



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS COMPARATIVOS DE ACTINOBACTERIAS
RECUPERADAS DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS
SUBTERRÁNEOS NACIONALES**

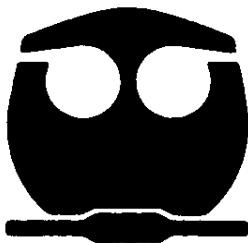
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RICARDO FLORES BADILLO



MÉXICO, D.F.

2010



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 GUADALUPE TSUZUKI REYES**

VOCAL: **Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**

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

1er. SUPLENTE: **Profesor: ESTRELLA CERVANTES GARCÍA**

2° SUPLENTE: **Profesor: MARÍA DEL CARMEN URZÚA HERNÁNDEZ**

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

SUSTENTANTE: RICARDO FLORES BADILLO

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial, al Colegio de Ciencias y Humanidades (Naucalpan) y a la Facultad de Química, por la formación académica que me proporcionaron.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por todas las facilidades otorgadas para desarrollar mi proyecto de tesis dentro de sus instalaciones.

Al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo y enseñanzas que me brindó para el desarrollo del presente trabajo de investigación, sobretodo por su paciencia, sencillez y exigencias. Gracias por todo.

A la Dra. Erika Quintana, por sus comentarios que me fueron muy útiles en el trabajo experimental.

A los profesores, María Guadalupe Tsuzuki Reyes y Eduardo Bonilla Espinosa, por las revisiones y correcciones pertinentes que realizaron a este trabajo.

Gran parte del trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo con recursos UNAM (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología) otorgados al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez proyecto # 612.

Dedicatorias

A Dios. Por todo lo que me ha dado y rodearme de personas maravillosas.

A mis padres, Elena y José, por todo su apoyo, cariño, comprensión, fortaleza, paciencia, palabras de aliento, gracias a ustedes he podido llegar hasta este momento de mi vida. Es una bendición tenerlos a mi lado.

A mi hermano José Manuel, por creer siempre en mí, estar en el momento adecuado y apoyarme en los momentos que más lo necesitaba.

A mis pequeñas sobrinas: Guadalupe (†), Jazmín y Angeline, definitivamente ustedes son prueba fehaciente de la existencia de Dios.

A Liliana Guadalupe, por su amor, apoyo incondicional, comprensión, consejos, ternura, por estar conmigo y hacer de cada día algo especial.

A Ociel, mi gran amigo, simplemente eres como mi hermano, agradezco todo lo acontecido en todos estos años, siempre podrás contar conmigo.

A María del Rosario, por tantos años de conocernos, desde aquellos tiempos tan remotos de nuestra tierna infancia. Agradezco enormemente tu amistad y apoyo.

A Adriana Zaragoza, por su entrañable amistad y convivencia, los laboratorios y/o teorías no hubieran sido lo mismo sin ti.

A Ivonne, por confiar en mí, por todas las enseñanzas que me dejaste y por el breve rato que pasamos fuera de la Facultad ideando cosas, quedo en deuda contigo. Gracias.

A Adriana Carmona, por su increíble capacidad para dar consejos, por todos los buenos momentos y estar en el momento adecuado.

A Lili, por aceptarme desde el primer día como un amigo.

A Araceli, Carlos, Dennis, Eder, Gisela, José Francisco, José Luis, Julio, Pamela, Rosalinda, Ubaldo y Ulises por su amistad y por la fortuna de conocerlos a todos ustedes desde primer semestre, gracias por todos los buenos momentos, apoyo y demás cosas que un amigo o amiga pueden hacer.

A todas aquellas personas que se han quedado a lo largo de todos estos años y que tomaron distintos caminos, siempre los recordaré.

**Por todo lo que fue, es y será.
¡Sus nombres vivirán por siempre!**

Presentaciones relacionadas con este trabajo

Parte de los resultados de este trabajo de tesis se encuentran en:

Quintana, E.T., Espino del Castillo, A., **Flores Badillo, R.**, Bernal-Uruchurtu, J.P., Morales-Malacara, J.B. y Maldonado, L.A. 2010. Characterization of the first actinobacterial group isolated from the Naica Cave of Crystals. *Antonie van Leeuwenhoek* (en evaluación).

ÍNDICE

Datos del Jurado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Presentaciones relacionadas con este trabajo	iv
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Importancia del estudio de microorganismos en cuevas	2
2. ANTECEDENTES	
2.1 Biodiversidad microbiana	9
2.2 Caracterización microbiana	10
2.3 Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana	10
2.4 Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana	12
2.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	14
2.5 La clase <i>Actinobacteria</i> y la familia <i>Pseudonocardiaceae</i>	17
2.6 La familia <i>Pseudonocardiaceae</i>	20
2.7 Área de estudio	21
2.7.1 Ubicación	21
2.7.2 Descripción general	22
2.8 Planteamiento del problema	25
2.9 Objetivo general	26
2.10 Objetivos particulares	26
2.11 Hipótesis	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Aislamiento y cultivo de cepas	29
3.1.1 Preparación del inóculo para las pruebas fenotípicas	29
3.1.2 Inoculación de las diferentes pruebas fenotípicas	30
3.2 Caracterización morfológica macroscópica de las bacterias de estudio	30
3.3 Determinación de isómeros de ácido diaminopimélico (DAP)	31
3.4 Utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	32
3.5 Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)	32
3.6 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados	33
3.7 Sensibilidad a diferentes concentraciones de antibióticos	34
3.8 Pruebas de degradación de sustratos	34
3.9 Extracción de ADN de los aislados	35
3.10 Electroforesis horizontal	36
3.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	37
3.12 Secuenciamiento del producto de PCR	38
3.12.1 Comparación empleando GenBank y BLAST	38
3.13 Análisis y construcción del árbol filogenético	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Caracterización morfológica de las bacterias de estudio	40
4.2 Determinación de isómeros de ácido diaminopimélico	42
4.3 Utilización de fuentes de carbono	43
4.4 Utilización de fuentes de nitrógeno	47
4.5 Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)	51

4.6 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados	54
4.7 Sensibilidad a diferentes concentraciones de antibióticos	57
4.8 Pruebas de degradación de sustratos	60
4.9 Estudio molecular y construcción del árbol filogenético	62
5. CONCLUSIONES	65
6. RECOMENDACIONES	66
7. BIBLIOGRAFÍA	67
8. ANEXOS	
8.1 Medios de Cultivo	73
8.2 Soluciones y Buffers de trabajo	73
8.3 Resultados de la opción BLAST para cada uno de los aislados	
8.3.1 Aislado Naica AE-2	75
8.3.2 Aislado Naica AE-4x	75
8.3.3 Aislado Naica AE-4y-A	75
8.3.4 Aislado Naica AE-5	76
8.3.5 Aislado Naica AE-7	76
8.3.6 Aislado Naica AE-11x	76
8.3.7 Aislado Naica AE-12	77
8.4 Representación gráfica de la caracterización fenotípica	
8.4.1 Utilización de fuentes de carbono	78
8.4.2 Utilización de fuentes de nitrógeno	80
8.4.3 Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)	82
8.4.4 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados	84
8.4.5 Sensibilidad a antibióticos.	86

RESUMEN

Estimados recientes basados en estudios moleculares de secuencias del gen 16S ribosomal (16S rARN) sugieren que solamente el 1% de la diversidad microbiana mundial ha logrado ser cultivado en el laboratorio. Con base en lo anterior, es de asumirse que un país como el nuestro que se encuentra entre los 10 más megadiversos del mundo, es altamente probable que aún contenga n número de microorganismos autóctonos todavía por cultivar y descubrir. Para el aislamiento de microorganismos, uno solamente tendría que buscar en cualquier ambiente o ecosistema que se nos ocurriese, pero evidentemente distintos aspectos influyen en el aislamiento de cada grupo bacteriano y sin duda alguna el estudio de comunidades microbianas en lugares poco accesibles o inusuales resulta un área que favorecería el descubrimiento y una posible estimación de la biodiversidad microbiana nacional. En el presente trabajo, un grupo de microorganismos recuperados de un ambiente acuático subterráneo nacional se estudiaron para establecer sus relaciones a nivel de género y especie. Los microorganismos recuperados muestran características únicas que los asignan a la clase *Actinobacteria*, es decir, bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina. Este grupo de microorganismos se recuperó de las cuevas de Naica en el estado de Chihuahua, un sitio de características únicas de humedad y temperatura, por lo que el presente trabajo refleja la importancia de estudiar ecosistemas inusuales como una fuente latente para la evaluación de la diversidad actinobacteriana nacional.

Palabras clave:

Actinobacteria, gen 16S rARN, biodiversidad, cuevas Naica, Chihuahua.

1. INTRODUCCION

1.1 Importancia del estudio de microorganismos en cuevas.

México está considerado entre los países con mayor megadiversidad, entre otros aspectos, por que presenta al menos 10% de la biodiversidad terrestre del planeta (Mittermeier y Goettsch, 1992). Tal biodiversidad se refleja en el área de estudio del presente trabajo, sus cuevas, las cuáles ocupan alrededor del 20% del territorio nacional donde es muy probable encontrar nuevas especies microbianas dentro de ellas (Espinasa, 1994).

Se considera como una cueva a cualquier espacio natural debajo de la superficie de la tierra extendiéndose más allá y en donde penetra la luz del día y que es accesible a los seres humanos (Gillieson, 1996). Entre las aportaciones que hacen las cuevas, se encuentra la posibilidad de desempeñar un papel importante de salvaguardar especies únicas, incrementando así la biodiversidad de las regiones donde éstas se localizan. Las condiciones ambientales que imperan en las cuevas determinan muchas de las características de los seres vivos que las habitan, lo cual es producto de un largo proceso evolutivo que les permite sobrevivir en éstas condiciones únicas (Cano y Martínez, 2000).

Algunos de los factores que determinan la diversidad microbiana dentro de las cuevas son: a) latitud, b) cantidad de energía orgánica, c) frecuencia de inundaciones, d) diversidad de sustratos, e) antigüedad, f) tamaño y g) el clima, como lo han reportado Cano y Martínez (2000).

El término “microorganismo” puede comprender a los tres grandes dominios reconocidos en la actualidad, es decir, *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Los grupos bacterianos son, desde el punto de vista estructural, los más simples de los microorganismos aunque, fisiológicamente unos de los más complejos. Dos grandes grupos bacterianos se han definido con base en la tinción de Gram. Las diferencias en la respuesta de las bacterias a dicha tinción se deben a

características específicas en la estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Ambos grupos bacterianos cuentan con capas adicionales que se sitúan al exterior de ésta. La capa rígida tiene una composición química muy similar tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Se denomina capa de peptidoglicano (o mureína) y está formada por finas láminas compuestas por dos derivados de azúcares, N-acetil-glucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen la L-alanina, D-alanina, D-glutámico, lisina o ácido diaminopimélico (DAP). Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido del glicano (Figura 1; Madigan *et al.*, 2006).

El peptidoglicano sólo se presenta en el dominio Bacteria; entre los constituyentes de las paredes de *Archea* o de *Eukarya* nunca se han encontrado el NAM ni el DAP. Sin embargo, no todas las bacterias tienen DAP en su peptidoglicano.

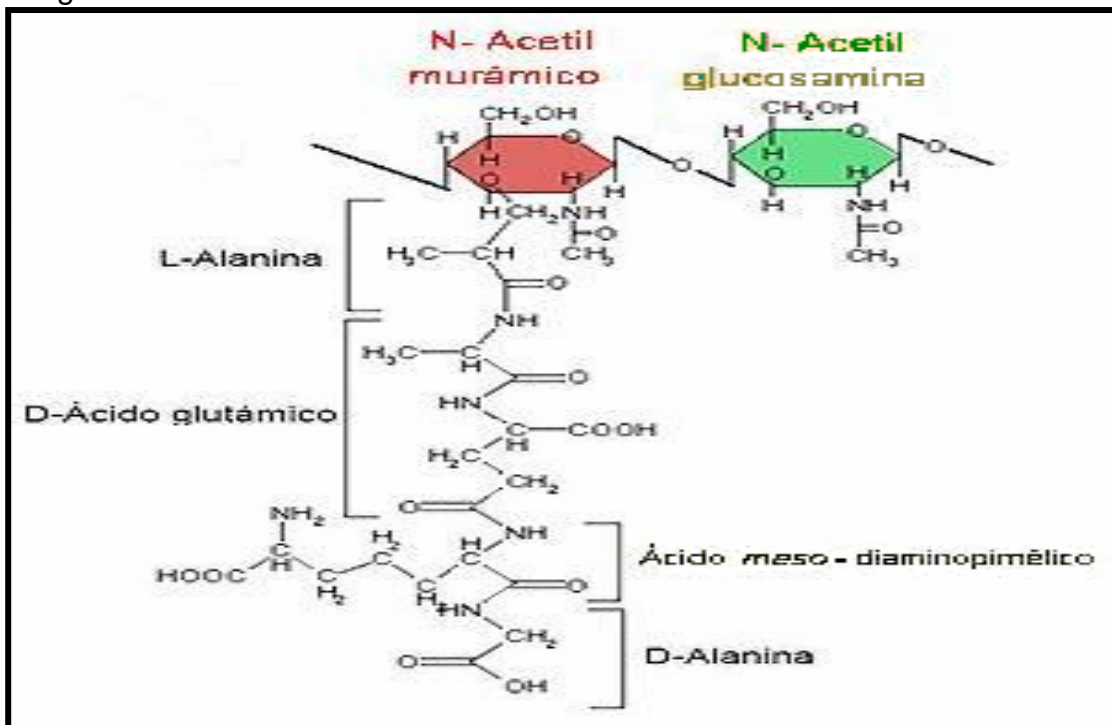


Figura 1. Estructura de la unidad repetitiva del peptidoglicano con el tetrapéptido (Fuente: <http://www.microbiologybytes.com/blog/2008/02/> -agosto 2009-)

El DAP es un aminoácido que se encuentra en todas las bacterias Gram negativas y en algunas Gram positivas, pero la mayoría de los cocos Gram positivos poseen lisina en lugar de DAP y otras bacterias Gram positivas contienen otros aminoácidos (Madigan *et al.*, 2006). La presencia y/o ausencia de los diferentes isómeros del DAP que un microorganismo presenta constituye una guía para su identificación (Staneck y Roberts, 1974).

Debido a la alta capacidad de adaptación que los microorganismos pueden presentar ante diferentes condiciones de temperatura, presión y fuentes de carbono y energía, se les puede encontrar creciendo de manera aislada o comunitaria en algunos de los lugares más extremos del planeta. Con respecto a las fuentes de carbono, se denominan autótrofos a los microorganismos que pueden usar CO₂ como única o principal fuente de carbono y heterótrofos a aquellos que emplean moléculas orgánicas preformadas, a partir de otros organismos. Con relación a la fuente de energía, los fotótrofos emplean luz para su desarrollo y los quimiótrofos obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos químicos (Alberts *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 1999).

En las cuevas, indudablemente el desarrollo de biopelículas se encuentra favorecido por una circulación limitada de aire, una temperatura estable a lo largo del año, y un elevado nivel de humedad (Albertano y Urzú, 1999; Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Groth *et al.*, 1999). Una biopelícula está constituida por comunidades de microorganismos (generalmente bacterias) que trabajan de manera conjunta. Éstas se anclan en superficies rígidas y comienzan a multiplicarse por lo que conforme el tiempo transcurre, la biopelícula crece y aumenta en fuerza ya que constituye la forma más efectiva de soportar condiciones hostiles (Qureshi *et al.*, 2005).

Las biopelículas de cuevas están compuestas por una gran variedad de hongos, cianobacterias y otras bacterias. Los microorganismos fotosintéticos dentro de las cuevas se pueden desarrollar debido a la utilización de lámparas artificiales, pues la disponibilidad de materia orgánica producida por las

cianobacterias fotosintéticas y la fijación de nitrógeno (N₂) que llevan a cabo logran soportar el crecimiento de los otros microorganismos asociados, usualmente a otras bacterias y hongos (Albertano y Urzú, 1999).

Este desarrollo contribuye de una manera sinérgica al establecimiento de biopelículas, fomentando un aumento en la actividad biológica sobre la superficie colonizada (Albertano y Urzú, 1999). Las bacterias y hongos, generalmente son capaces de utilizar materia orgánica producida por los microorganismos fotótrofos. A su vez, los microorganismos heterótrofos se caracterizan por producir ácidos orgánicos, de bajo peso molecular, que pueden conducir a la solubilización progresiva de los minerales del sustrato (Warsheid y Braams, 2000).

El establecimiento de una microbiota heterótrofa sobre superficies rocosas es también posible sin la participación de organismos fotótrofos. En este caso los microorganismos utilizarían materia orgánica presente en paredes de cuevas con unas condiciones microclimáticas estables (humedad y temperatura) que caracterizan los ambientes subterráneos (Albertano y Urzú, 1999). Por ejemplo, las aguas están enriquecidas con partículas, compuestos orgánicos y nitratos procedentes de los suelos que están por encima de los nichos biológicos y que fácilmente se infiltran a través de los materiales volcánicos que constituyen las paredes de dichos ambientes. (Palmer *et al.*, 1991, Sánchez-Moral *et al.*, 2005).

La clase *Actinobacteria* es un grupo de bacterias filamentosas, que presentan un crecimiento en forma de red llamado micelio. Aunque las dimensiones son mucho más reducidas que el micelio de los hongos, son en muchos sentidos comparables. La mayoría de las actinobacterias forman esporas y la forma en que éstas se forman y se agrupan se usa en la separación de los distintos subgrupos conocidos. El contenido del ADN es de 63-78% de Guanina y Citosina lo que permite definirlos como bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina. La clase *Actinobacteria* resulta de especial interés por su versatilidad en actividades metabólicas. De hecho, en la naturaleza

juegan un papel crucial en la descomposición de compuestos orgánicos y contaminantes ambientales (Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Madigan *et al.*, 2006).

Hoy en día, se considera que las actinobacterias están implicadas en la formación de biopelículas y pueden causar cambios significativos en las propiedades físico-químicas de la estructura mineral (Warsheid y Braams, 2000). Este amplio y diverso grupo bacteriano cuenta con un extenso espectro de utilización de nutrientes que los hace capaces de crecer mediante el empleo de compuestos como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, macromoléculas complejas como la lignina y sustancias húmicas (Ball *et al.*, 1989; Saiz-Jiménez, 1997; Groth y Saiz-Jiménez, 1999; Zanardini *et al.*, 2000).

