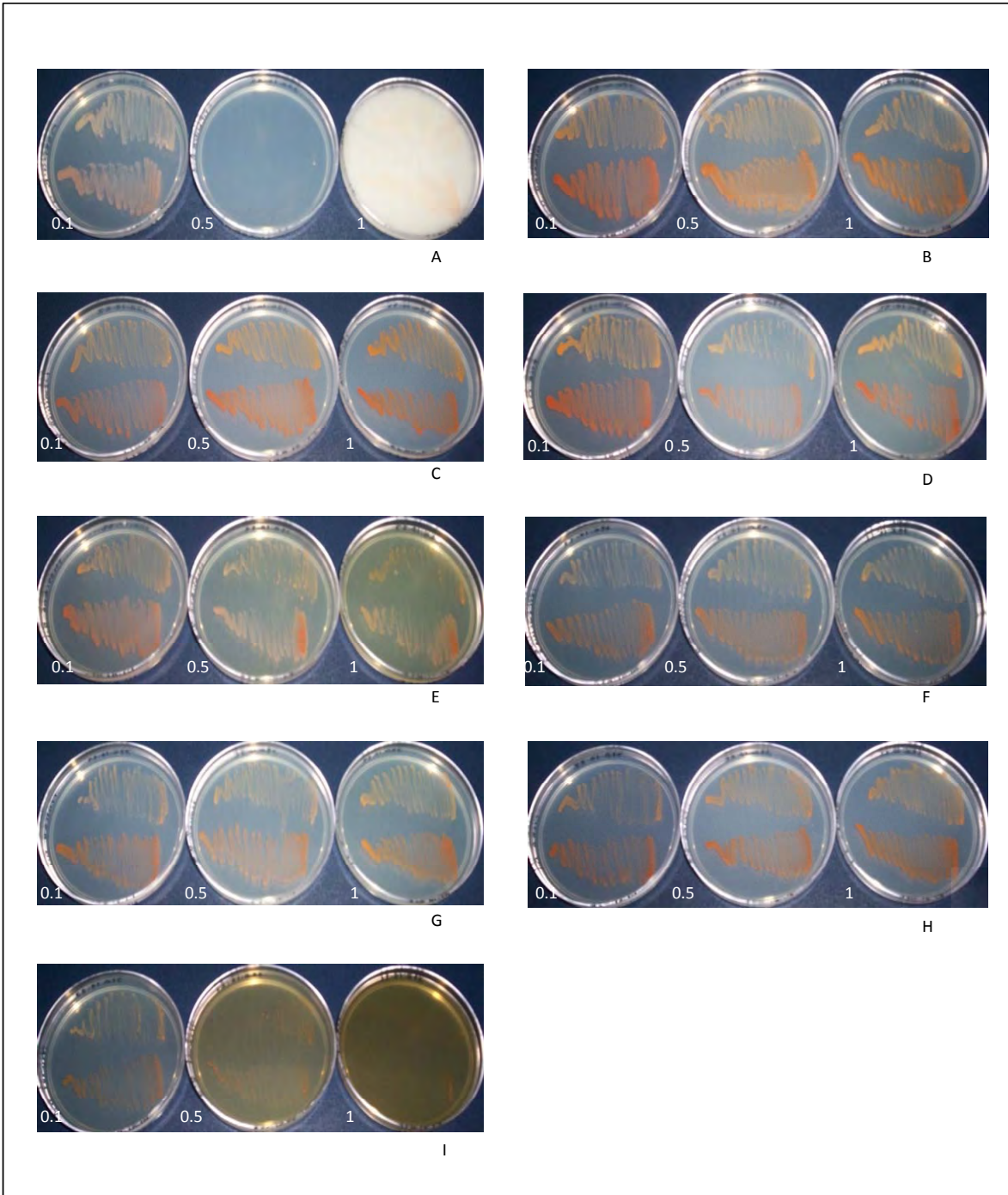


Figura 13b. Efecto de la fuente de nitrógeno.

Aislados 32a.10.22 (superior) y 32a.10.14 (inferior); en: A) Adenina, B) Alanina, C) Arginina, D) Fenilalanina, E) Histidina, F) Isoleucina, G) Prolina, H) Serina, I) Triptófano como fuente de nitrógeno con (0.1, 0.5 y 1.0 %) de la misma.

Nota: Las imágenes fueron tomadas a los 14 días de incubación.

4.6 EFECTO EN MEDIO LÍQUIDO DE GLUCOSA, GLICEROL, MALTOSA Y SACAROSA.

Las Tablas 23 a 26 muestran los datos registrados para el crecimiento y color del pigmento carotenoide producido bajo las concentraciones 0.1, 0.5 y 1.0% de glucosa, glicerol, maltosa y sacarosa como fuentes de carbono en medio líquido con agitación. La evaluación y el registro se llevaron a cabo cada tercer día, pero en las tablas siguientes se reporta únicamente los días más representativos de cada medio.