Las comunidades microbianas heterótrofas de los espeleotemas (estalactitas activas y concreciones de la pared), techo de galerías y suelos de la cueva, se han reportado dominados por actinobacterias. Esto sugiere que en algunos lugares dentro de las cuevas (suelos alterados y paredes de pasajes estrechos) la colonización con actinobacterias y su respectivo crecimiento se inició tras el descubrimiento de las cuevas, pero la presencia de dichos microorganismos en estalactitas activas y concreciones (acumulación de partículas unidas para formar una masa) de las paredes de las cuevas parece ser un proceso natural (Groth *et al.*, 1999; Leonila *et al.*, 2000; Groth *et al.*, 2001).

Debido a las constantes búsquedas humanas de minerales y otros productos por la industria minera, se han encontrado cuevas y galerías subterráneas que cuentan con condiciones de temperatura y humedad relativamente extremas para el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos (Lazcano, 2001). Sin embargo, es bajo estas condiciones que algunas de estas especies microbianas han encontrado un mejor hábitat, alejados de contacto con cualquier otro organismo vivo lo que les permite establecerse como la población dominante en este microambiente.

Las cuevas de Naica, encontradas en unas minas en el estado de Chihuahua y pertenecientes a Industrias Peñoles, podrían ser un ejemplo de lo mencionado previamente. La explotación del mineral en Naica requiere de la extracción de agua caliente, cuyo nivel freático original se encuentra a 110 metros de profundidad. El principal reto tecnológico es mantener en funcionamiento permanente un complejo sistema de bombeo que permite la extracción del agua desde el nivel -850 m. donde se encuentra actualmente el nivel freático. Este sistema drenó el agua de las cuevas hace aproximadamente 20 años y circunstancias accidentales lograron el descubrimiento de la Cueva de los Cristales en el año 2000 (Badino *et al.*, 2009).

Este sistema de bombeo que actualmente mantiene en operación la mina con la extracción de 22 mil galones de agua por minuto, parará en algún momento cuando la explotación mineral se agote, inundando nuevamente túneles y cuevas, permitiendo que éstas regresen a sus condiciones naturales y continúen alimentando el crecimiento de sus cristales bajo el agua (Badino *et al.*, 2009).

La Mina de Naica constituye un sistema geológico particular que condiciona el mecanismo responsable del desarrollo de macro-cristales de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como se muestra en la Figura 2 (García-Ruiz *et al.*, 2007).

Los macro-cristales se formaron bajo el agua en un punto donde el agua termal profunda, a 52°C saturada de sulfuros, entraba en contacto con aguas meteóricas frías y ricas en oxígeno que se infiltraban por escurrimiento natural (Marín *et al.*, 2006).

En la actualidad, el estudio, registro y conservación del sistema de cuevas de Naica es monitoreado minuciosamente. El presente trabajo se orientó hacia la caracterización fenotípica y genotípica de un grupo actinobacteriano aislado de este sistema de cuevas.

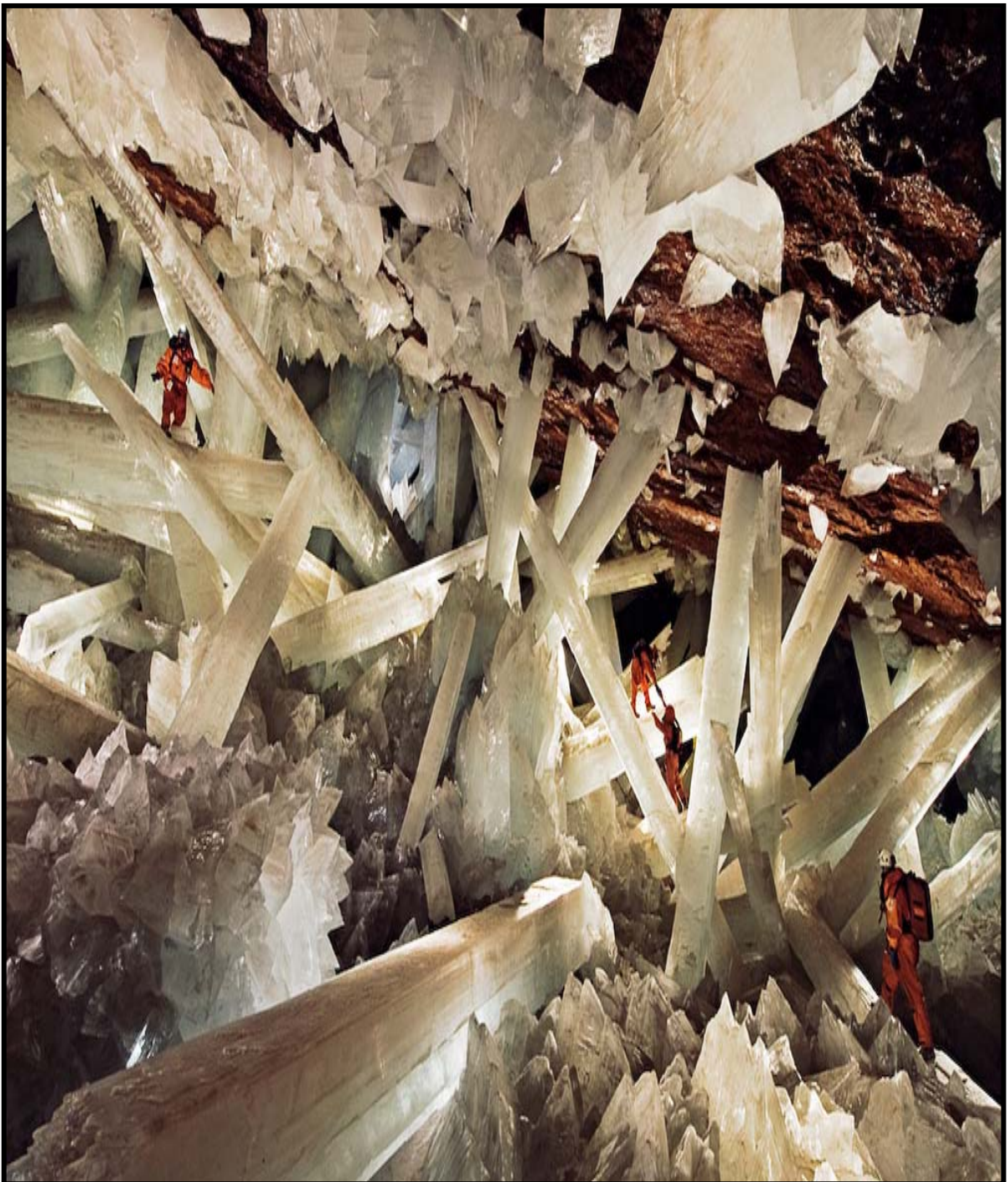


Figura 2. Vista interior de la Cueva de los Cristales, mina Naica, Chihuahua, México (Fuente: <http://www.photography.nationalgeographic.com/staticfile> -agosto, 2009-).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiversidad microbiana

Los procariontes, tradicionalmente conocidos como bacterias, son el grupo taxonómico que engloba a todos los organismos anucleados de la biosfera (Roselló, 2005). Dichos microorganismos han habitado el planeta por más de 3.5 millones de años y su diversidad se expresa en términos de fisiología y metabolismo, optimizando sus procesos bioquímicos para absorción y utilización de una amplia variedad de nutrientes, creando una regulación genética y vías únicas para satisfacer una diversidad de condiciones dentro de la naturaleza (Hunter-Cevera, 1998).

Los microorganismos existen en cada lugar del planeta desde ecosistemas acuáticos hasta terrestres lo que incluye cualquier ambiente o hábitat extremo. Estudios basados en biología molecular indican que solamente del 1 al 5% de las especies microbianas se han logrado cultivar en el laboratorio, por lo tanto, quedan por descubrir más del 95% de especies en toda la diversa gama de ambientes de nuestro planeta (Hunter-Cevera, 1998; Whitman *et al.*, 1998; Roselló, 2005; Maldonado *et al.*, 2005; Barton y Jurado, 2007). El conocimiento de la diversidad microbiana ha aumentado de manera espectacular con el empleo de herramientas moleculares.

Se define como *diversidad biológica* o *biodiversidad* a la variedad y variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte (Olalde y Aguilera, 1998). Una manera de visualizar la biodiversidad microbiana de un ecosistema es examinando el número de especies dentro de la comunidad y el tamaño de estas poblaciones. Sin embargo, la proporción de sus miembros se encuentra sujeta a cambios físicos y químicos en el medio ambiente, así como es dependiente de las actividades inherentes a los procesos fisiológicos y metabólicos por parte de los microorganismos (Hunter-Cevera, 1998).

Por medio de análisis del material genético, sobre todo del ácido desoxirribonucleico (ADN), la comprensión de la diversidad microbiana en los diferentes ecosistemas ha cambiado radicalmente. El uso de secuencias de ADN altamente conservadas ha permitido inferir relaciones evolutivas y taxones (cada una de las subdivisiones de la clasificación biológica) que aumentan el conocimiento sobre la extensión de la diversidad microbiana (Bull *et al.*, 2000).

La diversidad microbiana es una parte integral en el funcionamiento de un ecosistema ya que son precisamente los componentes microbianos los que contribuyen en los ciclos geoquímicos. Por lo tanto, resulta relevante su estudio así como el reconocimiento e identificación de nuevas comunidades microbianas.

2.2 Caracterización microbiana

Una parte integral en la identificación de los microorganismos, es el empleo de pruebas que incluyan las características fenotípicas y genotípicas de éstos como se describe brevemente a continuación.

2.3 Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana

El análisis de la composición de la célula microbiana revela que más del 95% del peso seco de la célula está constituido por unos pocos elementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. Por lo tanto, estos elementos son necesarios para el crecimiento bacteriano, además de condiciones físicas como pH, concentración de oxígeno, temperatura, presión atmosférica, salinidad y disponibilidad de agua (Prescott *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2006).

En general, la característica nutricional más notable de los microorganismos es su extraordinaria flexibilidad en relación con las fuentes de carbono, debido a que son el principal constituyente de la materia celular. Prácticamente, no existe ninguna molécula orgánica natural que no pueda ser empleada metabólicamente por un microorganismo ya sea éste una arquea o una bacteria. (Prescott *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2006).

Después del carbono, el siguiente elemento necesario y el más abundante es el nitrógeno. En una bacteria alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular lo que lo convierte también en un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo bacteriano.

El carbono y el nitrógeno son considerados como macronutrientes y son elementos necesarios para gran parte del crecimiento microbiano.

Entre las diferentes pruebas empleadas para la caracterización microbiana, la utilización de éstos dos macronutrientes se ha evaluado de manera tradicional desde los años 60's para establecer una matriz que describa el perfil metabólico del o de los microorganismos de estudio o interés (Sneath, 1957). Estas pruebas junto con el crecimiento a diferentes temperaturas y una curva de crecimiento a diferentes valores de pH permiten establecer no solo el diseño de esquemas de identificación (conocidos como "*tablas de identificación*") sino que al proporcionar el perfil metabólico de un microorganismo desconocido, esto puede facilitar el diseño y evaluación de medios de cultivo específicos para el aislamiento de grupos particulares que muestren cierta preferencia por uno u otro grupo de las pruebas aplicadas. Puesto que lo anterior es medido de "manera visual" y depende estrictamente de las características observables del microorganismo durante la lectura de las pruebas, esto es conocido como una caracterización "*fenotípica microbiana*" (Logan, 1994).

La caracterización fenotípica de casi cualquier microorganismo estuvo en algún momento de su historia basada en observaciones morfológicas y, aunque la morfología es todavía una característica importante para la descripción de taxones, no puede ser exclusiva debido a las mínimas diferencias morfológicas presentes entre muchos géneros (Labeda, 1987). El estudio detallado de las propiedades químicas de los distintos componentes de la pared celular microbiana complementó la información obtenida con la caracterización fenotípica y dio origen a la "*quimiotaxonomía*". Esta puede definirse como la aplicación de técnicas

analíticas bioquímicas (principalmente cromatografía y métodos de separación electroforética) para el estudio de distribuciones específicas de compuestos químicos en la pared celular de las bacterias, tales como aminoácidos, proteínas, azúcares y lípidos (Logan, 1994).

Por medio de la cromatografía en capa fina (Thin-Layer Chromatography TLC; del inglés), es posible separar y determinar los isómeros del DAP (un componente de la pared celular) y ésta técnica es importante para una primera clasificación de algunos miembros de la clase *Actinobacteria*. El procedimiento consiste en tomar varias colonias de la superficie del agar del medio de cultivo, posteriormente realizar una hidrólisis ácida empleando ácido clorhídrico (HCl) hasta la obtención de los aminoácidos de la pared celular. En una placa de celulosa (TLC) es posible visualizar los puntos del DAP en una gama de colores que van desde el gris, verde y amarillo, con los isómeros del DAP. Los aminoácidos aparecen con una coloración morada o roja y migran posteriormente después de los puntos del DAP (Staneck y Roberts, 1974).

2.4 Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana

Empleando como “modelo” a la caracterización fenotípica descrita anteriormente, la caracterización genotípica de un microorganismo consiste en el estudio de su material genético. Está basado en el empleo de secuencias de ADN.

De acuerdo a determinaciones geoquímicas, se considera una edad de 4600 millones de años para el planeta Tierra. Las primeras evidencias de procariontes, datan aproximadamente desde hace más de 3500 millones de años. Estas formas de vida primitiva posiblemente carecían de ADN, contenían algunas proteínas y consistían principalmente de ARN utilizado únicamente en procesos de replicación. Por lo tanto un periodo de vida con ARN pudo haber precedido a la vida celular (Madigan *et al.*, 2006).

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, los ARN ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las

relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los ARN ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. Éstos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos.

Existen tres moléculas de ARN ribosómico, que en procariontes tienen distintos tamaños: 5S (120 nucleótidos -nt-), 16S (1500 nt) y 23S (2900 nt). Estas moléculas contienen regiones de secuencia altamente conservada que resultan útiles para obtener alineamientos de secuencia apropiados. El ARN 16S es mucho más manejable experimentalmente con respecto al 23S, por lo tanto se ha utilizado para el desarrollo de bases de datos para eucariontes y procariontes. Estas bases de datos de libre acceso permiten la comparación inmediata de secuencias “desconocidas” contra toda la información contenida en ellas (Figura 3 Madigan *et al.*, 2006).

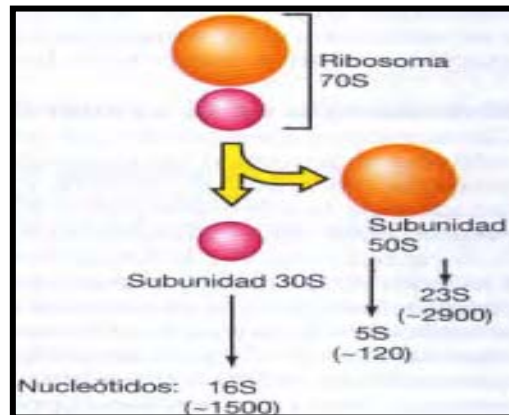


Figura 3. Partes del ribosoma: 5S, 16S y 23S formas del ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (Madigan *et al.*, 2006)

Técnicas basadas en la información genética de los microorganismos para lograr su identificación, por ejemplo, la secuenciación de su genoma o de algún gen en específico, permiten la amplificación (aumento en el número) de una secuencia definida del ADN a través de una técnica llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction; PCR del inglés) para posteriormente estudiarla. Es precisamente a partir de la obtención de un cultivo

puro de un microorganismo que la técnica de PCR puede emplearse para amplificar directamente los genes que codifican el ARN ribosómico 16S.

2.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue inventada por Kary Mullis en 1983 y su primera publicación fue hasta 1985. Dicha técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a partir de otra ya existente. Sus únicos requerimientos: son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se requiere copiar para que sirva como cebadora ó “primer”. Ésta técnica emplea mínimas cantidades de ADN (menor a 1 µg), puede ser visualizado aproximadamente en 3 horas y por último, los productos de la PCR pueden ser purificados para posteriormente ser secuenciados (Kim *et al.*, 2002).

La técnica de la PCR consta básicamente de 3 etapas fundamentales, dividida en varios ciclos (usualmente de 25 hasta 40) y comprende (Figura 4):

- Desnaturalización (95°C),
- Alineamiento (55–60°C),
- Extensión (72°C).

En una PCR, primeramente se desnaturaliza el ADN por medio de calor (95°C) para casi de inmediato bajar la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras sean separados hasta que se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos complementarios, con la respectiva formación de híbridos estables con la molécula que funciona como molde o plantilla. Dichos oligonucleótidos funcionan como cebadores (también denominados oligonucleótidos, iniciadores o “primers”) de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la *Taq* polimerasa (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y resistente a altas temperaturas) extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos empleando las hebras del ADN bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como extensión

y que usualmente se lleva a 72°C, por tratarse de la temperatura óptima de la *Taq* polimerasa (Metzker y Caskey, 2001; Kim *et al.*, 2002).

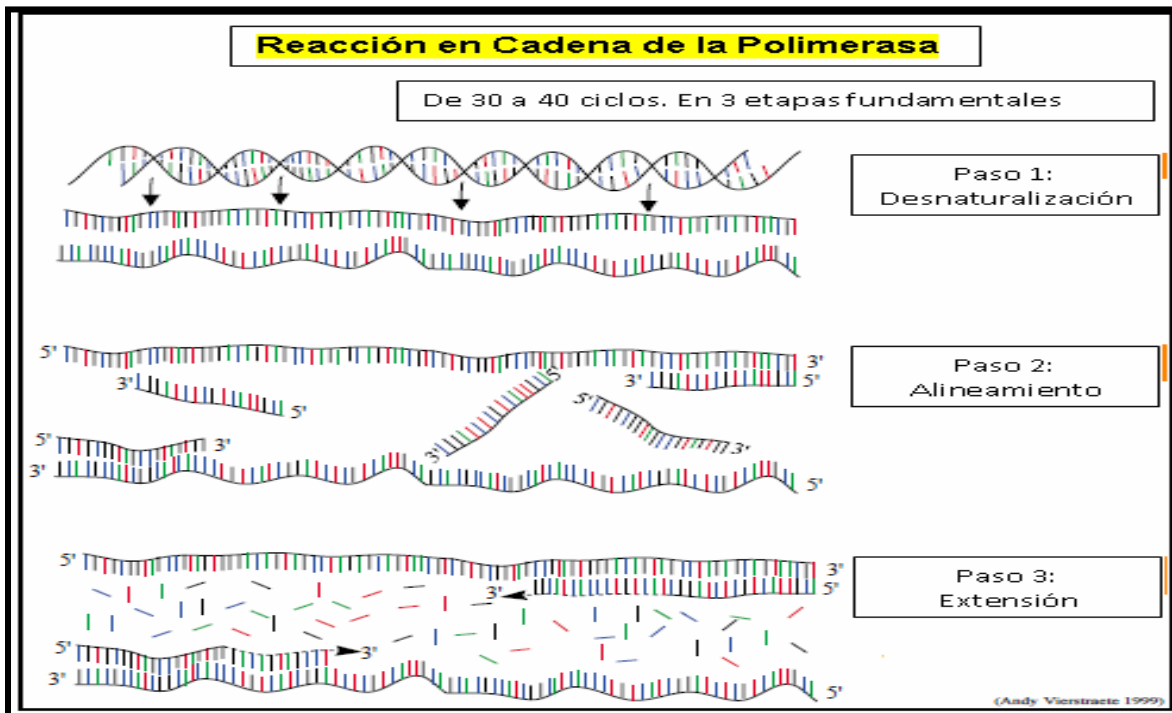


Figura 4. Pasos generales de la PCR

(Fuente: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif> -agosto, 2009-).