Tabla 23. Efecto en medio líquido de 4 fuentes de carbono para el aislado 32a.10.25

Tiempo	Día 11									Día 15									Día 20								
	0.1%			0.5%			1%			0.1%			0.5%			1%			0.1%			0.5%			1%		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Glucosa	3+	2+	1+	3+	1+	1+	3+	2+	1+	4+	2+	1+	3+	1+	1+	4+	2+	1+	4+	3+	1+	3+	2+	2+	4+	3+	2+
Glicerol	3+	1+	1+	3+	1+	1+	3+	1+	1+	3+	2+	2+	4+	3+	2+	4+	4+	3+	5+	4+	4+	5+	3+	2+	5+	5+	5+
Maltosa	1+	0	0	3+	2+	1+	3+	1+	1+	3+	1+	0	3+	2+	2+	4+	3+	2+	3+	2+	1+	5+	3+	2+	5+	4+	2+
Sacarosa	1+	1+	0	3+	3+	2+	2+	2+	2+	3+	2+	1+	3+	3+	2+	4+	3++	3+	3+	2+	1+	4+	4+	2+	5+	5+	4+

Tabla 24. Efecto en medio líquido de 4 fuentes de carbono para el aislado 35b.12.15

AISLADO 35b.12.15																											
Tiempo	Día 11									Día 15									Día 20								
	0.1%			0.5%			1%			0.1%			0.5%			1%			0.1%		0.5%		1%				
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
Glucosa	4+	3+	3+	2+	1+	1+	3+	3+	2+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	4+	4+	4+	5+	5+	5+	4+	2+	1+	5+	4+	4+
Glicerol	3+	1+	1+	3+	1+	1+	3+	2+	1+	3+	2+	1+	4+	2+	2+	4+	3+	4+	4+	2+	1+	4+	3+	2+	4+	5++	5+
Maltosa	3+	1+	2+	3+	1+	2+	3+	1+	2+	2+	2+	2+	1+	3+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	0	4+	3+	3+	4+	4+	4+
Sacarosa	2+	2+	1+	3+	3+	1+	3+	3+	1+	3+	3+	1+	3+	3+	2+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	4+	4+	3+	4+	5+	5+

Tabla 25. Efecto en medio líquido de 4 fuentes de carbono para el aislado 32a.10.22

AISLADO 32a.10.22																											
Tiempo	Día 9									Día 15									Día 21								
	0.1%			0.5%			1%			0.1%			0.5%			1%			0.1%		0.5%		1%				
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
Glucosa	3+	2+	3+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	4+	5+	5+	5+	5+	3+	3+	4+	4+	4+	5+	5+	5+	5+
Glicerol	2+	3+	3+	1+	2+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	4+	3+	3+	4+	4+	5+	4+
Maltosa	2+	3+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+
Sacarosa	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	4+	4+	3+	3+	3+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+

Tabla 26. Efecto en medio líquido de 4 fuentes de carbono para el aislado 32a.10.14

Aislado 32a.10.14																											
Tiempo	Día 9									Día 15									Día 21								
	0.1%			0.5%			1%			0.1%			0.5%			1%			0.1%		0.5%		1%				
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c			
Glucosa	4+	3+	3+	5+	5+	3+	5+	4+	4+	4+	3+	3+	5+	5+	4+	5+	5+	5+	4+	3+	4+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
Glicerol	5+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	3+	4+	4+	3+	4+	4+	3+	4+	4+	2+	4+	4+	3+	3+	5+	3+	3+	5+	2+	3+
Maltosa	4+	3+	4+	4+	4+	4+	5+	5+	5+	3+	4+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	5+	5+	4+	4+	4+	3+	4+	5+	5+	5+
Sacarosa	3+	3+	3+	4+	5+	5+	3+	2+	3+	4+	3+	3+	5+	5+	5+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	5+	5+	5+	4+	4+	4+

Parámetros a: Turbidez, b: pigmentación del medio, c: pigmentación del aislado (observada en fondo y pared).

Para el aislado 32a.10.25, es notorio que el crecimiento y la pigmentación sea menor en 0.5% de glucosa teniendo un pigmento amarillo-naranja. Siendo claro que para las 3 fuentes de carbono restantes, al incrementar sus concentraciones el pigmento aumenta. Sin embargo el pigmento del aislado original era un naranja-rojizo, por lo que los cambios mostrados en un medio de cultivo líquido son presentes al tener pigmentos de tipo anaranjados-naranjas; es decir más tenues Tabla 23.

El aislado 35b.12.15 en medio líquido con glucosa destaca porque el crecimiento es menor bajo la concentración de 0.5%, así como la pigmentación. Sin embargo a la utilización de las 3 fuentes de carbono restantes, la tendencia es a mayor concentración, mayor pigmentación, y en todas las fuentes el tipo de pigmento producido es de una tonalidad naranja-rosada a zanahoria; lo cual es similar a la pigmentación del aislado en medio sólido Tabla 24.

Respecto al aislado 32a.10.22, que en medio sólido muestra una pigmentación anaranjada se observa que al colocarlo en un medio líquido, el crecimiento del mismo es posible con las 4 fuentes de carbono empleadas, así, a los 9 días de haberlo inoculado, ya hay producción notable de pigmento siendo éste un naranja muy claro, que es más intenso en las concentraciones de 0.1 y 1% de la misma, para maltosa y sacarosa incluso hasta el día 21. No así al colocarlo en glucosa, ya que la pigmentación es ligeramente mas intensa llegando a ser de un naranja-intenso. La turbidez indicada en el medio está presente desde el día 7, sin embargo los cambios visibles de la pigmentación están entre los 9 y 21 días de inoculado el aislado. El pigmento en el aislado se ve incrementado a los 21 días, y con ello la biomasa, ya que es depositada en el fondo del matraz Tabla 25.