Una siguiente desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Al término del primer ciclo de reacción se obtienen dos copias idénticas bicatenarias del ácido nucleico original. Esto se repite alrededor de 25 a 40 veces, sin la adición de más enzima y empleando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como molde o plantilla. De esta manera se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos. Al término de todos los ciclos, la muestra se enfría a 4°C para su conservación y posterior análisis.

Para realizar la técnica de PCR se necesitan los siguientes reactivos (White, 2005; Newton y Graham 1997).

- **Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)**, provee de nucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina y Tiamina) a la reacción para la síntesis de ADN.

- **Oligonucleótidos**, secuencias cortas (normalmente de 18 a 22 nucleótidos) que se emplean para iniciar la reacción y actúan como secuencias complementarias a las dos hebras de ADN.
- **Iones de magnesio (Mg^{2+})**, una concentración óptima de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), es requerida para la actividad y fidelidad de la enzima ADN polimerasa.
- **Búffer**, mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- **ADN (*Taq*) polimerasa**, actúa empleando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria.
- **ADN molde**, es la muestra que se desea amplificar.
- **Termociclador**, aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo de la PCR.

Los productos obtenidos por la PCR se visualizan mediante electroforesis en donde se espera observar tanto el tamaño del producto como el número de bandas. Si esto no llegase a ocurrir usualmente es necesario optimizar las condiciones de reacción.

El secuenciamiento del ADN o productos de PCR es la determinación del orden de bases en una molécula. Existen básicamente dos métodos: la degradación química o método de Maxam-Gilbert y la síntesis enzimática de la región a secuenciar o método de los dideoxi de Sanger. En secuenciación, un gran avance tecnológico lo constituyó la introducción de equipos automatizados los cuáles son usados para separar los productos de las reacciones de secuenciación, detectar y finalmente coleccionar (a través de una computadora) la información de las reacciones así como establecer el orden de las bases para automáticamente deducir la secuencia del fragmento de ADN de Interés (Figura 5; Hardin, 2001; Maldonado, 2009).

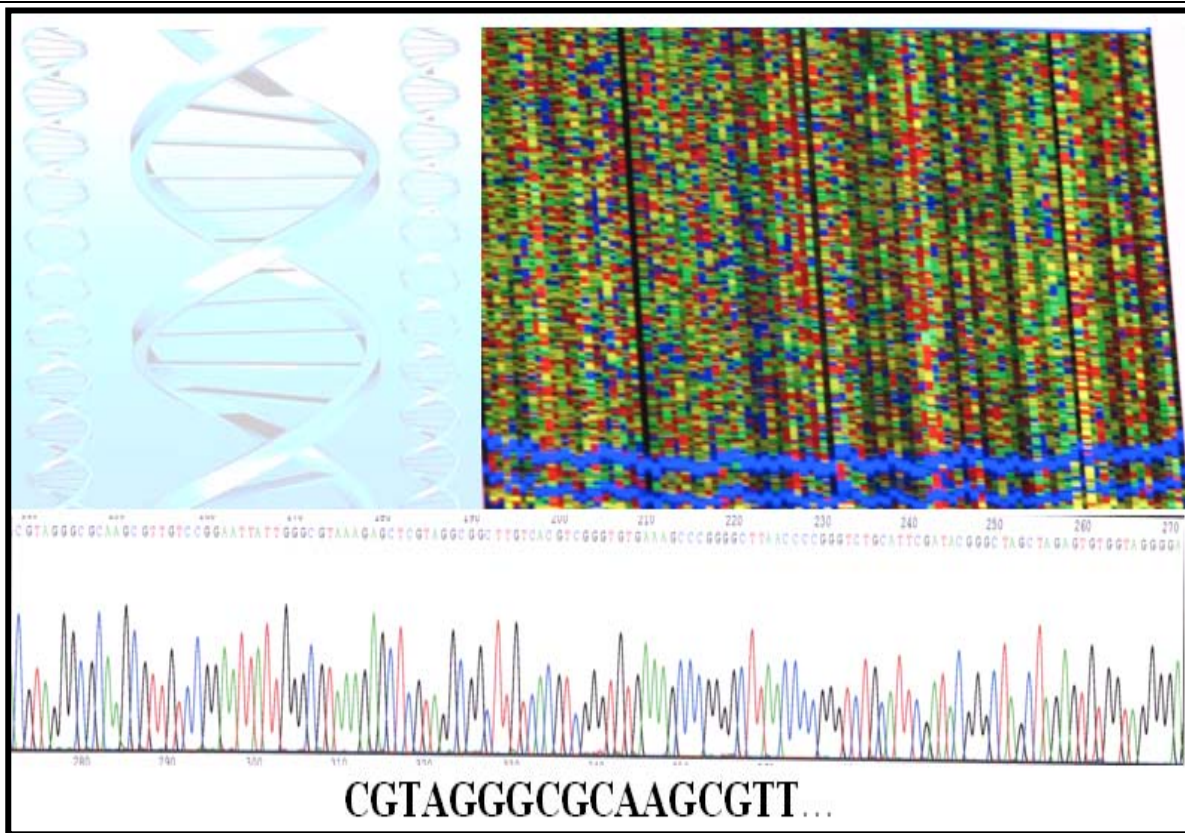


Figura 5. Esquema que muestra la doble cadena de ADN, imagen de un gel de secuenciación y cromatograma o representación gráfica de la secuencia correspondiente (parte inferior; Maldonado, 2009).

2.5 La clase *Actinobacteria* y la familia *Pseudonocardiaceae*

El origen de la palabra *actinomiceto* tiene una larga historia taxonómicamente confusa. Su origen proviene de los siguientes vocablos: *actino* “rayo” y *myces* “hongo”, por lo que una definición “estricta” sería “hongo radiado”. La primera clasificación formal se dio en el año 1943 con Waksman y Henrici, al considerar dichos microorganismos como un puente evolutivo entre bacterias y hongos. Transcurrieron varias décadas considerando a este grupo microscópico como parte del reino Fungi, debido a sus características morfológicas notablemente similares al crecimiento de los hongos. Después de numerosos estudios basados en las propiedades quimiotaxonómicas y con la comparación de secuencias ribosomales del gen 16S rARN, finalmente se estableció que estos “hongos radiados” se encuentran relacionados filogenéticamente a las Eubacterias y ocupando un lugar cercano con las bacterias Gram positivas (Figura 6).

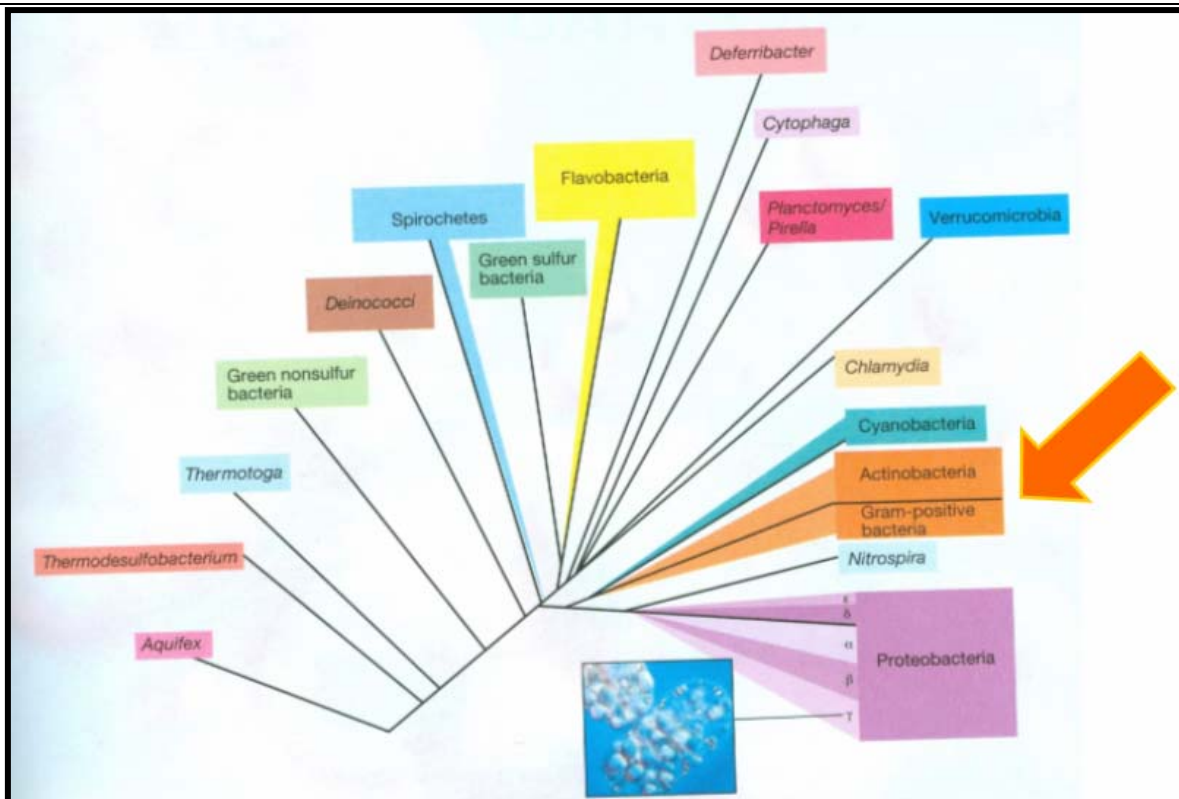


Figura 6. Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S ribosomal. La flecha indica la posición taxonómica de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.* 1997; Zhi *et al.*, 2009) dentro de las Eubacterias (Madigan *et al.*, 2006).

Una vez establecida su posición evolutiva, el término clase *Actinobacteria* es el que se utiliza actualmente para su denominación genérica aunque en muchas ocasiones sea el término original (actinomiceto) el que siga prevaleciendo entre diferentes grupos de investigación. La clase *Actinobacteria* incluye diversas familias, géneros y subórdenes. La gran mayoría de los géneros que comprende han sido aislados de fuentes terrestres ya que se consideraba este hábitat como su reservorio por excelencia aunque actualmente estudios sobre biodiversidad microbiana apuntan a señalar al ambiente marino como un buen reservorio de este grupo microbiano (Maldonado *et al.*, 2005, Gontang *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2009).

Actualmente, la clase *Actinobacteria* es un grupo extremadamente diverso que para agosto del 2009, comprendía 51 familias y 257 géneros (<http://www.ncbi.nlm.gov>). Los géneros más conocidos en el área clínica y en el ámbito industrial y económico son *Mycobacterium* y *Streptomyces*, respectivamente.

El primero y en particular la especie *M. tuberculosis* es uno de los agentes infecciosos de mayor renombre en la historia de la humanidad pues se estima que cerca de un tercio de la población está infectada con la enfermedad y el restante en algún momento de su vida podría adquirir la primo-infección, es decir, el primer contacto que monta una respuesta inmunológica contra el patógeno (Demangel *et al.*, 2005). De manera opuesta y sobresaliente, el género *Streptomyces* incluye actualmente más de 575 especies descritas y son los modelos genéticos por excelencia en cuanto a la producción de antibióticos. El descubrimiento y empleo de la estreptomina por *Streptomyces griseus* además de haber sido el primer fármaco empleado para el tratamiento de la tuberculosis en 1948 constituye un ejemplo paradójico de los beneficios y los perjuicios de los miembros de la clase *Actinobacteria* (Hopwood, 2007).

De esta paradoja se desprende el hecho importante de la composición de la pared celular presente en géneros relacionados a *Mycobacterium* tales como *Gordonia*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (entre otros) lo que además les proporciona su característica “ácido alcohol-resistencia” (Goodfellow y Maldonado, 2006). Los grupos actinobacterianos que comparten esta propiedad pertenecen al subgrupo de los “productores de ácidos micólicos” (del inglés Mycolic Acid Containers o MAC) y muestran un diferente grado de tinción ácido alcohol-resistencia mediada por la presencia de diferentes tamaños de cadenas de carbono en sus ácidos micólicos. Aquellos grupos actinobacterianos que no muestran ácidos micólicos en su pared celular pero que muestran una morfología similar al género *Nocardia* fueron reclasificados en una nueva familia denominada *Pseudonocardia* (“las falsas *Nocardia*”) precisamente para justificar la existencia de grupos morfológicamente similares a *Nocardia* pero que no cuentan con ácidos micólicos en su pared celular (Logan, 1994).

2.6 La Familia *Pseudonocardiaceae*

Con base en secuencias del gen 16S rARN y características quimiotaxonómicas basadas en la ausencia de ácidos micólicos, se propuso la familia *Pseudonocardiaceae* que actualmente incluye los siguientes 14 géneros: *Actinoalloteichus*, *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Crossiella*, *Goodfellowia*, *Kibdelosporangium*, *Kutzneria*, *Prauserella*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptoalloteichus*, *Thermobispora* y *Thermocrispum* (Jiang *et al.*, 2008). La incorporación a esta lista del género “*Prauseroides*” aún no ha sido autorizada aunque la secuencia del gen del 16S ARN ribosomal está disponible en los sitios de bases de datos de la red desde diciembre del 2008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Todos los géneros “aprobados” de esta familia varían en su morfología y en otras características fenotípicas, por lo que su identificación a nivel macroscópico es complicada (Embley, 1992; Takeuchi *et al.*, 1992; Warwick *et al.*, 1994).

La familia *Pseudonocardiaceae* incluye géneros de interés industrial como el caso de los productores de antibióticos eritromicina, rifampicina y vancomicina producidos por *Saccharomonospora erythraea*, *Amycolatopsis mediterranei* y *Amycolatopsis orientalis*, respectivamente (Okazaki *et al.*, 1983). Todos los miembros son aeróbicos y catalasa-positivos, pero presentan una amplia gama de diferentes fisiologías desde autotróficas a termofílicas hasta halófilos (Embley, 1992). Estos microorganismos forman un grupo coherente de la clase *Actinobacteria* en el árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S rARN como se indica en la Figura 7.

Algunas especies de estos géneros, *Amycolatopsis jejuensis*, *A. halotolerans*, *Prauserella halophila* y *P. alba* han sido aislados de cuevas y/o ambientes extremos por lo que el estudiar este grupo actinobacteriano en ambientes extremos nacionales es un tema interesante de investigación.

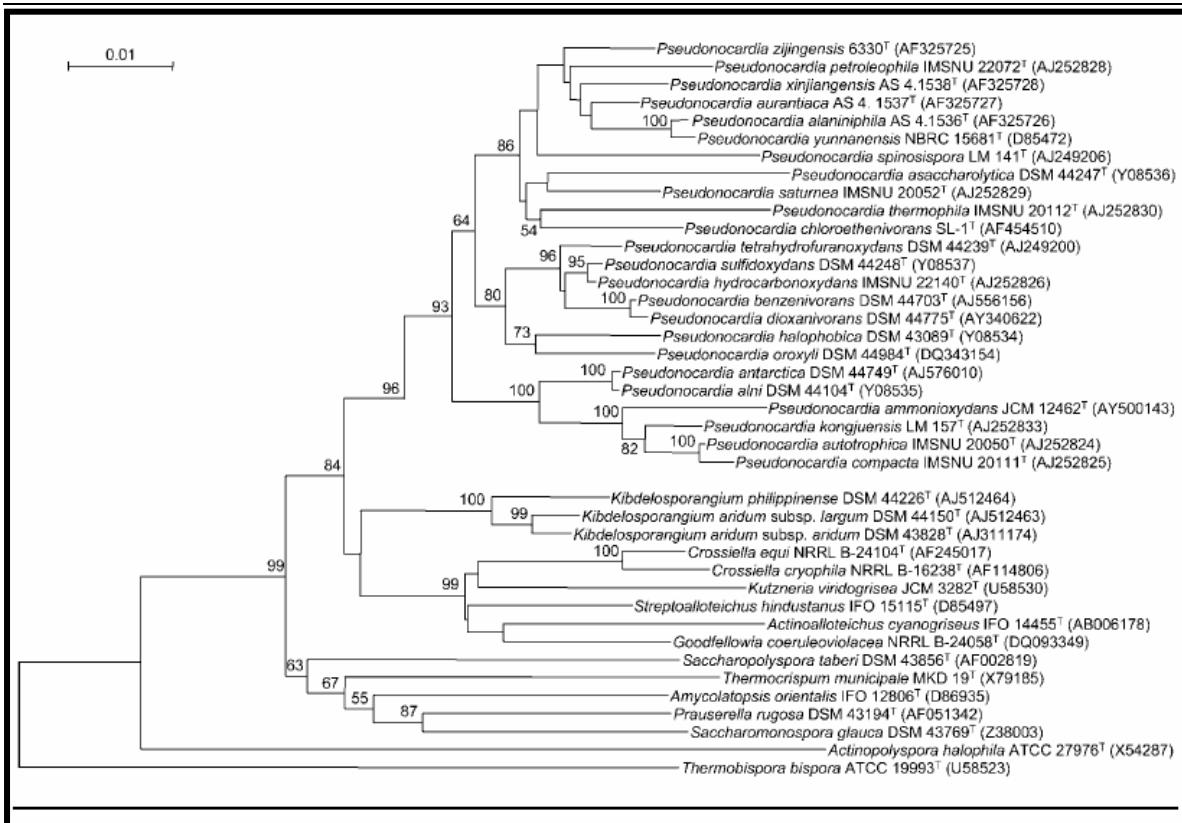


Figura 7. Árbol filogenético construido por el método del vecino más cercano derivado de las secuencias del gen 16S rARN mostrando la relación entre los géneros de la familia *Pseudonocardiaceae* (ligeramente modificado de Jiang *et al.*, 2008).