Para el aislado 32a.10.14 a la utilización de glucosa el efecto observado es a mayor concentración mayor pigmentación en donde los pigmentos

predominantes son naranjas y rojo y en el fondo del matraz se sedimenta la biomasa. Respecto al glicerol hay una mayor pigmentación el día 9 con la concentración más baja, sin embargo esto cambia con los siguientes días, los pigmentos presentados con esta fuente son menos intensos que con glucosa, sin embargo no dejan de estar dentro de la gama de los rojos. Si el aislado es colocado en maltosa, los efectos son similares a los anteriores notando que al día 15 el pigmento en el medio se mantiene constante con respecto al día 21. Al utilizar sacarosa, durante el periodo de 9 días se presentan tonalidades diversas, en donde la mayor pigmentación se muestra en 0.5% de concentración, sin embargo a los 15 y 21 días esta condición cambia, ya que la pigmentación se torna de un naranja para la menor concentración a un rojizo-zanahoria, y a medida que la concentración aumenta lo hace la pigmentación también (Tabla 26).

Debe hacerse notar que las fuentes de carbono empleadas para el crecimiento de los 4 aislados fueron excelentes, incluso desde el cuarto día de haberse inoculado, para lo que el medio líquido, nos podría ofrecer una reducción de tiempo en el crecimiento del mismo y por ende si se realizara una modificación, posiblemente una producción más pronta y eficiente del metabolito de nuestro interés (pigmento) ya que este se muestra de una forma estable después de los 15 días sin tanta variación de tonalidades. El aumento de biomasa de cada uno de los aislados fue visible en el fondo de cada uno de los matraces, así como en las paredes, ya que después de 9 días de incubación-agitación los aislados por peso descendían al fondo del matraz.

Al tiempo los cambios de pigmentación del aislado nos indican que efectivamente los aislados están aprovechando de manera adecuada las fuentes de carbono probadas, viéndose favorecidas también lo anterior debido a la agitación del medio (9 días). Sin embargo a la reducción de disponibilidad de fuente de carbono comienzan con la producción de pigmentos carotenoides con una amplia gama de tonalidades.

En la Figura 14 observamos que entre la intensidad de la pigmentación los carotenoides se sintetizan entre colores naranjas y naranjas intensos y diferente cantidad de biomasa. Obteniendo que para cada concentración empleada en cada fuente se tienen pigmentos de distinta tonalidad. En la Figura 15 la variedad de pigmentos es amplia, ya que van desde los amarillos, hasta los naranja-rojizos, observados a la utilización de glucosa y glicerol. Cabe destacar que al utilizar maltosa en las tres diferentes concentraciones es muy similar, por lo que el efecto es mínimo al cambio de concentración.

Para el aislado 32a.10.22 en la Figura 16 los pigmentos producidos se encuentran desde naranja hasta naranja-intenso con variaciones entre cada concentración evaluada, sin embargo, son menores en comparación con lo que mostró el aislado 35b.12.15. En la Figura 17, destacan el pigmento naranja-intenso y rojizo siendo realmente evidentes las intensidades a la utilización de sacarosa y glucosa. Es importante mencionar que cuando se dejaron a los aislados en reposo, se pudo observar mucho mejor que la producción de biomasa se vio afectada de la siguiente manera, a mayor concentración, mayor producción de la misma, siendo evidente en las Figuras 14 a 17. Finalmente, al colocar a nuestros aislados en medio líquido los efectos de los cambios de los pigmentos sintetizados por los microorganismos de estudio son aún más evidentes que al emplear únicamente medio sólido. Siendo éste último igual de importante ya por medio de éste es que pudimos ver claramente los cambios en la morfología colonial de los microorganismos.

En resumen, el efecto de las distintas fuentes de carbono empleadas sobre los aislados del Golfo de México, es bastante amplio y diverso para los cuatro aislados en estudio, siendo mucho más evidentes los cambios ocurridos a la utilización de maltosa, para los aislados 35b.12.15 y 32a.10.14 en donde sus pigmentos incrementan la intensidad de sus tonalidades a un naranja-intenso y rojizo, respectivamente.

Para 32a.10.22 el glicerol favorece a la producción de un pigmento naranja brillante, mientras que la sacarosa indujo cambios tanto de pigmentación como de morfología en los 4 aislados. De aquí la importancia de elegir las fuentes más representativas y hacer notar que los aislados tienen la capacidad de poder asimilar desde mono, hasta disacáridos e incluso polialcoholes.

Durante la evaluación de las fuentes de nitrógeno éstas no favorecen la producción de los pigmentos ni el crecimiento de los aislados, por lo que dado los resultados obtenidos se eligieron fuentes de carbono como las favorecedoras de producción de pigmentos. De allí el hecho de que una vez observados los efectos de los aislados en medio sólido de seleccionaron las fuentes más representativas para su evaluación en medio líquido, en donde se observó un mejor crecimiento en términos de tiempo para los 4 aislados, así como la obtención de pigmentaciones variadas de los aislados, desde naranjas hasta rojizas, sólo con cambiar las concentraciones de las mismas fuentes de carbono. Además de que éstas se muestran estables después de 14 días de permanecer en incubación, lo que permitiría su posible uso como pigmentos.