2.7 Área de Estudio

2.7.1 Ubicación

La Cueva de los Cristales se encuentra en el nivel -290 metros dentro de la mina Naica (latitud 27°52'00"N, longitud 105°26'15"W, altitud 1500 metros SNM) la cual se ubica al norte de la Sierra de Naica, a 112 km al SE de la ciudad de Chihuahua, México. El área esta formada por una estructura en domo de orientación NO-SE de 12 km de largo por 7 km de ancho (García-Ruíz *et al.*, 2007; Figura 8).

2.7.2 Descripción general

La mina Naica es considerada uno de los depósitos de plomo, zinc y plata más importantes del mundo, de ahí gran parte de su relevancia para el grupo Peñoles (García-Ruíz *et al.*, 2007).

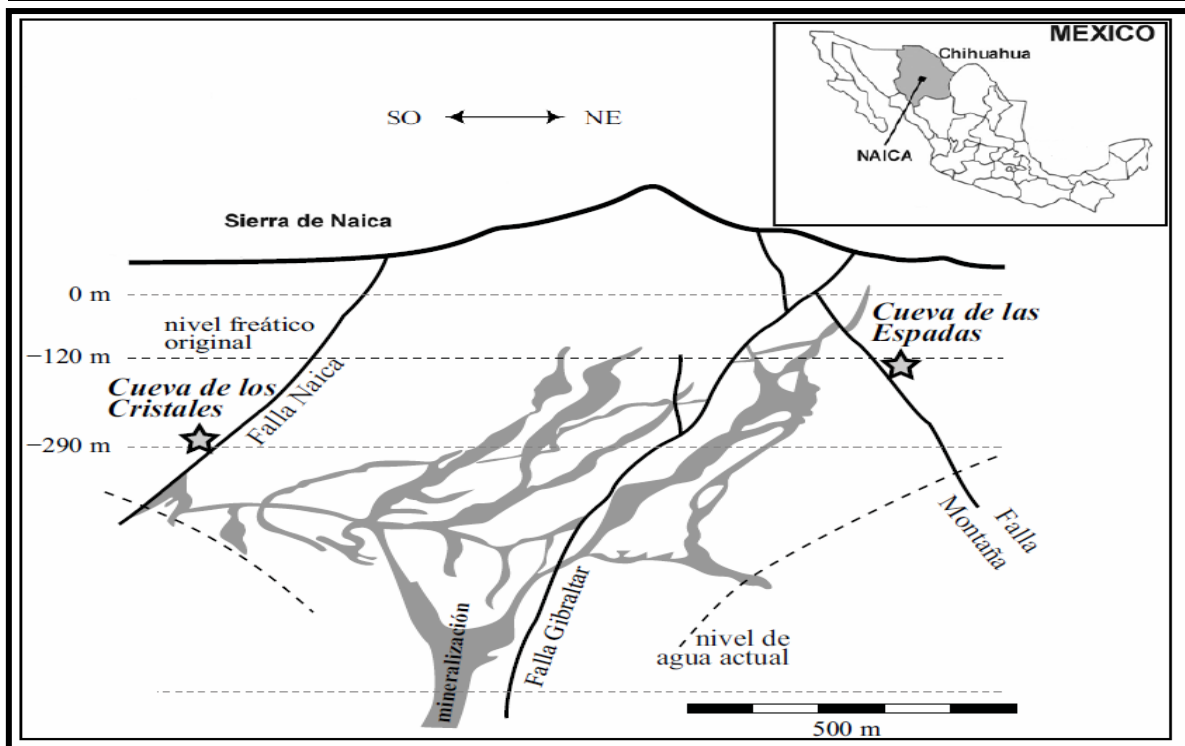


Figura 8. Ubicación geográfica de la Cueva de los Cristales dentro de la mina Naica (García-Ruíz *et al.*, 2007).

2.7.2 Descripción general

La mina Naica es considerada uno de los depósitos de plomo, zinc y plata más importantes del mundo, de ahí gran parte de su relevancia para el grupo Peñoles (García-Ruíz *et al.*, 2007).

Según la tradición, Naica significa “*lugar sin agua*” pero muy probablemente el término es de origen tarahumara, proveniente de la raíz *Rarámuri* “Nai” (lugar) y “ka” (sombra), que significa “*lugar sombreado*”, como se justificaría por la sombra proyectada de la sierra en el desierto colindante (Lazcano, 2001).

Debido a la constante búsqueda de metales, se han realizado excavaciones de nuevas galerías y túneles en la mina Naica, descubriendo cuevas que contienen cristales métricos de selenita, la variedad cristalina transparente del yeso. Uno de estos hallazgos se refiere a la Cueva de los Cristales, descubierta en el año 2000 por los hermanos Delgado, mineros de la Industria Peñoles. La cueva se encuentra recubierta por cristales de selenita de hasta 11 metros de longitud por 1 metro de grosor, dimensiones superiores a cualquier cristal de yeso hasta ahora descubierto (Figura 9). El tamaño de la cueva es de casi 50 metros de largo por 30 metros de ancho.



Figura 9. Cueva de los Cristales. Se observan los cristales de selenita que “nacen” de la base y/o paredes del sitio. (Fuente: <http://www.panoramio.com/photo/16723529> -agosto 2009-).

Los macro-cristales de selenita (yeso) se formaron bajo el agua en un punto donde el agua termal profunda, a 52°C saturada con sulfuros estaba en contacto con aguas meteóricas frías y ricas en oxígeno que se infiltraban por escurrimiento natural. Esta agua al no mezclarse directamente debido a la diferencia de densidad con aquellas más profundas y mineralizadas, provocaron la “difusión” del oxígeno con el estrato inferior con la consiguiente oxidación de los iones de sulfuro a sulfato, con una leve sobre-saturación respecto al yeso y por lo tanto una lenta deposición. Estas condiciones singulares permitieron una mineralización extraordinaria para formar cristales gigantes de selenita, cuyo tamaño obedece a las condiciones de estabilidad durante miles de años.

Debajo de la Cueva de los Cristales se encuentra una cámara magmática, un enorme lago fundido a una alta temperatura, lo que provoca el calentamiento de las aguas termales hasta los 52°C y con una humedad al 100%, por lo que se considera una de las cuevas más calientes del mundo. De hecho, una persona sin el equipo adecuado no podría sobrevivir dentro de la cueva por algunos minutos y el acceso con fines de investigación es restringido a 30 minutos para evitar cualquier posible percance (Lazcano, 2001; Marín *et al.*, 2006; García-Ruíz, *et al.*, 2007).

2.8 Planteamiento del Problema

Existen pocos o nulos reportes acerca de microorganismos habitantes de cuevas y mucho menos de aquellos en condiciones extremas, como es el área de estudio del presente trabajo. Por lo tanto, resulta importante identificar a dichos microorganismos, conocer sus características así como su posible utilidad en el área clínica o industrial.

Al ser México un país megadiverso que cuenta con cerca del 20 % de su territorio nacional en cuevas, este tipo de hábitat es probable que presente nuevos microorganismos aún por descubrir. Este trabajo de investigación se concentró en la caracterización de microorganismos procedentes de la Cueva de los Cristales de la mina Naica en el estado de Chihuahua.

2.9 Objetivo General

Caracterizar y comparar feno-genotípicamente actinobacterias aisladas de la Cueva de los Cristales (mina Naica, Chihuahua).

2.10 Objetivos Particulares

De las actinobacterias aisladas:

- Determinar el crecimiento en diversas fuentes de Carbono.
- Determinar el crecimiento en diversas fuentes de Nitrógeno.
- Comparar el efecto de diferentes valores de pH en el crecimiento.
- Analizar el grado de tolerancia en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).
- Determinar el efecto de diferentes antibióticos.
- Determinar la degradación en diferentes sustratos.
- Realizar un estudio comparativo y establecer su filogenia.

2.11 Hipótesis

Las actinobacterias recuperadas de la Cueva de los Cristales (mina Naica, Chihuahua) cuyo ambiente presenta condiciones extremas y distintas a cualquier otra cueva en el mundo, es probable que formen nuevos núcleos taxonómicos en el árbol filogenético de la familia *Pseudonocardiaceae*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizaron distintos análisis microbiológicos y moleculares para la caracterización fenotípica y genotípica de microorganismos obtenidos de la Cueva de los Cristales (Naica, Chihuahua).

El estudio microbiológico constó de las siguientes determinaciones: a) utilización de fuentes de carbono, b) utilización de fuentes de nitrógeno, c) crecimiento a diferentes valores de pH, d) tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), f) sensibilidad a antibióticos, g) características morfológicas macroscópicas, h) determinación del DAP y finalmente i) caracterización en pruebas de degradación.

En cuanto al estudio molecular: a) extracción de ADN, b) electroforesis horizontal, c) PCR con primers universales, d) secuenciamiento del producto de PCR, e) construcción del árbol filogenético.

Un diagrama indicativo (diagrama de flujo) de las diferentes etapas que el presente trabajo de investigación incluyó se anexa a continuación (Figura 10).

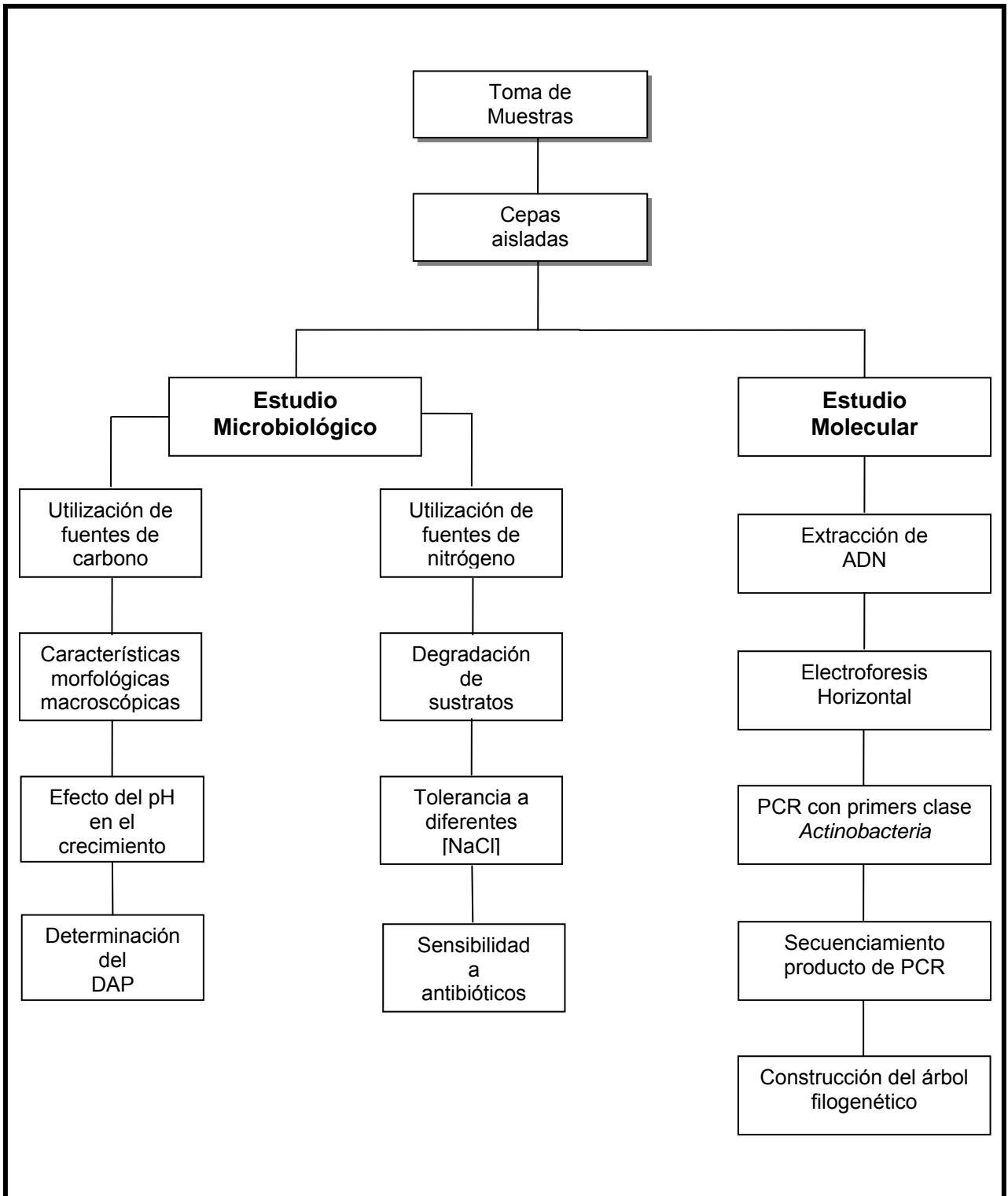


Figura 10. Esquema general del trabajo de investigación

3.1 Aislamiento y cultivo de cepas

Las muestras fueron obtenidas de la Cueva de los Cristales ubicada dentro de la mina Naica (Chihuahua). Se recolectaron tanto 1 g de cristal como 1 g de pared de la cueva. Se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) con solución salina isotónica (SSI) para todas las muestras obtenidas. A partir de las diluciones, se transfirieron a cajas de Petri que contenían medio de cultivo EMA (Extracto de Malta) adicionado con 0.5% y 1% de CaSO₄ y medio PDA (Potato Dextrose Agar). Ambos medios se incubaron a 45°C, temperatura dentro de la cueva cuando se tomaron las muestras.

Se realizaron tinciones de Gram al igual que el análisis micro- y macroscópicos de las morfologías microbianas que se desarrollaban en los medios de cultivo. El aspecto macroscópico de las colonias sugirió que éstas pertenecían a la clase *Actinobacteria*, las cuales pueden crecer bajo condiciones extremas.

Se resembraron los microorganismos en medios de cultivo específicos para el crecimiento de actinobacterias, como es el caso de medio GYM (Agar Extracto de Levadura y Extracto de Malta; DSMZ 2001; Anexos) y GYEA (Agar Extracto de Levadura; Gordon y Mihm, 1962; Anexos) a 45°C hasta obtener colonias puras.

Al transcurrir una semana de incubación, se hicieron observaciones del desarrollo macroscópico, se tomaron 7 cajas de Petri, las cuales parecían contener microorganismos completamente diferentes entre cada caja con medio de cultivo.

3.1.1 Preparación del inóculo para las pruebas fenotípicas

Se obtuvo biomasa fresca (7 días de crecimiento en GYEA, a 45°C) de los 7 aislados de estudio, depositándose en crioviales de plástico con rosca estériles, previamente identificados, que contenían 1.3 mL de solución salina isotónica

(0.9%) para obtener una suspensión de cada uno de los microorganismos que se estudiaron.

3.1.2 Inoculación de las diferentes pruebas fenotípicas

Las cajas Petri con agar ISP-9 y medio basal se enumeraron y etiquetaron de tal forma que se asegurara fuera posible inocular cinco microorganismos por caja como se ilustra en la Figura 11. Siete μL de cada suspensión de microorganismos se inocularon en cada caja petri. Estas placas se incubaron a 37°C por 14 días, revisando y registrando los resultados a los 7 y 14 días de crecimiento en una tabla de Excel (Microsoft Corp, EUA).

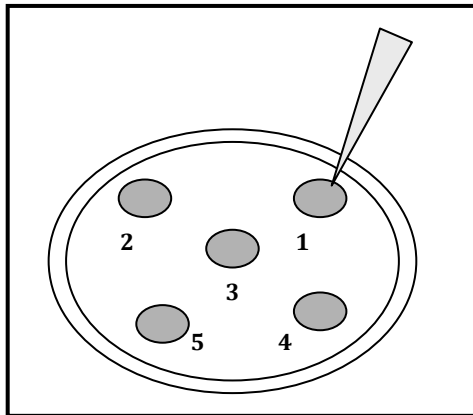


Figura 11. Forma de inoculación de los microorganismos de estudio en las cajas de Petri.

3.2 Caracterización morfológica macroscópica de las bacterias de estudio

Las cepas Naica AE-2, Naica AE-4y-A, Naica AE-4x, Naica AE-5, Naica AE-7, Naica AE-11x y Naica AE-12, se sembraron en el medio GYEA y se incubaron a 37°C por 14 días. Las características morfológicas micro- y macroscópicas de cada uno de los microorganismos se registraron a los 7 y 14 días de crecimiento con excepción de la tinción de Gram que se realizó y observó a los 10 días de sembrado.

3.3 Determinación de los isómeros del ácido diaminopimérico

En crioviales estériles, previamente marcados con la clave correspondiente a cada cepa, se agregaron dos asadas de biomasa fresca de cada microorganismo, los cuales se homogeneizaron con 500 μ L de ácido clorhídrico 6N (HCl; J.T. Baker, México) y 100 μ g de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, México). Se agitaron durante 10 minutos a máxima velocidad en un vórtex. Posteriormente se colocaron durante 4 horas en un horno de convección ajustado previamente a 100°C, al transcurrir el tiempo, se retiraron los crioviales y se enfriaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de cada criovial se transfirió con una micropipeta (Gilson, Francia) a un tubo Eppendorf estéril (1.5 mL) se evaporó el contenido hasta sequedad, en una parrilla de calentamiento ajustada a una temperatura de 100°C. Se agregaron 500 μ L de agua destilada agitando suavemente cada criovial. El líquido se evaporó nuevamente hasta sequedad y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 100 μ L de agua destilada con la finalidad de reconstituir los hidrolizados.

En cuanto a la observación de los isómeros del DAP, éstos se separaron en una placa de cromatografía en capa fina de dimensiones 20 cm x 20 cm y un espesor de 0.5 mm (Merck, Alemania). Se aplicó 1 μ L de solución estándar en el primer y último carril de la placa previamente marcada y conservando 1 cm entre cada muestra. De cada muestra, se aplicaron 4 μ L que contenían los hidrolizados del DAP de cada uno de los microorganismos aislados. La placa de TLC se reveló en un tanque con Metanol:Agua:HCl-6N:Piridina en una proporción 80:26:4:10 (v/v) durante 4 horas. Pasado este tiempo la placa se retiró del tanque y se dejó secar a temperatura ambiente por un tiempo de 15 minutos en una campana de extracción. Una vez seca la placa se roció con una solución de ninhidrina (0.2%), se dejó secar por otros 15 minutos y pasado este tiempo se colocó en un horno de convección a 100°C durante 3 minutos para finalmente retirarla del horno y observar los isómeros del DAP comparando contra aquellos del estándar.

3.4 Utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de los microorganismos en 22 fuentes de carbono y 13 fuentes de nitrógeno (Tablas 1 y 2, respectivamente).