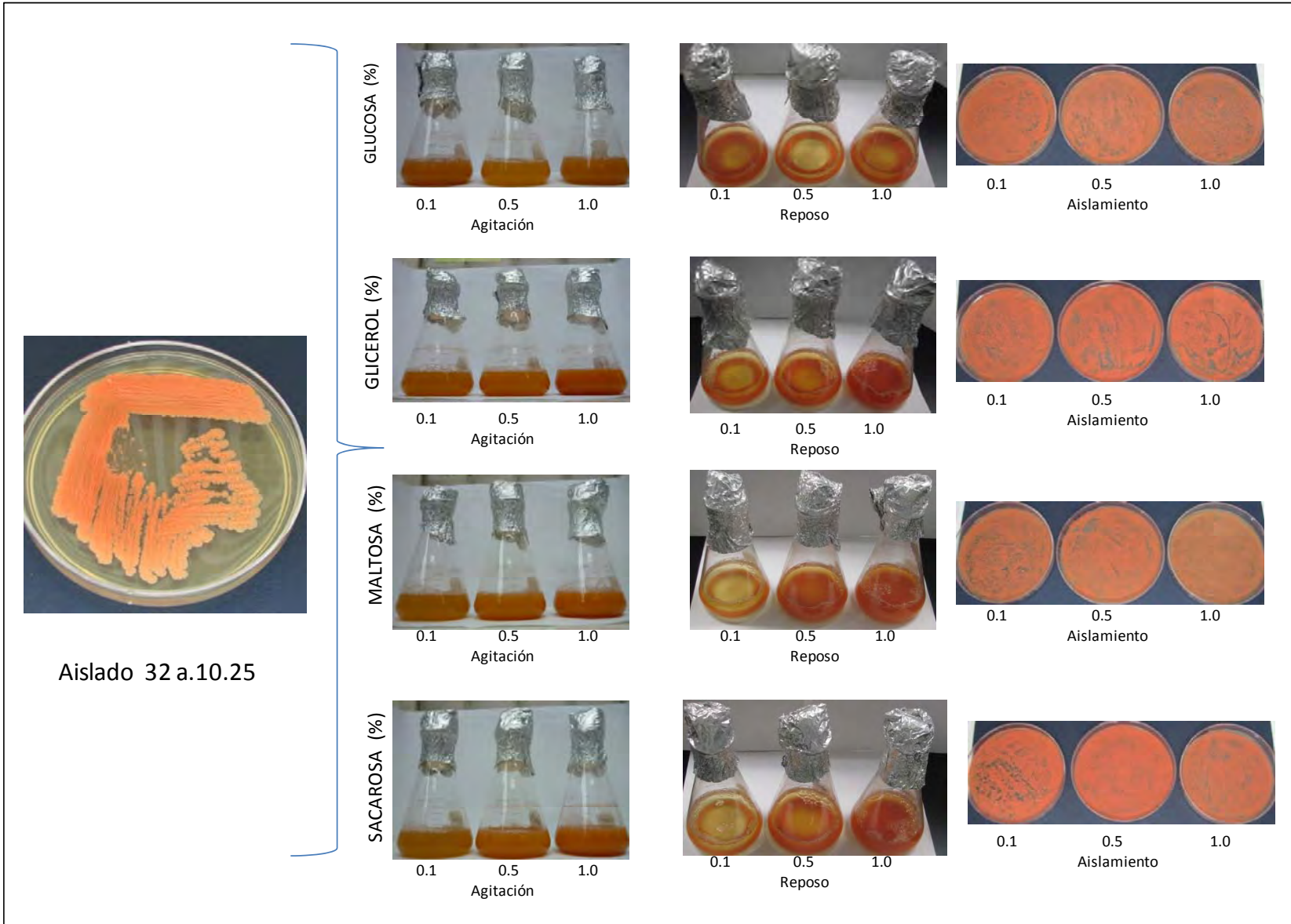


Figura 14. Efecto de las fuentes de carbono en medio líquido para el aislado 32a.10.25, en incubación a 28°C y agitación de 220 rpm.