Para la preparación de los medios de cultivo se pesaron 1 g de las fuentes de carbono y 0.1 g de las fuentes de nitrógeno (respectivamente) y ambas se disolvieron en 20 mL de agua bidestilada. Por separado, se prepararon los medios ISP-9 (International *Streptomyces* Project, del inglés) y medio basal para las fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente (Shirling y Gottlieb, 1966; Anexos). Los medios y las fuentes de carbono y nitrógeno se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión, a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizados ambos componentes, se dejaron enfriar aproximadamente a 45°C y se mezclaron individualmente antes de verter en cajas Petri de plástico estériles.

Las cajas de Petri se incubaron a 37°C durante 14 días y el crecimiento de los microorganismos se registró a los 7 y 14 días.

La ponderación de los valores presentados en las tablas de la caracterización fenotípica se basó principalmente en el desarrollo de cada uno de los microorganismos. Se indicó ausencia de desarrollo con (-) y la presencia con (+++++) si éste fue excelente, con diferentes rangos de desarrollo entre los extremos.

3.5 Tolerancia de los aislados a diferentes concentraciones de NaCl

La capacidad de los aislados para tolerar diferentes concentraciones de NaCl se evaluó preparando medio GYEA como medio basal al cual se le agregaron diferentes concentraciones de NaCl, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20%. Las cajas Petri se numeraron, etiquetaron, inocularon e incubaron a las mismas condiciones que se indicaron en el punto anterior.

3.6 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados

Se evaluó el crecimiento de los siete aislados en los siguientes valores de pH: 5, 6, 7, 8 y 9. Se utilizó medio de cultivo GYEA al cual se le adicionaron diferentes concentraciones de buffers que permiten mantener el pH de evaluación en el medio de cultivo empleado.

Tabla 1. Fuentes de carbono seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de carbono: 1.0%).

	Fuentes de Carbono	Tipo		Fuentes de Carbono	Tipo
1	Ácido Malónico	Ácido dicarboxílico	12	Lactosa	Disacárido
2	Adonitol	Monosacárido	13	Maltosa	Disacárido
3	Arabinosa	Monosacárido	14	Manitol	Poli-alcohol
4	Celobiosa	Disacárido	15	Manosa	Monosacárido
5	Celulosa	Polisacárido	16	Pectina	Polisacárido
6	Dextrano	Polisacárido	17	Rafinosa	Trisacárido
7	Fructosa	Monosacárido	18	Ribosa	Monosacárido
8	Galactosa	Monosacárido	19	Sorbitol	Poli-alcohol
9	Glicerol	Alcohol	20	Sucrosa	Disacárido
10	Glucosa	Monosacárido	21	Xilitol	Poli-alcohol
11	Inositol	Poliol	22	Xilosa	Monosacárido

Tabla 2. Fuentes de nitrógeno seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de nitrógeno: 0.1%).

	Fuentes de Nitrógeno	Tipo		Fuentes de Nitrógeno	Tipo
1	Ácido aspártico	Ácido	8	Isoleucina	Alifático
2	Ácido glutámico	Ácido	9	Ornitina	Dibásico
3	Adenina	Base nitrogenada	10	Prolina	Alifático
4	Alanina	Alifático	11	Serina	Hidroxilado
5	Arginina	Básico	12	Triptófano	Aromático
6	Fenilalanina	Aromático	13	Valina	Alifático
7	Histidina	Básico			

3.7 Sensibilidad a diferentes antibióticos

La tolerancia de los aislados a 10 diferentes antibióticos empleados a 4 distintas concentraciones se indican en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Antibióticos seleccionados para el presente estudio

Antibióticos	Tipo	Concentraciones empleadas (µg/mL)
Ácido Nalidíxico	Quinolona	8 / 16 / 32 / 48
Clortetraciclina	Tetraciclina	8 / 16 / 32 / 48
Demeclociclina	Tetraciclina	8 / 16 / 32 / 48
Eritromicina	Macrólido	5 / 10 / 15 / 20
Estreptomicina	Aminoglucósido	5 / 10 / 15 / 20
Kanamicina	Aminoglucósido	5 / 10 / 15 / 20
Neomicina	Aminoglucósido	4 / 8 / 12 / 16
Penicilina G	β- láctamico	5 / 10 / 15 / 20
Rifampicina	Ansamicina	1.25 / 2.5 / 3.75 / 5
Vancomicina	Glucopéptido	0.15 / 0.30 / 0.45 / 0.60

En este caso, se empleó medio GYEA adicionado con los antibióticos indicados en la Tabla 3 y a cada una de las respectivas concentraciones. Los antibióticos se prepararon por filtración y a partir de una solución concentrada. Las placas se enumeraron, etiquetaron, inocularon e incubaron de la misma forma que se indicó para los incisos anteriores. Los resultados de esta prueba se revisaron y registraron también como para los incisos anteriores.

3.8 Pruebas de degradación de sustratos

Empleando el medio GYEA como base, se prepararon cajas Petri a las cuáles se les agregó el compuesto por degradar previo a su esterilización en autoclave bajo las condiciones indicadas previamente. Una vez pasado el tiempo de esterilización y que la temperatura del medio estuviera alrededor de los 45°C, éste se vació en cajas Petri para posteriormente ser inoculado con los microorganismos de estudio. Los compuestos empleados en las pruebas de degradación se indican en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Compuestos empleados para las pruebas de degradación. Se indica entre paréntesis la concentración final de cada compuesto en el medio.

Adenina (0.4%)	Guanina (0.4%)
Almidón (0.1%)	Hipoxantina (0.4%)
Caseína (0.5%)	Tirosina (0.5%)
Elastina (0.3%)	Xantina (0.4%)

3.9 Extracción de ADN de los aislados

En tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL (previamente marcados con la clave correspondiente a cada cepa), se homogeneizaron dos asadas de biomasa fresca de microorganismos con 100 µg de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, EUA) y 500 µL de búffer Glucosa-Tris-EDTA. Posteriormente se colocaron los tubos Eppendorf en el refrigerador a 4°C durante 12 horas. Al transcurrir el tiempo, se agitaron constantemente en un vórtex (Daigger-Genie 3, EUA) a velocidad máxima durante 15 minutos y una vez transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm en una minicentrífuga MiniSpin-Plus (Eppendorf, EUA). Los sobrenadantes de cada tubo (400 µL) se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, descartándose tanto la biomasa como las perlas de vidrio remanentes de los tubos originales. A cada tubo se adicionó el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 v/v respectivamente; Sigma-Aldrich, EUA) y se mezclaron los contenidos por inversión o al ponerlos en un vórtex durante 5 segundos. De las dos fases que se obtuvieron una vez que los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm se tomó la fase superior con ayuda de una micropipeta (Gilson, Francia) para transferir a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL. Este paso se repitió dos veces para eliminar la mayor cantidad de proteínas de los microorganismos, la cual se observa como una pequeña nata de color blanco en la interfase de las dos capas mencionadas previamente.

Una vez realizadas las dos extracciones, se agregó un volumen doble al presente en cada tubo de etanol frío al 99% (Sigma, EUA) para precipitar los ácidos nucleicos. Los tubos nuevamente se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm y se decantó el sobrenadante cuidando de no traerse la pastilla de ácidos nucleicos. Cada tubo se colocó en posición invertida por 12 horas, dejándolos abiertos para facilitar la evaporación de cualquier residuo de etanol.

Pasado este período de tiempo, la pastilla de ADN se lavó ahora con 200 μ L de etanol al 70% repitiéndose este proceso en dos ocasiones. Los tubos nuevamente se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos para posteriormente eliminar el remanente de etanol de lavado por decantación y dejándose nuevamente los tubos secar a temperatura ambiente por inversión sobre papel absorbente durante 12 horas. El ADN se reconstituyó en 100 μ L de búffer 1x Tris-EDTA (TE). La visualización del ADN se realizó por electroforesis horizontal como se describe a continuación.

3.10 Electroforesis Horizontal

Para la preparación del gel, en una balanza analítica (Mettler Toledo, EUA) se pesó 1 g de agarosa, la cual se homogeneizó con 100 mL de buffer Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0.5X en un vaso de precipitados de 250 mL calentándose hasta disolución en un horno de microondas (LG, México). A ésta disolución se agregaron 1 μ L de bromuro de etidio (EtBr) y la agarosa se dejó enfriar durante 10 minutos en una campana de extracción. Una vez transcurrido este tiempo se vertió en una cámara de electroforesis horizontal con peines de plástico de 20 pozos. Una vez polimerizado el gel (30-45 minutos) se retiraron los peines, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó amortiguador TBE 0.5X hasta cubrirlo completamente. El ADN (2 μ l) mezclado con búffer de carga (2 μ l) se depositó en el pozo correspondiente y el marcador molecular (1000 pares de bases; Bionline, EUA) se colocó en el pozo posterior a la última muestra. Los respectivos electrodos (+ y -) se conectaron a la cámara de electroforesis y a la fuente de

poder, ésta última programándose a 100 Voltios por un tiempo de 35 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, el ADN genómico se observó en un transiluminador (Probiotek, México). La imagen resultante se capturó con un fotodocumentador UVISAVE (Probiotek, México) y se guardó en una memoria CompactFlash de 256 MB (Kingston Technology, EUA) en formato TIFF. Las imágenes se transfirieron al disco duro de una computadora PC para visualizarse con el software Paint Shop Pro versión 8.1 (JASC Corp, EUA).

3.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez comprobada la presencia de ADN por el método de extracción, se realizó una PCR para amplificar exclusivamente una porción del gen del 16S rARN actinobacteriano con los oligos definidos por Stach *et al.* (2003), ACT-F (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3') y ACT-R (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3'). La siguiente mezcla de reacción (Tabla 5) fue la empleada para cada tubo de reacción.

Tabla 5. Concentración y cantidades de los reactivos de la mezcla de PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
Búffer (10X; Bioline, EUA)	5
MgCl ₂ (50 mM; Bioline, EUA)	1.5
dNTP's (10 mM; Bioline, EUA)	1.25
Act-F (Primer 1; 20 mM)	0.3
Act-R (Primer 2; 20 mM)	0.3
ADN	0.5
Taq polimerasa (Bioline, EUA)	0.1
H ₂ O	41.05
Total	50

El programa de amplificación para la PCR se llevó a cabo en un termociclador TC-512 (Techne, EUA) que consistió en 1 ciclo de 95°C por 10

minutos (desnaturalización inicial), seguido de 35 ciclos compuestos por 95°C por 1 minuto (desnaturalización), 60°C por 1 minuto (alineamiento) y 72°C por 1 minuto (extensión). El producto de PCR de cada muestra se examinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr como se mencionó anteriormente para la electroforesis del ADN pero sustituyendo el ADN por cada producto de PCR. El producto de PCR fue de aproximadamente 640 pb.

3.12 Secuenciamiento del producto de PCR

Al revisar cada producto de PCR, éstos se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd, Alemania) de acuerdo a las indicaciones e instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron analizados nuevamente en una electroforesis horizontal en gel de agarosa para confirmar la presencia del producto y estimar su concentración por comparación contra un marcador de peso molecular de concentración conocida. Esta electroforesis se realizó como se describió previamente para las electroforesis horizontales de ADN y productos de PCR en los incisos anteriores. Los productos purificados se conservaron a una temperatura de -20°C hasta llevarse al Instituto de Biología de la UNAM para su procesamiento de acuerdo a las indicaciones de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, responsable del laboratorio de Biología Molecular de dicho Instituto.

3.12.1 Comparación empleando GenBank y BLAST

Las secuencias obtenidas en el Instituto de Biología fueron enviadas en archivos de formato ZIP por correo electrónico los cuales al descomprimirse mostraban las secuencias resultantes en formato ABI. Los archivos en formato ABI se leyeron con el Software Chromas Lite Versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia) y el texto de la secuencias se exportó en formato de Texto al procesador de textos Word 2003 (Microsoft Corp, EUA). El texto correspondiente a cada una

de las secuencias obtenidas se copió dentro de la ventana de la opción BLAST del sitio GenBank.

3.13 Análisis y construcción del árbol filogenético

Las secuencias nucleotídicas obtenidas después del secuenciamiento se visualizaron con el programa Chromas el cual permite observar el cromatograma de la secuencia resultante (archivos de extensión “ABI”). La secuencia (en forma de archivo de texto) se exportó al programa Phydit el cual permite alinear con base a la estructura secundaria del gen ribosomal 16S rARN.

Cada secuencia fue colocada en el sitio NCBI-GenBank (National Center for Biotechnology Information, del inglés; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bajo la opción BLAST registrándose los resultados en forma de tabla.

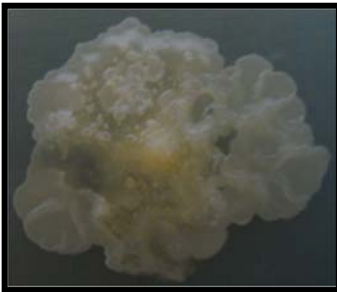
Para el alineamiento de las secuencias obtenidas se recuperaron los resultados del BLAST así como de representantes de la familia *Pseudonocardiaceae* a partir de la base de datos del NCBI. El árbol filogenético se construyó a partir del método del “vecino más cercano” (Neighbour-Joining, del inglés; Saitou y Nei, 1987) una vez realizado un alineamiento manual de las secuencias obtenidas y de aquellos representantes de la familia *Pseudonocardiaceae* con el programa PHYDIT. El árbol filogenético se construyó entonces con el software TREECON (Van de Peer y DeWachter, 1994).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización morfológica de las bacterias de estudio

En las imágenes mostradas en esta página se pueden observar las características macroscópicas de los aislados. Características generales de cada uno de los aislados se indican al lado de la imagen correspondiente.

Naica AE-2



Forma: Irregular
Bordes: Irregulares con protuberancias de 0.5 a 0.8 cm
Elevación: Plana
Textura: Butirosa
Color: Amarillo pálido a grisáceo por ambos lados de la caja de Petri.

Naica AE-12



Forma: Circular
Bordes: Irregulares de 1 a 2 mm de diámetro
Elevación: Rugosa
Textura: Seca
Color: Amarillo en la parte inferior de la caja Petri y ligeramente blanca en la parte superior.

Naica AE-7



Forma: Circular
Bordes: Semi-irregulares de 1 a 2 mm de diámetro
Elevación: Convexa
Textura: Seca
Color: Amarillo claro en la parte inferior y superior de la caja Petri.

Figura 12. Imágenes de los aislados de estudio crecidas a 37°C por 15 días.

Naica AE-4y-A



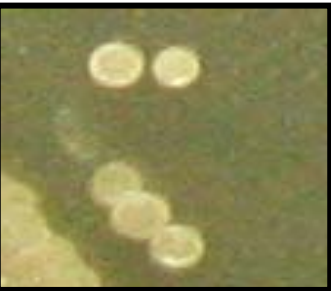
Forma: Irregular
Bordes: Irregulares con protuberancias de 0.5 a 1 cm de diámetro
Elevación: Plana
Textura: Butirosa
Color: Amarillo pálido tanto en la parte superior como en la inferior de la caja de Petri

Naica AE-11x



Forma: Irregular
Bordes: Irregulares de 0.8 a 1 cm de diámetro
Elevación: Convexa
Textura: Butirosa
Color: Amarillo claro por ambos lados de la caja de Petri.

Naica AE-4x



Forma: Puntiforme
Bordes: Enteros de 0.5 a 1 cm de diámetro.
Elevación: Plana
Textura: Viscosa
Color: Amarillo claro por ambos lados de la caja de Petri.

Naica AE-5



Forma: Irregular
Bordes: Irregulares 0.8 a 1 cm de diámetro
Elevación: Plana
Textura: Seca
Color: Amarillo pálido a grisáceo por ambos lados de la caja de Petri.

Figura 12. Continuación

4.2 Determinación de los isómeros del ácido diaminopimérico (DAP)

Las siete cepas de estudio presentaron una pared celular de tipo II, III o IV, caracterizada por la presencia de ácido diaminopimérico (DAP) en la forma *meso-A₂pm*. Lo anterior es una referencia para descartar aislados del género *Streptomyces*, los cuáles presentan la forma *LL-A₂pm* del DAP en la pared celular. Los resultados de la placa de TLC se muestran en la Figura 13.

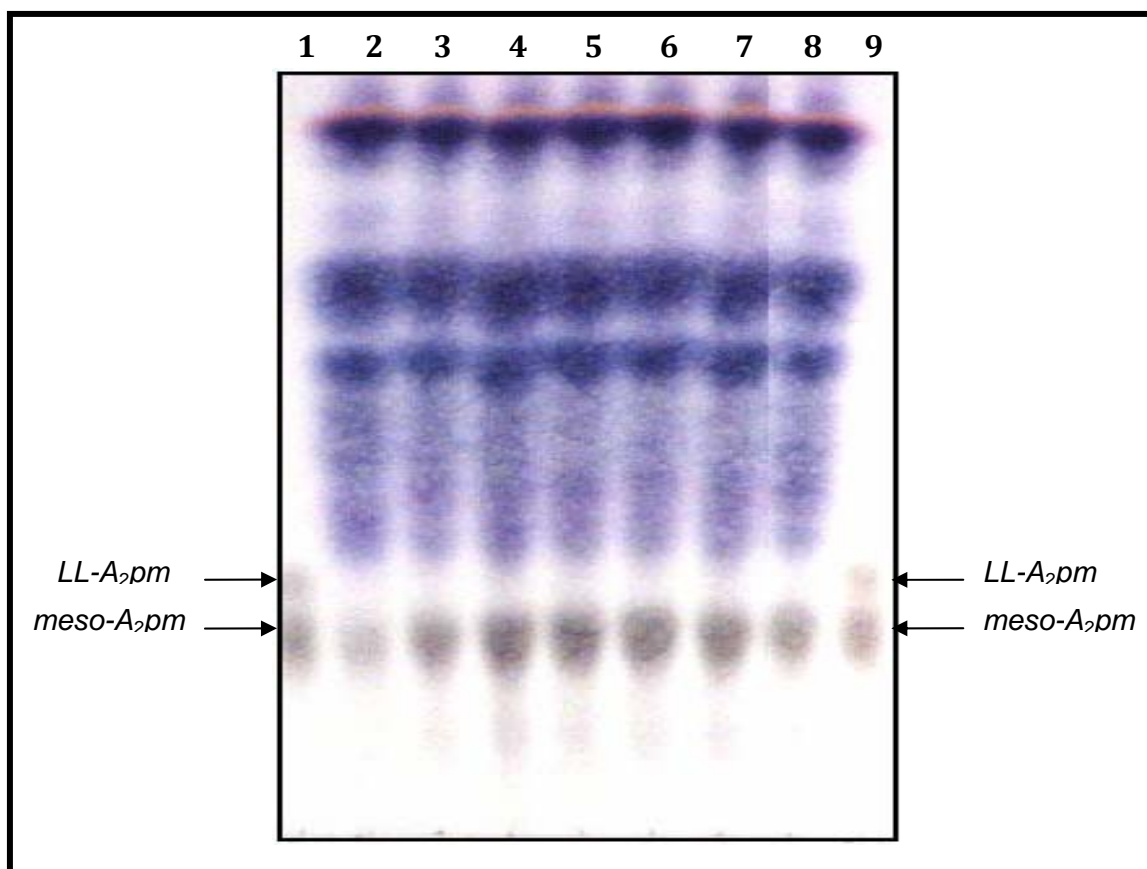


Figura 13. Isómeros del (DAP). Los carriles 1 y 9 corresponden al estándar con las dos formas del isómero DAP (indicados con flechas). Los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 pertenecen a las cepas aisladas de la Cueva de los Cristales, identificadas con las claves: Naica AE-12, Naica AE-7, Naica AE-11x, Naica AE-4-x, Naica AE-5, Naica AE-2 y Naica AE-4y-A, respectivamente.