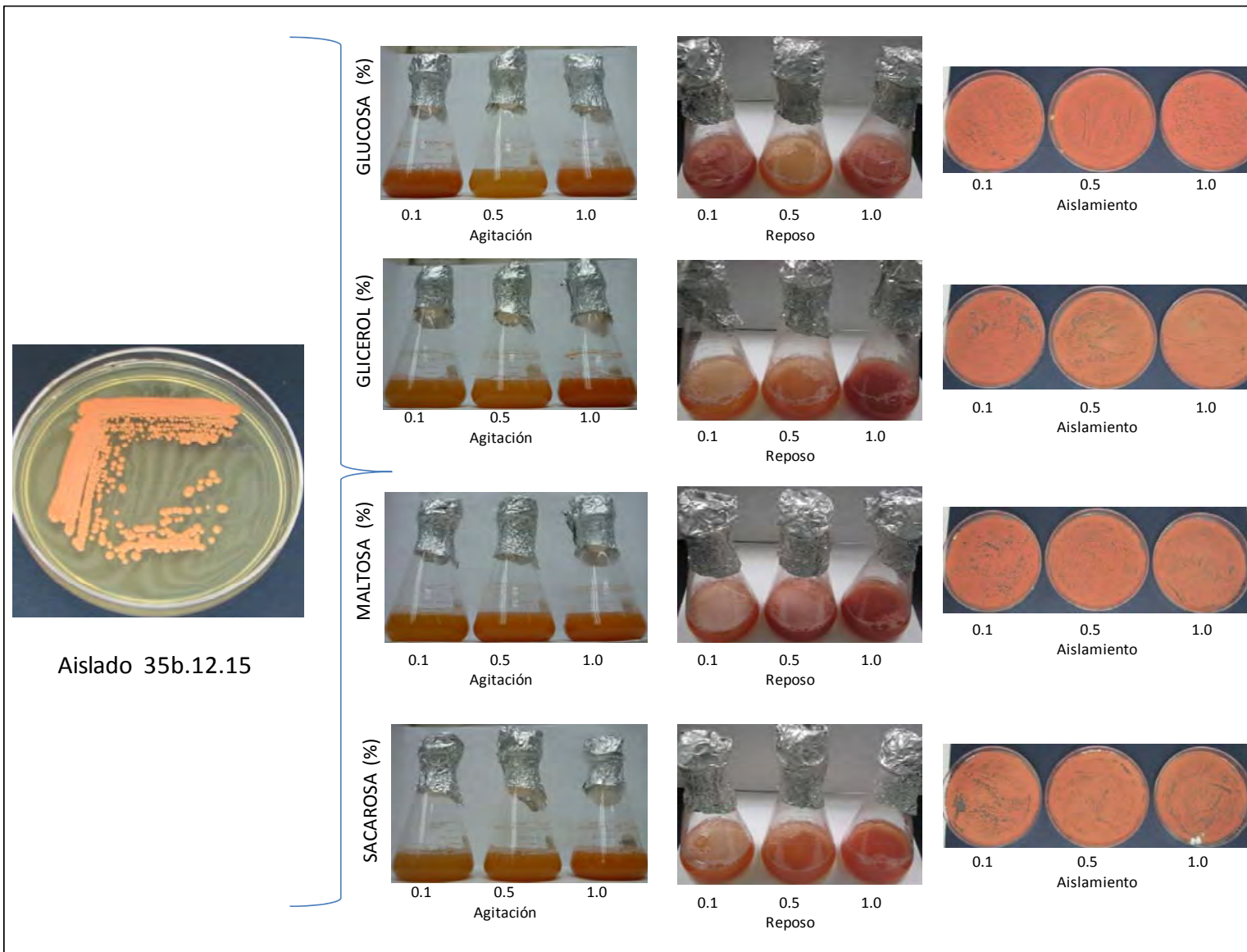


Figura 15. Efecto de las fuentes de carbono en medio líquido para el aislado 35b.12.15, en incubación a 28°C y agitación de 220 rpm.



Figura 16. Efecto de las fuentes de carbono en medio líquido para el aislado 32a.10.22, en incubación a 28°C y agitación de 220 rpm.

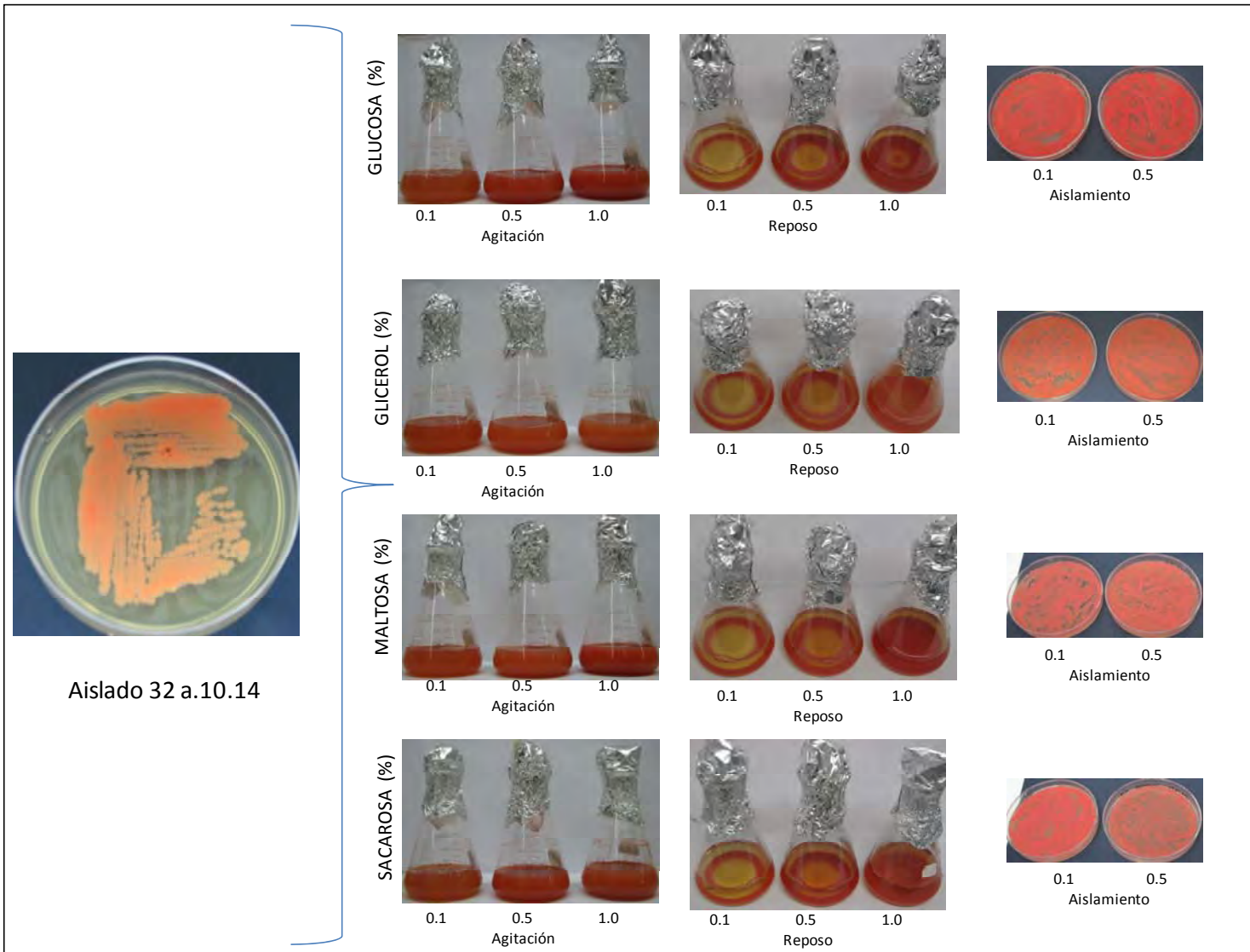


Figura 17. Efecto de las fuentes de carbono en medio líquido para el aislado 32a.10.14, en incubación a 28°C y agitación de 220 rpm.