4.3 Utilización de las fuentes de carbono

La capacidad de los siete aislados para utilizar las distintas fuentes de carbono se ejemplifica en la Figura 14.

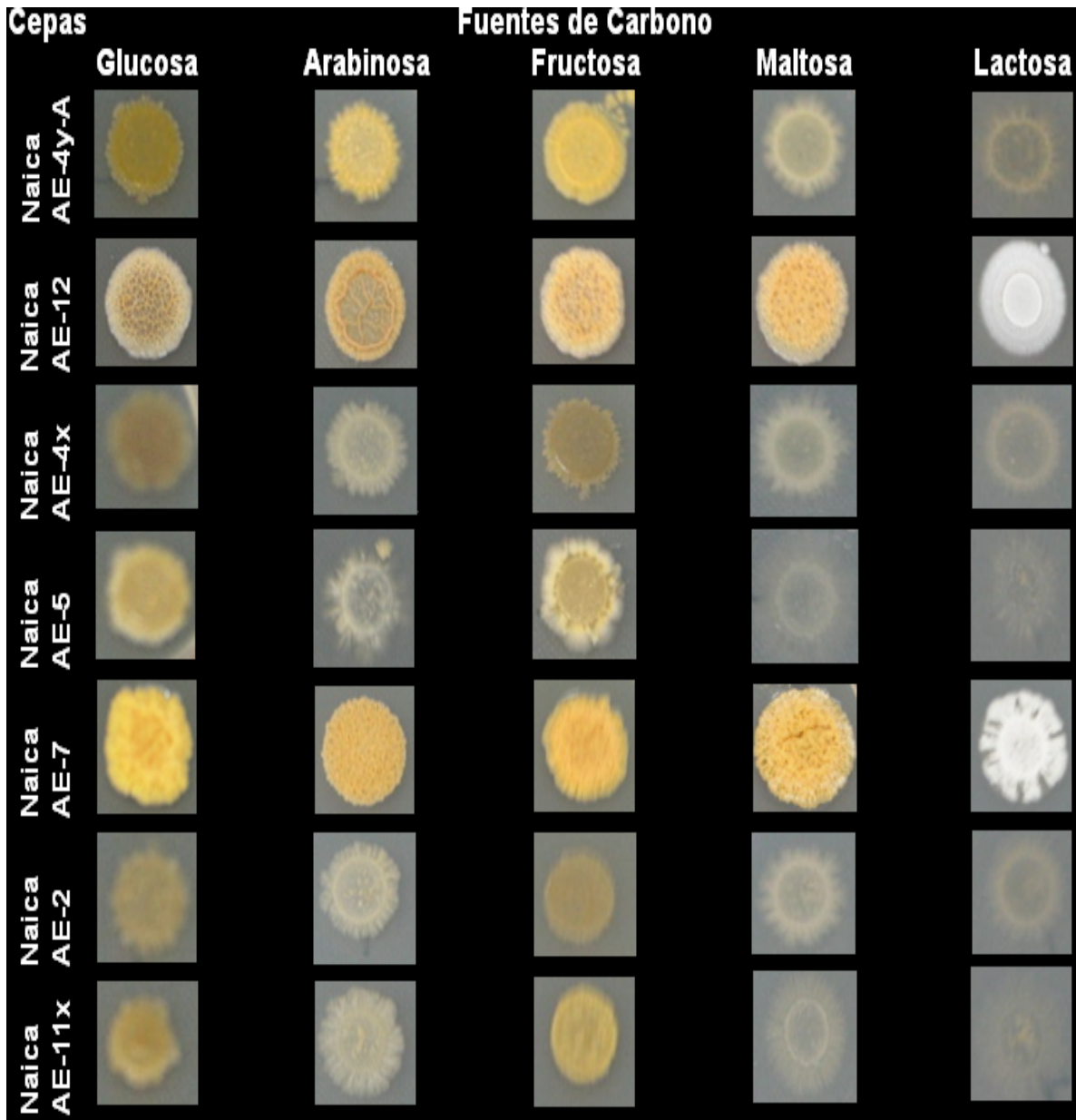


Figura 14. Medio ISP-9 con diferentes fuentes de carbono e imágenes de los aislados.

Las fuentes de carbono utilizadas por las cepas para su crecimiento y desarrollo fueron diversas como se indica en la Figura 14. Éstas incluyeron monosacáridos, disacáridos, alcoholes, y polioles. En cambio, no pudieron crecer

en presencia de trisacáridos, polisacáridos y ácido dicarboxílico. Con el empleo de un control positivo (glucosa) y un control negativo (agua), se determinaron las fuentes de carbono empleadas o no por los microorganismos del presente trabajo de investigación. Los resultados del empleo de las fuentes de carbono muestran algunas tendencias que se describen en la tabla 6.

Solamente una cepa, Naica AE-7, presentó un excelente crecimiento en la mayoría de las fuentes de carbono. Esto es, en presencia de adonitol, celobiosa, fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, inositol, maltosa, manosa, sorbitol, xilitol y xilosa.

En cuanto al rango considerado como un muy buen crecimiento, el comportamiento de las cepas fue el siguiente: Naica AE-12 en inositol, maltosa, manosa, xilitol y xilosa. La cepa Naica AE-7 solamente mostró buen crecimiento en presencia de manitol.

Una gran parte de las cepas aisladas se pudieron agrupar en el rango denominado como “buen crecimiento”. La capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono por parte de los aislados se menciona a continuación. En presencia de las fuentes de carbono adonitol, arabinosa, celobiosa, galactosa y glicerol; Naica AE-12. En fructosa, Naica AE-12 y Naica AE-5. En glucosa, Naica AE-12, Naica AE-5, Naica AE-2, Naica AE-11x, Naica AE-4yA y Naica AE-4x. En manitol Naica AE-12, Naica AE-5, Naica AE-2 y Naica AE-11x. En manosa, xilitol y xilosa Naica AE-2 y Naica AE-11x. En sorbitol Naica AE- 5, Naica AE-2, Naica AE-11x, Naica AE-4y-A y Naica AE-4x.

Las cepas Naica AE-4y-A y Naica AE-4x presentaron un pobre crecimiento en la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas.

Ninguna de las siete cepas aisladas empleadas en el presente trabajo de investigación pudieron crecer y desarrollarse en presencia de ácido malónico

(ácido dicarboxílico); lactosa, melibiosa y sucrosa (disacáridos); rafinosa (trisacárido); celulosa, dextrano y pectina (polisacáridos). Lo anterior es interesante pues indica que los aislados muestran dificultad en emplear fuentes de carbono con una estructura química de dos o más unidades de monosacáridos.

Es importante destacar que solamente unas cuantas fuentes de carbono permitieron observar diferencias con respecto al crecimiento, siendo heterogéneo y en algunos casos con la inhibición del crecimiento de colonias aisladas en el medio de cultivo. Las fuentes de carbono fueron adonitol, celobiosa, inositol y maltosa. Estas fuentes permiten observar posibles diferencias con respecto a las especies de los microorganismos estudiados.

Con base en lo anterior, los aislados se pudieron agrupar en dos subgrupos de microorganismos. En primera instancia, aquellos capaces de utilizar 10 fuentes de carbono y que son: arabinosa, fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, manitol, manosa, sorbitol, xilitol y xilosa. Los aislados de este grupo son Naica AE- 5, Naica AE- 4x, Naica AE- 2 y Naica AE- 11x. El segundo subgrupo, fue capaz de utilizar las mismas 10 fuentes de carbono además de adonitol, celobiosa, inositol y maltosa. Los aislados de esta segunda agrupación son Naica AE-7, Naica AE-12 y Naica AE-4y-A.

De esta forma, se observó que los microorganismos de la mina Naica aparentemente solo muestran la capacidad de utilizar monosacáridos, algunos disacáridos, polioles y alcoholes para su crecimiento y desarrollo.

Esta información resulta de gran utilidad para intentar desarrollar medios de cultivo específicos con fuentes de carbono que permitan el crecimiento, aislamiento e identificación selectiva de microorganismos pertenecientes a la clase *Actinobacteria* de este tipo de ecosistemas.

Tabla 6. Crecimiento de los microorganismos en las diferentes fuentes de carbono.

Cepas Carbono (Fuentes)	Naica AE-2	Naica AE-4x	Naica AE-4yA	Naica AE-5	Naica AE-7	Naica AE-11x	Naica AE-12
Ácido Malónico	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	++	-	+++++	-	+++
Arabinosa	+	+	++	+	+++	+	+++
Celobiosa	-	-	++	-	+++++	-	+++
Celulosa	-	-	-	-	-	-	-
Dextrano	-	-	-	-	-	-	-
Fructosa	++	++	++	+++	+++++	++	+++
Galactosa	++	++	++	++	+++++	++	+++
Glicerol	++	+	++	++	+++++	++	+++
Glucosa	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	+++
Inositol	-	-	+	-	+++++	-	++++
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	++	-	+++++	-	++++
Manitol	+++	++	++	+++	++++	+++	+++
Manosa	+++	++	++	++	+++++	+++	++++
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-
Pectina	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	++
Sucrosa	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	+++	++	++	++	+++++	+++	++++
Xilosa	+++	++	++	++	+++++	+++	++++

4.4 Utilización de fuentes de nitrógeno

De manera similar, se estableció la capacidad de los siete aislados para utilizar las distintas fuentes de nitrógeno que ahora se ejemplifican en la Figura 15.

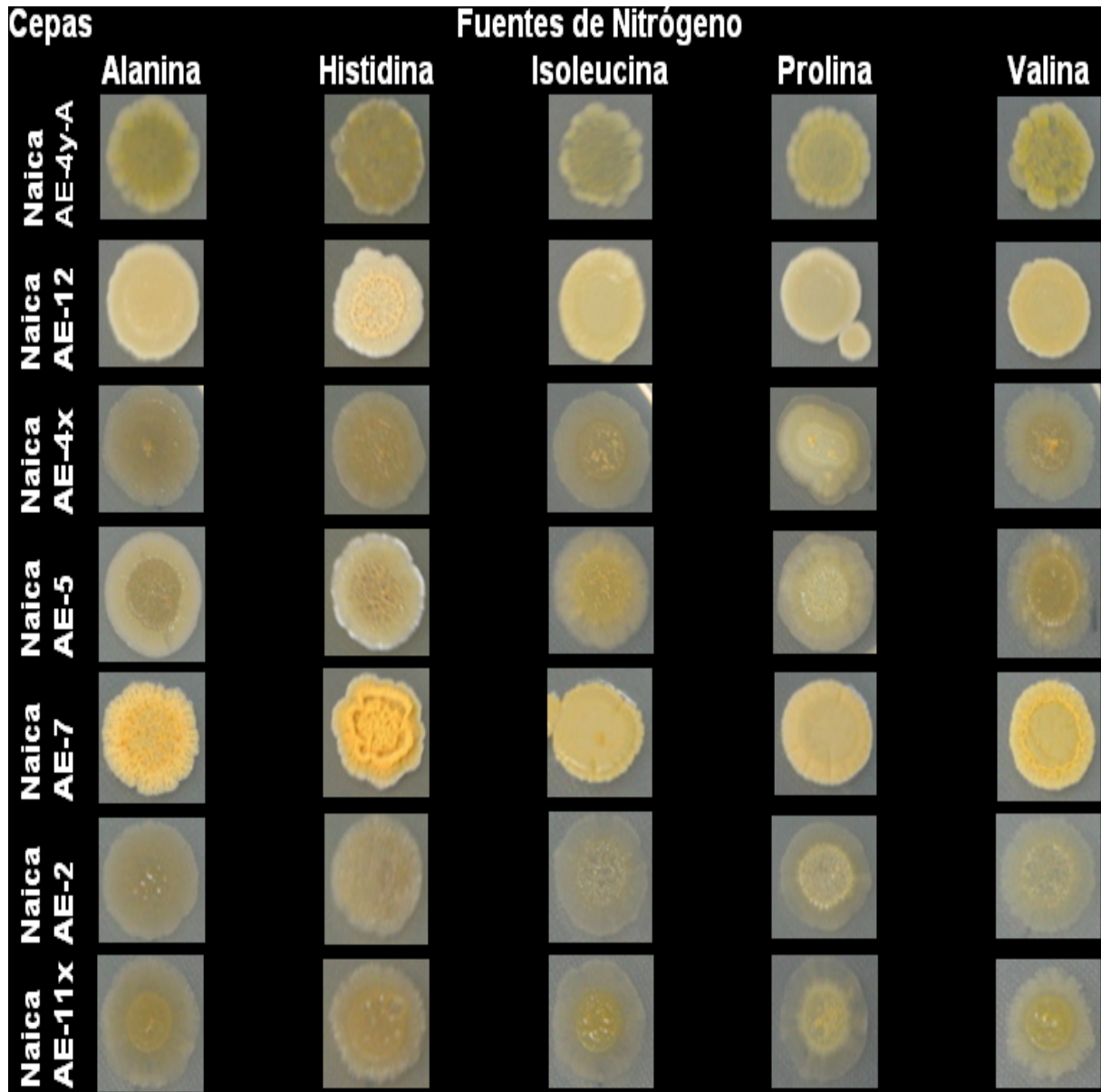


Figura 15. Medio basal con diferentes fuentes de nitrógeno e imágenes de los aislados.

Para este grupo de pruebas se emplearon como fuentes de nitrógeno 11 de los 20 aminoácidos esenciales para la formación de proteínas. Estos fueron L-ácido glutámico, L-ácido aspártico, L-alanina, L-arginina, L-fenilalanina,

L-histidina, L-isoleucina, L-prolina, L-serina, L-triptófano y L-valina. También se adicionaron otro par de fuentes; la adenina que corresponde a una base nitrogenada que forma parte de los ácidos nucleicos y la L-ornitina que es un aminoácido dibásico.

El crecimiento y desarrollo de los siete microorganismos aislados en presencia de las diferentes fuentes de nitrógeno fue homogéneo en comparación con los resultados observados en las fuentes de carbono (Tabla 6). Con el empleo de un control negativo (agua) se determinó la capacidad de utilizar las diversas fuentes de nitrógeno por parte de las cepas. Algunas de las tendencias observadas se describen en la tabla 7.

En presencia de los aminoácidos L-alanina e L-histidina, únicamente la cepa identificada como Naica AE-7 presentó un excelente crecimiento.

En el rango denominado como muy buen crecimiento se tuvieron tres cepas relacionadas en esta agrupación. Naica AE-12 en L-histidina; Naica AE-7 en L-serina, L-triptófano; Naica AE-5 y Naica AE-7 en L-valina.

La mayoría de las cepas se pudieron clasificar en el rango denominado como buen crecimiento. En presencia de L-adenina, los aislados Naica AE-12, Naica AE-4x, Naica AE-7 y Naica AE-5; en L-alanina Naica AE-12, Naica AE-4x, Naica AE-4y-A y Naica AE-5; en L-arginina Naica AE-12, Naica AE-4x, Naica AE-7, Naica AE-5; en L-fenilalanina Naica AE-12, Naica AE-7 y Naica AE-5; en L-histidina Naica AE-2, Naica AE-4x, Naica AE-11x y Naica AE-5; en L-isoleucina Naica AE-12, Naica AE-4x, Naica AE-4y-A, Naica AE-7 y Naica AE-5; en L-ornitina Naica AE-4x, Naica AE-7 y Naica AE-5; en L-prolina, L-serina, L-triptófano y finalmente en L-valina Naica AE-12, Naica AE-4x y Naica AE-4y-A.

Las siete cepas de estudio mostraron un crecimiento homogéneo en la utilización de las fuentes de nitrógeno. Las cepas Naica AE-2 y Naica AE-11x

presentan una tendencia similar, con respecto al pobre crecimiento de las colonias.

Ninguna de las siete cepas presentaron crecimiento y desarrollo de colonias en el medio de cultivo adicionado con los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico. Esto está en línea con el resultado obtenido con ácido malónico (fuentes de carbono) pues estos compuestos comparten un grupo funcional en común que aparentemente no puede ser empleado por los microorganismos de estudio.

Nuevamente, se forman dos subgrupos con respecto al empleo de las fuentes de nitrógeno que pueden emplear los microorganismos aislados de la mina Naica.

En resumen, los microorganismos aislados presentan una amplia capacidad para utilizar distintas fuentes de nitrógeno sin observarse una tendencia que permitiese su diferenciación o separación ya que ninguno de ellos logró emplear ni al ácido aspártico ni al ácido glutámico. Todos los aislados lograron emplear de manera homogénea (crecimiento similar) las fuentes de nitrógeno evaluadas.

Tabla 7. Crecimiento de los microorganismos en las diferentes fuentes de nitrógeno.

Cepas Nitrógeno (Fuentes)	Naica AE-2	Naica AE-4x	Naica AE-4yA	Naica AE-5	Naica AE-7	Naica AE-11x	Naica AE-12
Ácido Aspártico	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Glutámico	-	-	-	-	-	-	-
Adenina	++	+++	+	+++	+++	++	+++
Alanina	++	+++	+++	+++	+++++	++	+++
Arginina	++	+++	+	+++	+++	++	+++
Fenilalanina	++	++	++	+++	+++	++	+++
Histidina	+++	+++	++	+++	+++++	+++	++++
Isoleucina	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Ornitina	++	+++	++	+++	+++	++	++
Prolina	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Serina	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	+++
Triptófano	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	+++
Valina	++	+++	+++	++++	+++++	++	+++

4.5 Tolerancia a concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

La capacidad de los siete aislados para tolerar distintas concentraciones de NaCl se evaluó de acuerdo a lo indicado en los Materiales y Métodos. Una imagen del comportamiento observado para la tolerancia de los aislados se muestra en la Figura 16.