5. CONCLUSIONES

El presente proyecto permitió profundizar y extender el conocimiento de microorganismos aislados de ambientes marinos del Golfo de México. En particular, del subgrupo microbiano MAC (productores de ácidos micólicos). Estas bacterias tienen la capacidad natural de producir pigmentos carotenoides los cuales pueden representar una alternativa de biocolorantes para la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica o veterinaria. No cabe duda que los aislados estudiados en este proyecto tienen un visible potencial biotecnológico sin embargo es necesario llevar a cabo más estudios como cuantificar de una manera analítica los pigmentos carotenoides producidos por éstas bacterias.

Durante el desarrollo de esta propuesta alcanzamos el punto de poder determinar al menos tres fuentes de carbono las cuales se podrían utilizar para escalar a nivel piloto la producción de pigmentos carotenoides o biocolorantes, los cuales son de gran demanda para las industrias antes mencionadas además de representar un valor económico importante para éstas mismas.

En el presente trabajo se estudió el ambiente marino con una visión microbiológica, la cual es poco explorada en nuestro país y mucho menos aún la diversidad actinobacteriana. Las actinobacterias aisladas de los sedimentos marinos del Golfo de México son una evidencia del potencial que tiene la microbiología marina y la búsqueda de vida en ambientes poco estudiados.

Mediante las técnicas moleculares que utilizamos, es decir, el secuenciamiento de gen ribosomal 16S y BLAST pudimos establecer el género y la especie de nuestros aislados. Confirmamos de manera molecular que éstos pertenecen al subgrupo microbiano MAC, en particular al género *Gordonia*.

Respecto a la caracterización fenotípica, macroscópica, microscópica y quimiotaxonómica, nuestros aislados poseen las características típicas de miembros del género *Gordonia*, es decir, bacilos y cocos Gram positivos que producen ácidos micólicos y que presentan una coloración naranja- o rojo-intensa.

Los sustratos utilizados tanto de fuentes de carbono como fuentes de nitrógeno y sus tres diferentes concentraciones nos permitieron observar el efecto que tienen para la producción de pigmentos carotenoides en los aislados estudiados. Es importante resaltar que ésto fué tanto en medio sólido como líquido. El segundo fue el mejor caso para poder observar una mejor diferencia. Las tres fuentes de carbono seleccionadas (Glicerol, Maltosa y Sacarosa) y sus respectivas concentraciones nos permitieron, por intensidad de color y cantidad de biomasa formada en medio líquido, observar claramente esta diferencia.

La posición taxonómica de los aislados en el árbol filogenético los ubica como especies muy cercanas a *Gordonia terrae* (Figura 15). Lo anterior coincide con reportes que sugieren que esta especie es ubicua tanto de ambientes terrestres como acuáticos.

La investigación realizada en este proyecto debería ser prioritaria en un país como el nuestro en donde la superficie marina es mayor a la terrestre. Los microorganismos estudiados en este proyecto representan una alternativa de recursos microbianos para la producción de pigmentos carotenoides con posible uso y no muy lejano en la industria alimentaria, lo que representa por si mismo un tema inagotable de estudio.

6. RECOMENDACIONES

1. Es necesario cuantificar los pigmentos carotenoides sintetizados por las bacterias estudiadas mediante métodos analíticos como cromatografía en capa fina (TLC, del inglés) o (HPLC, del inglés).
2. Es necesario establecer un balance de microorganismo “original” contra la biomasa obtenida para de esa forma determinar el nivel de productividad de los microorganismos de estudio, por ejemplo para relacionar la biomasa original con la biomasa final y/o la cantidad de pigmento producido.
3. Sería adecuado desarrollar un método de producción y extracción a pequeña escala (por ejemplo empleando mini-reactores de volúmenes pequeños; 1, 3 o 5 L) con los microorganismos empleados en este trabajo y establecer de esa forma la viabilidad de la investigación realizada a gran escala.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arenskötter M., Bröker D. & Steinbüchel A. 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 3195-3204.
2. Bérdy J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotechnology*. **7-8**, 13-14.
3. Byon H. 2004. Fundamentos de Biotecnología de los alimentos. Acribia. pp. 365.
4. Bull A. (ed). 2004. Microbial Diversity and Bioprospecting, ASM Press, Washington, DC. pp. 1-496.
5. Cifuentes T., Torres G.M. & Frías M.M. 1997. El océano y sus recursos IX. La pesca. Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México. pp. 182.
6. Clydesdale F.M. 1993. Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **33**, 83-101.
7. Colquhoun J.A., Mexon J., Goodfellow M., Ward A.C., Horikoshi K. & Bull A.T. 2000. Rapid characterisation of deep-sea actinomycetes for biotechnology screening programmes. *Antonie van Leeuwenhoek*. **77**, 359-367.
8. Demain A. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*. **18**, 499- 514.
9. De Miguel T., Sieiro C, Poza M. & Villa T.G. 2000. Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 sp. nov. *International Microbiology*. **3**, 107-111.
10. De Miguel T., Sieiro C., Poza M. & Villa T.G. 2001. Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobaea* mutants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **49**, 1200-1202.
11. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**, 783-791.
12. García C. 2007. Biotecnología Marina. Revista de la sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. **11**, 3.
13. García G. 1993. Biotecnología alimentaria. Limusa Noriega. pp. 481-506.