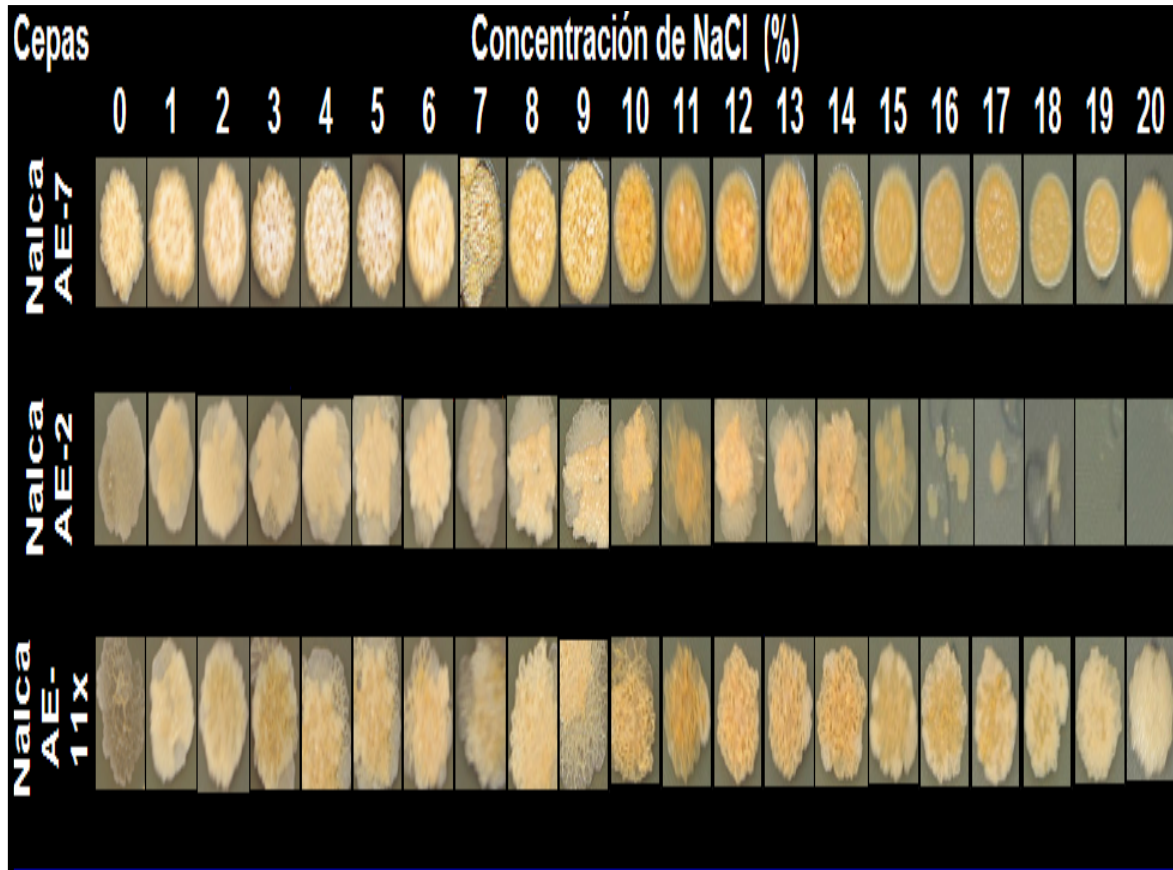


Figura 16. Medio GYEA con diferentes concentraciones de NaCl e imágenes de tres de los siete aislados.

En general, se observó que las cepas presentan un crecimiento óptimo entre las concentraciones de 0 a 9% de NaCl (Tabla 8). Sin embargo, el aislado Naica AE-12 mostró un excelente crecimiento hasta una concentración de 4%, al igual que la cepa Naica AE-7 pero hasta una concentración de 5% de sal.

Entre las concentraciones 10 y 13% de NaCl aún se logró observar un buen crecimiento de los microorganismos, pero se nota gradualmente una disminución

conforme se incrementa la concentración de sal en el medio de cultivo GYEA. De las siete cepas aisladas, únicamente Naica AE-2 dejó de mostrar crecimiento al alcanzar el 19% de NaCl.

En general, se observó que las cepas pueden tolerar altas concentraciones de NaCl (hasta 20%).

El efecto en el aumento de la concentración de NaCl en el crecimiento y desarrollo de las cepas es evidente, viéndose notablemente disminuidas en el tamaño y morfología de las colonias aisladas. Lo anterior sugiere una tolerancia a la salinidad por parte de los microorganismos lo que les permite adaptarse a condiciones microambientales específicas en el interior de la cueva.

Tabla 8. Crecimiento de los microorganismos a diferentes concentraciones de NaCl.

Cepas NaCl (%)	Naica AE-2	Naica AE-4x	Naica AE-4yA	Naica AE-5	Naica AE-7	Naica AE-11x	Naica AE-12
0	+++	+++	++++	+++	+++++	+++	+++++
1	+++	+++	++++	+++	+++++	+++	+++++
2	+++	+++	++++	+++	+++++	+++	+++++
3	+++	+++	++++	+++	+++++	+++	+++++
4	+++	+++	++++	+++	+++++	+++	+++++
5	+++	+++	+++	+++	+++++	+++	++++
6	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++++
7	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++++
8	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
13	+++	+++	++	++	+++	++	+++
14	++	++	++	++	++	++	+++
15	++	++	++	+	++	++	++
16	+	+	+	+	++	++	++
17	+	+	+	+	++	++	++
18	+	+	+	+	++	++	++
19	-	+	+	+	++	++	++
20	-	+	+	+	++	++	++

4.6 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados

La capacidad de los siete aislados para tolerar un medio de crecimiento ajustado a diferentes valores de pH se muestra en la Figura 17.

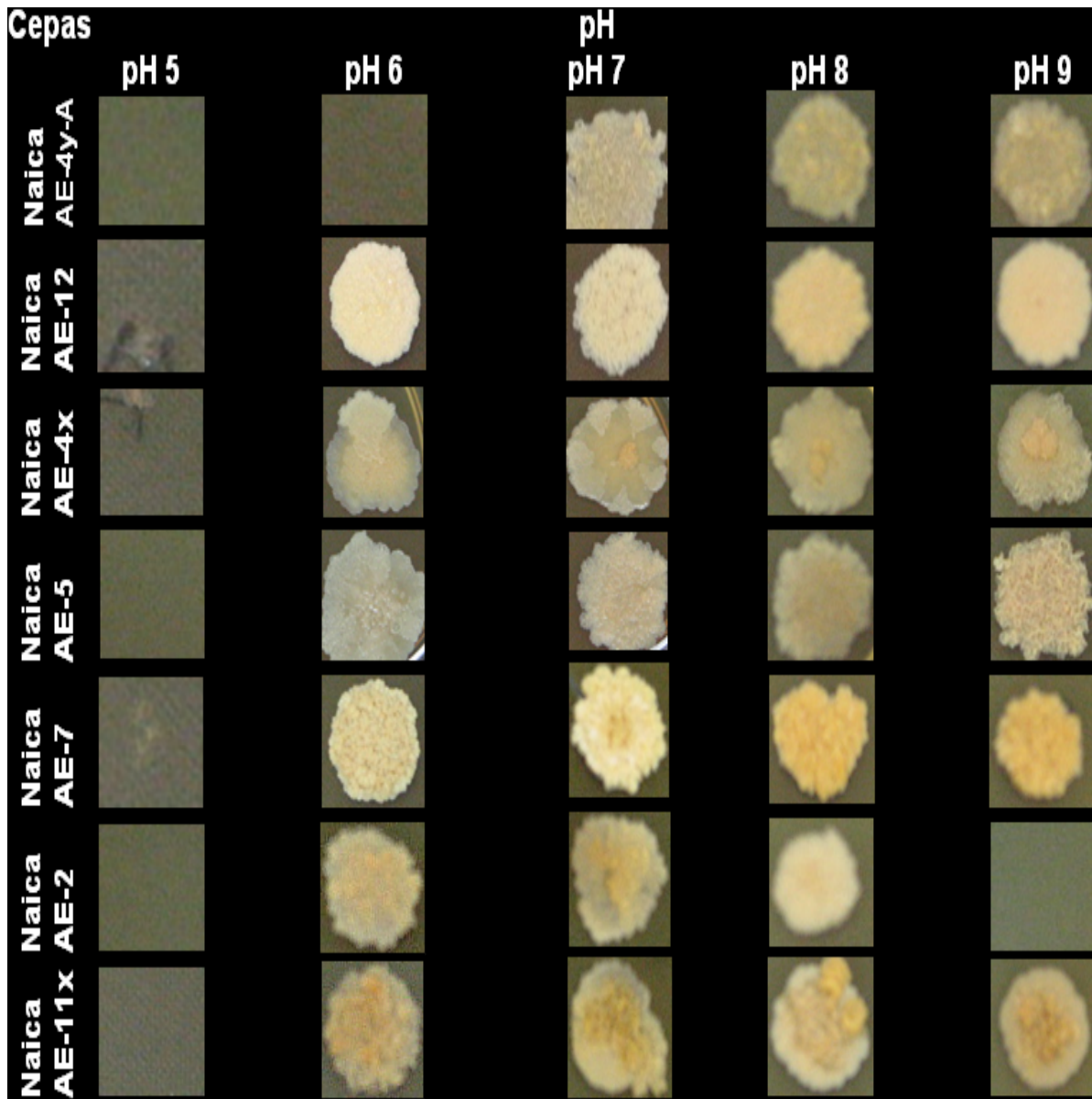


Figura 17. Medio GYEA ajustado a diferentes valores de pH e imágenes de los aislados.

De acuerdo con lo observado para el crecimiento de los microorganismos, las condiciones ácidas en el medio de cultivo GYEA (pH = 5) no favorecieron el crecimiento y/o desarrollo de ninguna de las cepas aisladas.

Sin embargo con el aumento en los valores de pH, se observó un cambio significativo al obtener un comportamiento homogéneo en el crecimiento y desarrollo de los aislados para todos los microorganismos de estudio. Al alcanzar un valor de pH de 9, la cepa Naica AE-4y-A ya no presentó crecimiento (Figura 17 y Tabla 9).

A partir de pH 7, se observó el crecimiento de todas las cepas, en donde Naica AE-12 y Naica AE-7 presentaron un crecimiento excelente, el resto de las cepas se pudieron catalogar en el rango denominado como muy buen crecimiento. Con respecto a un valor de pH de 8, la tendencia se conserva pues únicamente la cepa identificada como Naica AE-7 mantuvo un excelente crecimiento y las seis cepas restantes mostraron muy buen desarrollo.

A un valor de pH de 9, la condición alcalina presente en el medio de cultivo GYEA afectó el crecimiento de los aislados lo que se reflejó en una disminución. Únicamente la cepa Naica AE-2 no soportó dichas condiciones y dejó de mostrar crecimiento alguno.

Las condiciones fisicoquímicas dentro de la Cueva de los Cristales que permite el desarrollo de macro-cristales de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) seguramente ofrece condiciones alcalinas al ecosistema lo que se refleja en la tolerancia observada por los aislados a crecer en valores de pH de este tipo.

Las cepas de estudio crecen en valores de pH entre 6 y 9, con un óptimo crecimiento entre 7 y 8, por lo tanto se les podría considerar como cepas neutrófilas.

Tabla 9. Crecimiento de los microorganismos a diferentes valores de pH.

Cepas pH	Naica AE-2	Naica AE-4x	Naica AE-4yA	Naica AE-5	Naica AE-7	Naica AE-11x	Naica AE-12
pH 5	-	-	-	-	-	-	-
pH 6	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
pH 7	++++	++++	++++	++++	+++++	++++	+++++
pH 8	++++	++++	++++	++++	+++++	++++	++++
pH 9	-	+++	+++	+++	++++	+++	+++

4.7 Sensibilidad a diferentes antibióticos

La capacidad de los aislados para tolerar diferentes concentraciones de un rango variado de antibióticos se indica en la Figura 18.

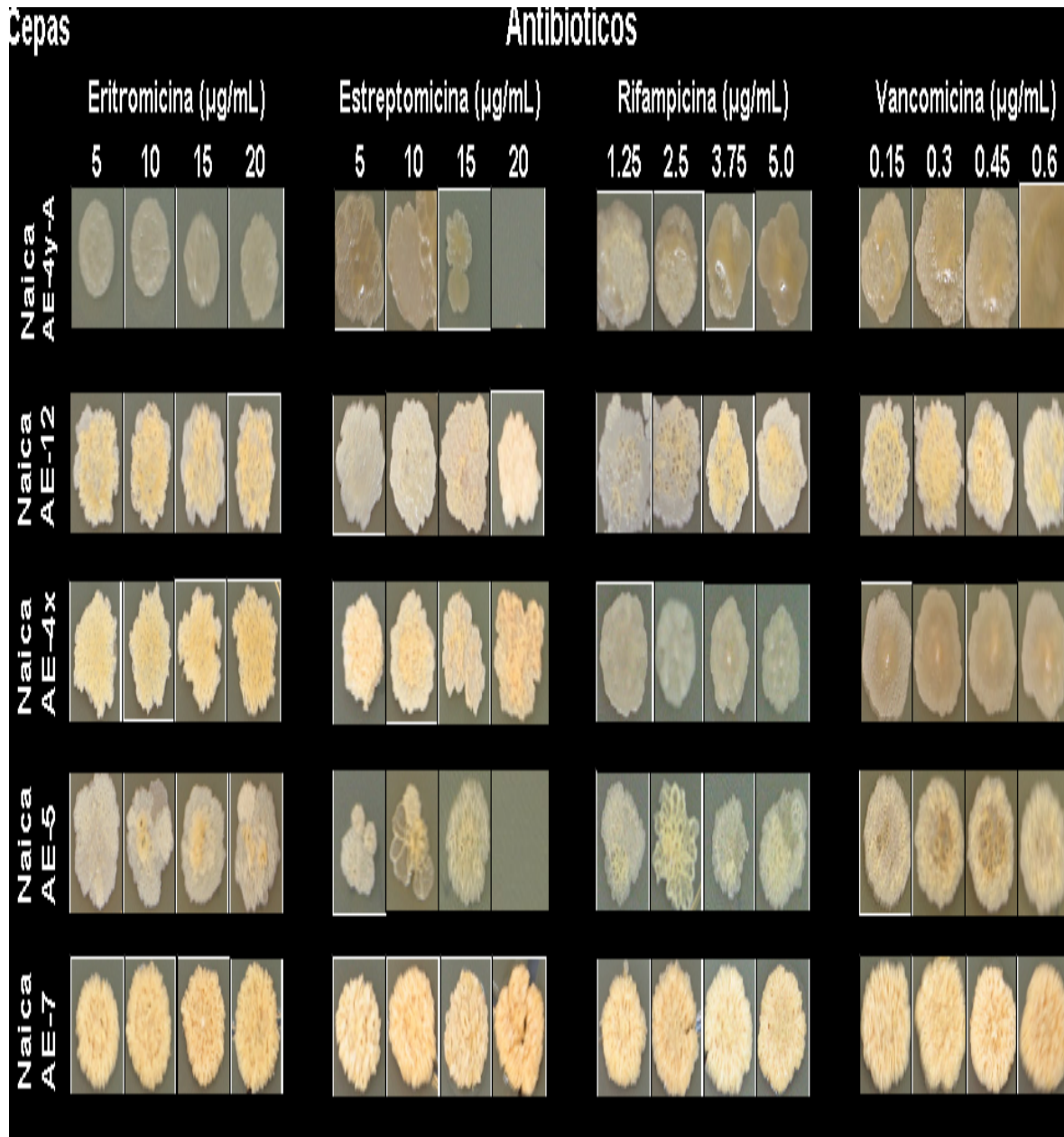


Figura 18. Medio GYEA con diferentes antibióticos e imágenes de los aislados.

De acuerdo a la figura 18 y tabla 10 resultó claro que las siete cepas lograron tolerar un amplio rango de antibióticos a las concentraciones evaluadas

para este grupo de pruebas. Tal fue el caso para ácido nalidíxico (quinolona), clortetraciclina (tetraciclina), eritromicina (macrólido), penicilina G (β -lactámico), en los cuales se tuvo una tendencia homogénea al presentar un buen crecimiento de colonias aisladas en los medios que contenían dichos antibióticos.

En el caso de rifampicina (ansamicina) y vancomicina (glucopéptido), también se presentó crecimiento de los siete microorganismos de estudio en las cuatro concentraciones utilizadas pero los aislados crecieron pobremente con la excepción de la cepa Naica AE-7 que mostró un excelente crecimiento.

Todos los microorganismos del estudio resultaron sensibles a los antibióticos kanamicina y neomicina (aminoglucósidos) en sus cuatro diferentes concentraciones.

Para el antibiótico demeclociclina (tetraciclina), cinco de las cepas resultaron sensibles a tres concentraciones, tolerando únicamente dos concentraciones (8 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) las cepas Naica AE-11x y Naica AE-5 pero con pobre crecimiento.

El antibiótico estreptomina (aminoglucósido) mostró la mayor sensibilidad para las muestras de microorganismos, al inhibir el crecimiento de un par de cepas, Naica AE-2 y Naica AE-11x, en sus cuatro diferentes concentraciones. Al igual que las cepas Naica AE-4y-A y Naica AE-5 en dos y una concentración, respectivamente, no se presentó crecimiento.

En general, las siete cepas resultaron sensibles a cuatro de los 10 antibióticos usados, demeclociclina, kanamicina, neomicina y estreptomina en diferentes concentraciones. Estos antibióticos están clasificados como aminoglucósidos, ejerciendo su modo de acción por inhibición de la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma en la subunidad 30S.

Tabla 10. Crecimiento de los microorganismos en diferentes antibióticos y respectivas concentraciones.

Antibióticos	Concentraciones (µg/mL)		Naica AE-2		Naica AE-4x		Naica AE-4yA		Naica AE-5		Naica AE-7		Naica AE-11x		Naica AE-12	
Ácido Nalidíxico	8	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++	+++
	32	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++	+++
Clortetraciclina	8	16	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++	+++
	32	48	+++	++	+++	++	++	++	+++	++	+++++	+++++	+++	++	+++	+++
Demeclociclina	8	16	++	-	++	-	++	-	++	+	++	-	++	+	++	-
	32	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	5	10	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++	+++
	15	20	++	++	+++	+++	++	++	+++	+	+++++	+++++	++	++	+++	++
Estreptomina	5	10	-	-	++++	+++	+++	++	++	+	+++++	++++	-	-	++++	+++
	15	20	-	-	++	++	-	-	+	-	++++	+++	-	-	+++	++
Kanamicina	5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomicina	4	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina G	5	10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++	++
	15	20	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++++	+++++	+++	+++	++	++
Rifampicina	1.25	2.5	++	++	++	++	++	++	++	++	+++++	+++++	++	++	+++	++
	3.75	5.0	+	+	++	+	++	+	+	+	+++++	+++++	++	+	++	+
Vancomicina	0.15	0.30	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+++++	+++++	+++	+++	+++	++
	0.45	0.60	++	++	++	++	++	++	++	++	+++++	+++++	+++	+++	++	++

4.8 Degradación de sustratos

Las pruebas de degradación de los sustratos evaluados se realizaron adicionando el medio GYEA con cada uno de los compuestos de este grupo de pruebas. Los resultados para este último grupo de pruebas solamente se registraron como degradación positiva (+) o degradación negativa (-) y se ejemplifican en la Figura 19 para el aislado Naica AE-7 y Tabla 11 para todos los aislados.