14. Gío A.R. 1999. La formación de recursos humanos para la oceanografía y las ciencias del mar. *Ciencia Ergo Sum*. 6, 183-189.
15. 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, pp. 453-472.
16. Goodfellow M. & Maldonado L.A. 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds). The Prokaryotes. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer New York. 3, 843-888.
17. Hardin S.H. 2001. DNA sequencing. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing group, EUA. pp. 5
18. Ingraham J. 2000. Introduction to Microbiology. Brooks/Cole Thomson Learnin. Second edition. pp. 273, 297, 786-792.
19. Johnson E.A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*. 6, 169-174.
20. Johnson E.A. & An G.-H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11, 297-326.
21. Kennish J. M. 2001. Practical handbook of marine science. CRC Press. New Jersey, USA, pp. 441-444.
22. Krinsky N.I. 1989. Antioxidants functions of carotenoids. *Free Radicals in Biological Medicine*. 7, 617-635.
23. Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Nueva York, EUA. pp. 115-175.
24. Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G & Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leewenhoek*. 78, 399-405.
25. Lengeler J. 1999. Biology of the Prokaryotes. Thieme Stuttgart, New York. pp. 627, 675, 713.
26. Madigan M. T. & Martinko J. M. 2006. Brock Biology of microorganisms. Pearson Prentice Hall, USA. 11th Ed. pp. 335, 414,415.

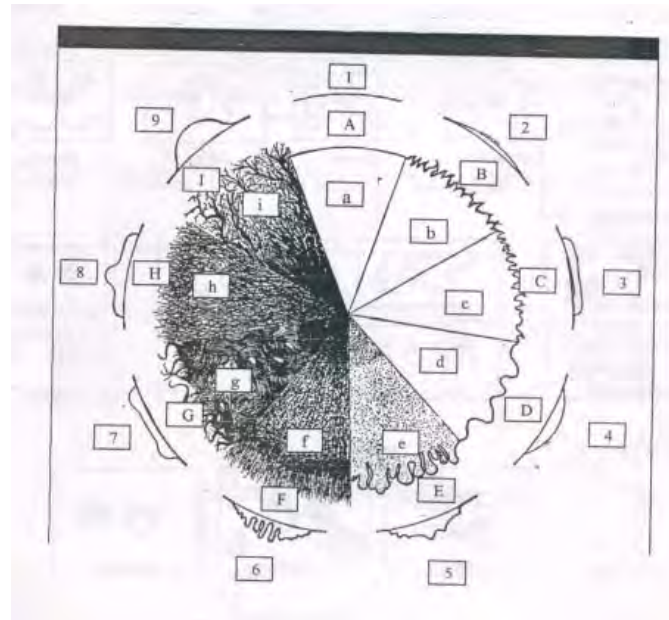
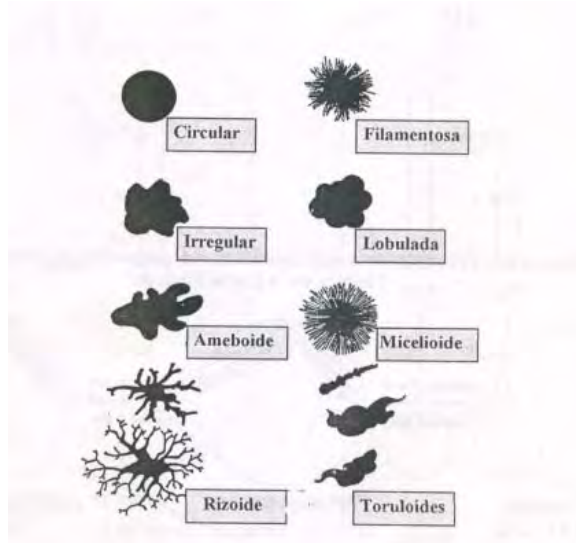
27. Magarvey N. A, Keller J. M., Bernan V., Dworkin M. & Sherman D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 7520-7529.
28. Maldonado L.A. 2002. Polyphasic taxonomy of members of the genus *Nocardia*. Ph.D. Thesis, Universidad de Newcastle, Newcastle upon Tyne, Inglaterra. pp. 28.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Munn C.B. 2004. Marine Microbiology. Ecology & Applications. Cromwell Press, UK.
33. Nelis H.T. & Leenher A.P. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**, 181-191.
34. Pérez-García A. 2009. Comunidades microbianas del golfo de México como posibles fuentes de pigmentos naturales. Tesis de licenciatura (en revisión), Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
35. Saier M.H. 2008. Structure and evolution of prokaryotic cell envelopes. *Microbe* **3**, 323-328.
36. Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**, 406-425.
37. Sneath P.H.A. 1993. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **43**, 626-629

38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Straub O. 1987. List of carotenoids. En Key to Carotenoids. Editado por H. Pfander. Birkhauser Verlag, Basel Switzerland. pp. 11-296
42. Strohl W.R. 2004. Antimicrobials. En *Microbial Diversity and Bioprospecting*, Editado por Alan T. Bull. ASM Press, Washington USA. pp. 336-355.
43. Tao L., Yao H. & Cheng Q. Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C(40) and C(50) beta-cyclic carotenoids. *Gene*. **386**, 90-97.
44. Tao L. & Cheng Q. 2004. Novel β -carotene ketolases from non-photosynthetic bacteria for canthaxanthin synthesis. *Molecular Genetic and Genomics*. **272**, 530-537.
45. Veiga-Crespo P., Blasco L., Rosa-Dus-Santos F., Poza M. & Vila T.G. 2005. Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *International Microbiology*. **8**, 55-58.
46. Ward A. & Bora N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **9**, 1-8.
47. Watve M.G., Tickoo R., Jog M. M. & Bhole B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*. **176**, 386-390.
48. Weeks B.S. & Alcamo I.E. 2008. *Microbes and Society*. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers, Canada.
49. Woese C R., Kanler O. & Wheelis M. L., *et al.* 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.

ANEXOS

ANEXO A

MORFOLOGÍA COLONIALES MÁS USUALES EN BACTERIAS



	ELEVACION		BORDE		SUPERFICIE
1	Plano difusa	A	Entero*	a	Lisa
2	Bajo convexa	B	Erosionado	b	Lisa
3	Plano convexa	C	Crenado	c	Lisa
4	Convexa	D	Ondulado	d	Lisa
5	Papilada	E	Lobulado	e	Finamente granular
6	Rugosa	F	Ciliado	f	Granulosa
7	Crateriforme	G	Fimbriado	g	Rizada
8	Umbonada	H	Lacerado	h	Filamentosa
9	Pulvinada	I	Ramoso	i	Arborecente

Observación micro y macroscópica de los aislados del Golfo de México.

Código del microorganismo	Gram	Observación microscópica
32a.10.14	+	Coco-bacilar
32a.10.22	+	Coco-bacilar
32a.10.25	+	Coco-bacilar
35b.12.15	+	Coco-bacilar

ANEXO B

TINCIÓN DE GRAM
Cristal violeta
Lugol de Gram
Alcohol-acetona
Safranina

1. Realizar frotis de cada uno de los aislados, etiquetando su clave en el portaobjetos.
2. Fijar cada una de las muestras, pasándolas sobre el mechero 4 veces.
3. Cubrir cada una de las preparaciones fijas con Cristal violeta de Gram, escurrir el exceso de colorante, dejarlo actuar durante un minuto, y lavar.
4. Cubrir la preparación con lugol de Gram, dejando actuar por un minuto, escurriendo el exceso del reactivo y lavar.
5. Decolorar agregando alcohol-acetona a la preparación, mientras se sostiene ligeramente inclinada para que el decolorante resbale lentamente por ella. Tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastren color, lavar con agua.
6. Cubrir la preparación con safranina y dejarla actuar por un minuto. Escurrir el exceso, lavar con agua y dejar secar al aire.
7. Observar la preparación al microscopio.

Resultado: G (+) se tiñen de púrpura.

G (-) se tiñen de rojo.

ANEXO C

Formulaciones del medio de cultivo sólido utilizado para cultivar las bacterias del subgrupo microbiano MAC.

Glucosa Extracto de Levadura (GYEA)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10g
Agar	12 g

pH = 7- 7.2 Para 1000 ml de agua bidestilada.

* MODIFICACIONES DEL MEDIO GYEA CON DIVERSAS FUENTES DE CARBONO Y CONCENTRACIONES

GYEA *	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Celulosa	0.2 g	1.0 g	2.0 g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Agar	2.4 g	2.4 g	2.4 g

pH = 7.2, para 200 ml de agua bidestilada

GYEA *	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Glicerol	0.2 g	1.0 g	2.0 g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Agar	2.4 g	2.4 g	2.4 g

pH = 7.2, para 200 ml de agua bidestilada

** MODIFICACIONES DEL MEDIO GYEA CON DIVERSAS FUENTES DE NITRÓGENO Y CONCENTRACIONES

GYEA **	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Glucosa	1.0 g	1.0 g	1.0 g
Adenina	0.1 g	0.5 g	1.0 g
Agar	1.2 g	1.2 g	1.2 g

pH = 7.2, para 100 ml de agua bidestilada

GYEA **	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Glucosa	1.0 g	1.0 g	1.0 g
L- Alanina	0.1 g	0.5 g	1.0 g
Agar	1.2 g	1.2 g	1.2 g

pH= 7.2, para 100 ml de agua bidestilada.

Formulaciones de caldo extracto de levadura modificando las fuentes de carbono y las concentraciones.

Medio líquido	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Glucosa	0.2 g	1.0 g	2.0g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0 g	2.0g
Agua bidestilada	200 ml	200 ml	200 ml

pH = 7-7.2

Medio líquido	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Glicerol	0.2 g	1.0 g	2.0g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0 g	2.0g
Agua bidestilada	200 ml	200 ml	200 ml

pH= 7-7.2

Medio líquido	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Maltosa	0.2 g	1.0 g	2.0g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0 g	2.0g
Agua bidestilada	200 ml	200 ml	200 ml

pH= 7-7.2

Medio líquido	Concentración (%)		
	0.1	0.5	1.0
Sacarosa	0.2 g	1.0 g	2.0g
Extracto de Levadura	2.0 g	2.0g	2.0g
Agua bidestilada	200 ml	200 ml	200 ml

pH= 7-7.2

ANEXO D

CÓCTEL PARA PCR

REACTIVOS	VOLUMEN (μ l)
Buffer	5
MgCl ₂	1.5
dNTPs	1.25
Primer (27f)	0.3
Primer (1525r)	0.3
DNA	0.5
H ₂ O	41.05
<i>Taq.</i> polimerasa	0.1

Para 50 μ l de cóctel.

Para Gel de Electroforésis

Gel agarosa al 1 %	
Agarosa	1 g
Buffer TBE 0.5X	100 ml
Bromuro de Etidio	1 μ l