Solamente un par de cepas pudieron degradar tres de los ocho sustratos empleados para este grupo de pruebas y fueron hipoxantina y tirosina, ambos por la cepa Naica AE-7. Esta cepa, al igual que Naica AE-12 también degradaron elastina. Lo anterior se observó por un halo de degradación en el medio de cultivo alrededor de las colonias aisladas como se ejemplifica en la Figura 19.

Los siete microorganismos mostraron buen crecimiento en el medio GYEA a pesar de la presencia del compuesto de degradación por evaluar pero no mostraron la capacidad de degradarlos.

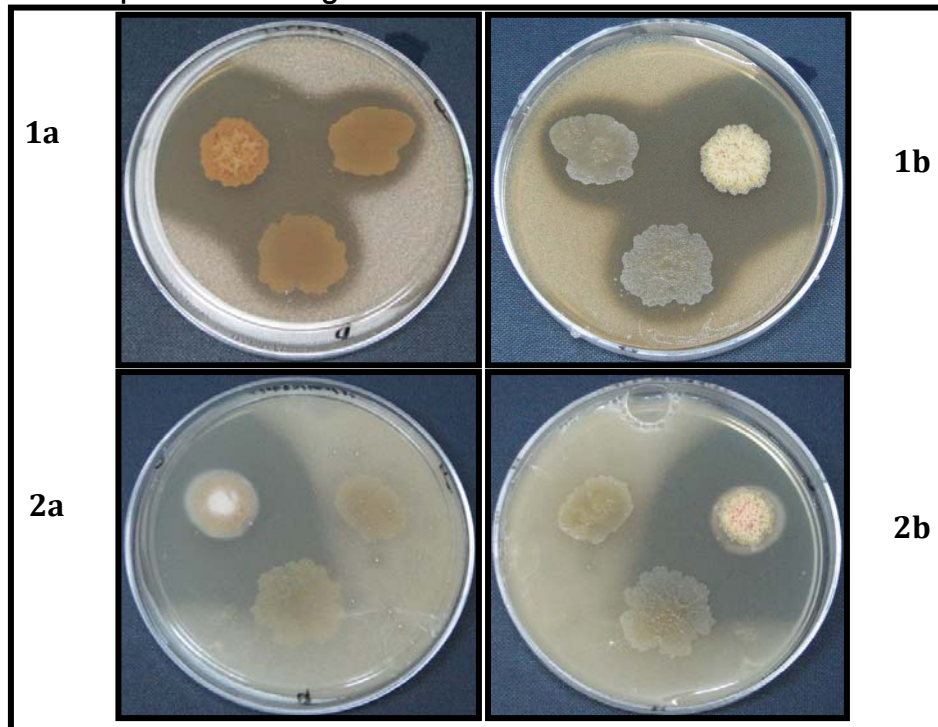


Figura 19. Medio GYEA con Tirosina (1) e Hipoxantina (2) para la cepa Naica AE-7. (Anverso y reverso de la caja Petri [a] y [b], respectivamente).

Tabla 11. Resultados de la degradación de sustratos.

Cepas Degradación (compuestos)	Naica AE-2	Naica AE-4x	Naica AE-4yA	Naica AE-5	Naica AE-7	Naica AE-11x	Naica AE-12
Adenina	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	-	-
Elastina	-	-	-	-	+	-	+
Guanina	-	-	-	-	-	-	-
Hipoxantina	-	-	-	-	+	-	-
Tirosina	-	-	-	-	+	-	-
Xantina	-	-	-	-	-	-	-

4.9 Estudio molecular y construcción del árbol filogenético

El ADN de los aislados se extrajo con éxito con la metodología descrita en la sección previa. La electroforesis horizontal se observa en la Figura 20 mientras que el producto de PCR empleando oligonucleótidos específicos para la clase *Actinobacteria* se muestra en la Figura 21.

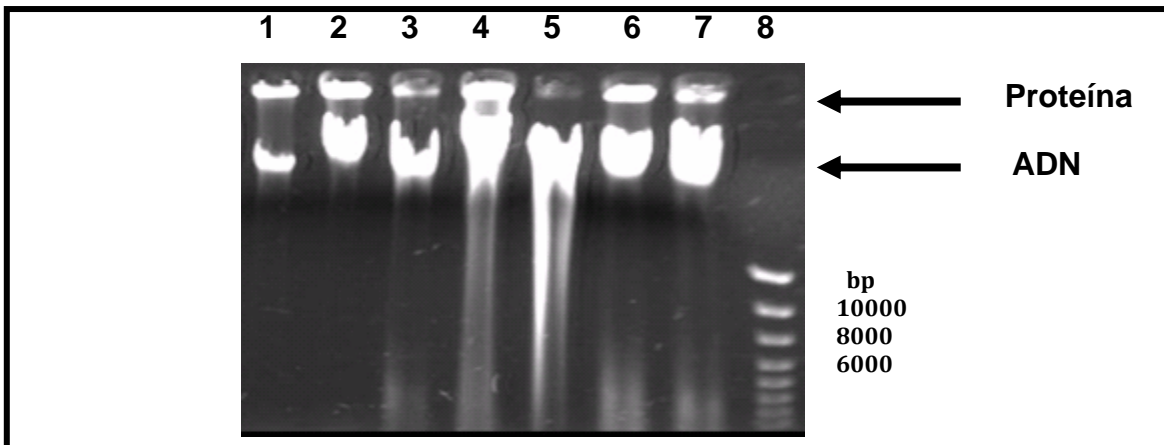


Figura 20. ADN extraído de los microorganismos de estudio en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 a 7: Naica AE-2, Naica AE-4x, Naica AE-4y-A, Naica AE-5, Naica AE-7, Naica AE-11x y Naica AE-12. Carril 8: Marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

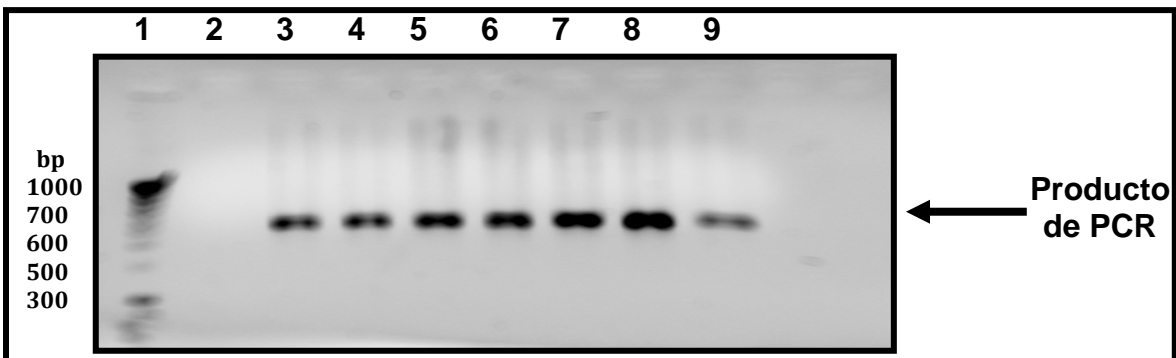


Figura 21. Producto de PCR (aprox. 650 bp) en gel de agarosa al 1%. Carriles 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Control negativo; carriles 3 al 9: Naica AE-2, Naica AE-4x, Naica AE-4y-A, Naica AE-5, Naica AE-7, Naica AE-11x y Naica AE-12.

El fragmento de secuencia obtenida para cada uno de los aislados se comparó con aquellas secuencias de la base de datos del NCBI opción BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El resultado de esta comparación indica que los aislados están asociados a un género recientemente propuesto "*Prauseroides*" (*Pseudonocardiaceae* bacterium) y *Prauserella* (Tabla 12; Anexo 8.3).

Tabla 12. Resultados del BLAST para cada una de las secuencias de los aislados.

Código del microorganismo	Número de bases empleadas en BLAST	Resultado del BLAST (código GenBank de la secuencia mas cercana)
Naica AE-2	645 bp	<i>Pseudonocardiaceae</i> bacterium NH3 (FJ598086.1)
Naica AE-4x	645 bp	<i>Pseudonocardiaceae</i> bacterium NH3 (FJ598086.1)
Naica AE-4y-A	629 bp	<i>Pseudonocardiaceae</i> bacterium NH3 (FJ598086.1)
Naica AE-5	645 bp	<i>Pseudonocardiaceae</i> bacterium NH3 (FJ598086.1)
Naica AE-7	645 bp	<i>Prauserella</i> sp. 05-Be-005 (FM956091.1)
Naica AE-11x	645 bp	<i>Pseudonocardiaceae</i> bacterium NH3 (FJ598086.1)
Naica AE-12	627 bp	<i>Prauserella</i> sp. 05-Be-005 (FM956091.1)

Las secuencias de cada uno de los aislados así como aquellos resultados del BLAST (Anexos) se utilizaron para hacer un alineamiento manual en el programa PHYDIT que permite el manejo de las secuencias como si se tratara de

archivos de texto. Una vez que las secuencias fueron manualmente alineadas se procedió a construir el árbol filogenético en el programa TREECON (Van de Peer y DeWachter, 1994) empleando el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987; Figura 22). En el árbol resultante se observa la formación de sus subgrupos con la secuencia del gen del 16S rARN de "*Prauseroides maris*" justo en medio, separando a los siete aislados de la Cueva de los Cristales (Figura 22).

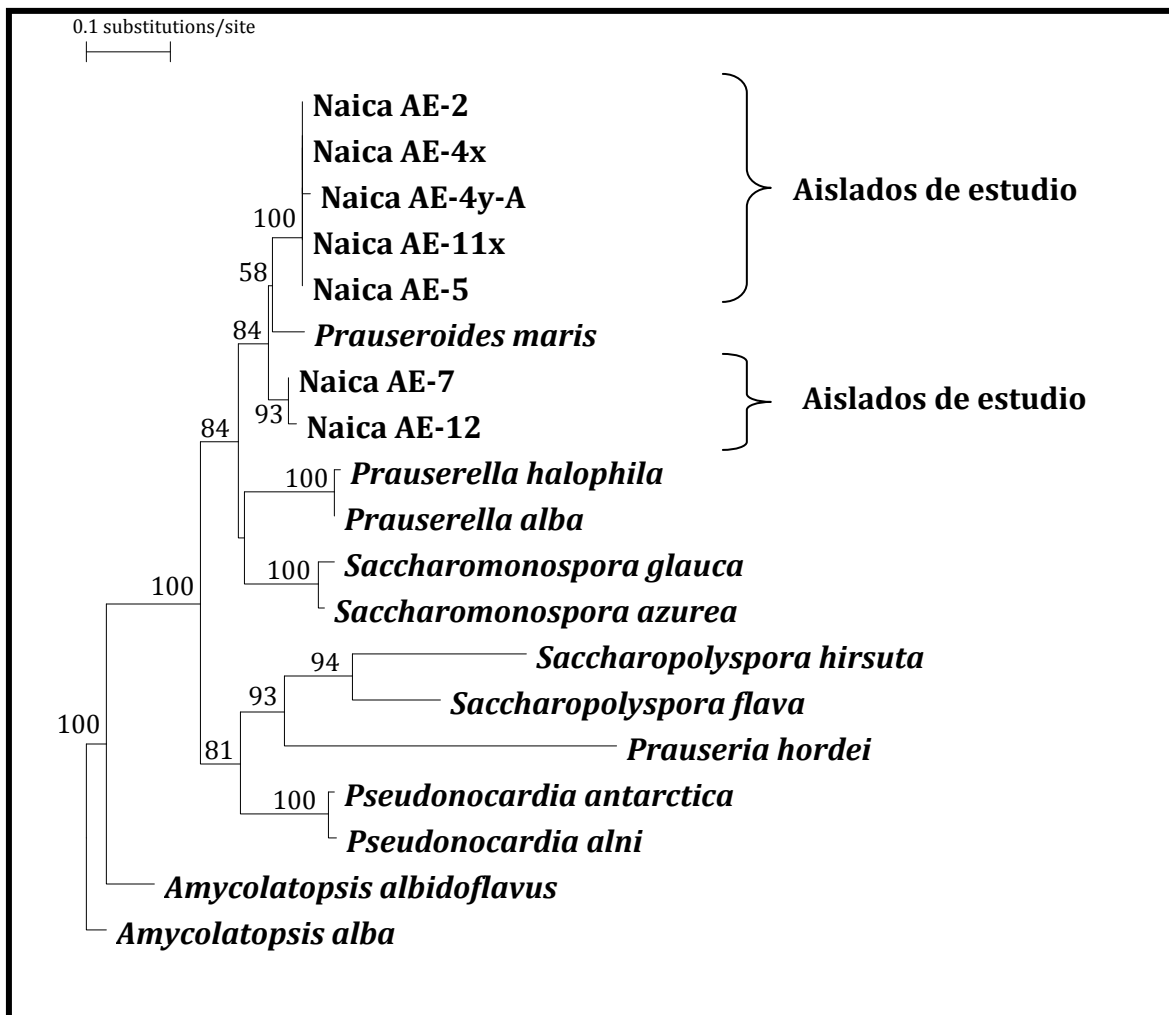


Figura 22. Árbol filogenético empleando el método del "vecino más cercano" (Saitou y Nei, 1987). Se emplearon las secuencias más cercanas de acuerdo al resultado del BLAST, es decir, secuencias de los géneros (en orden alfabético) *Amycolatopsis*, *Prauserella*, *Prauseria*, *Prauseroides*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora* y *Saccharopolyspora*.

5. CONCLUSIONES

- El presente trabajo de investigación representa el primer estudio en México enfocado a la comparación feno-genotípica de microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de la Cueva de los Cristales (mina Naica, Chihuahua).
- Los aislados forman parte de un género recientemente propuesto denominado "*Prauseroides*" asociado a la familia *Pseudonocardiaceae*. Por existir escasas referencias acerca de este género, no es posible establecer las posibles relaciones en ambientes extremos y/o cuevas.
- De las pruebas fenotípicas evaluadas, las que proporcionaron mayor nivel de discriminación comparando con el secuenciamiento parcial del gen del 16S rARN para la separación de los dos grupos encontrados, son las fuentes de carbono, con excepción de los resultados encontrados para un aislado.
- La utilización de las fuentes de carbono por parte de los microorganismos está orientada hacia monosacáridos, disacáridos, polioles y algunos alcoholes.
- No existió una tendencia o preferencia de los microorganismos por emplear alguna fuente de nitrógeno específica para su crecimiento excepto por la ausencia de desarrollo en aminoácidos ácidos como lo fueron el ácido aspártico y el ácido glutámico.
- El crecimiento de las cepas está entre los valores de pH 6 a 9 con un óptimo crecimiento a valores de pH entre 7 y 8 (ligeramente alcalinos y que concuerda con las características de la cueva).
- Únicamente dos cepas presentaron degradación de los sustratos hipoxantina, tirosina y elastina lo que concuerda con las características oligotróficas del ecosistema de donde fueron aislados.

6. RECOMENDACIONES

- Las cuevas nacionales han sido pobremente estudiadas en términos de su microdiversidad. Son necesarios estudios más extensos para establecer si los aislados del presente estudio están presentes exclusivamente en este ecosistema o si se encuentran nacional o mundialmente distribuidos en ecosistemas de características similares.
- Es necesario establecer el tipo de interacciones que se presentan entre los dos grupos microbianos que se recuperaron de la cueva de los cristales. Posiblemente los microorganismos ahí presentes tienen un papel importante en la conservación y mantenimiento de las características microambientales de la cueva además de ejercer un papel en los procesos biogeoquímicos en cuanto al desarrollo de los cristales y yacimientos de la mina.
- Resulta notorio que solamente se hayan formado dos subgrupos a partir de los siete aislados de estudio pues las características macroscópicas sugerían una mayor diversidad. Sin embargo, existen casos donde la información que el gen del 16S rARN proporciona para algunos géneros de la clase *Actinobacteria* no otorgan un nivel adecuado de discriminación. Primeramente, habría que determinar la secuencia completa del gen del 16S rARN para los siete aislados (aprox. 1,500 bp) y posteriormente realizar estudios donde se evalúen diferentes regiones del genoma (genes conservados) que permitan confirmar si la agrupación de los dos subgrupos se sigue conservando o si existe una mayor diversidad microbiana dentro de los siete aislados del presente trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Albertano, P. y Urzì, C. 1999. Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganism in Roman hypogea. *Microbial Ecology* 38:244-252.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª edición. Ediciones Omega. 3-1462 pp.
3. Badino, G., Forti, P., Giulivo, I., Piccini, L. y Rossi, A. Proyecto NAICA / Cueva de los Cristales (accesado agosto 2009; <http://www.naica.com.mx/>).
4. Ball, A.S., Betts, W.B. y McCarthy, A.J. 1989. Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 55:1642-1644.
5. Barton, H.A. y Jurado, V. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe* 2:132-138.
6. Bull, A.T., Ward, C.A., y Goodfellow, M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:573-606.
7. Cano, S.Z. y Martínez, S.J. 2000. *Las cuevas y sus habitantes*, Fondo de Cultura Económica, México D.F., 165 pp.
8. Demangel, C., Garnier, T., Rosenkrands, I., y Cole, S.T. 2005. Differential Effects of Prior Exposure to Environmental Mycobacteria on Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a Recombinant BCG Strain Expressing RD1 Antigens. *American Society for Microbiology*. 73:2190–2196.
9. Embley, T.M. 1992. The family *Pseudonocardia*ceae. In *The Prokaryotes*, pp. 996-1027. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. y Schleifer H. (eds). Springer-Verlag, New York, EUA.
10. Espinasa, R. 1994. Origen y distribución de las cavernas de México. *Ciencias* 36:45-49.

11. García-Ruiz, J.M., Villasuso, R., Ayora, C., Canals, A. y Otálora, F. 2007. Formación de megacristales naturales de yeso en Naica, México, Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, Tomo LIX, Numero 1, 63-70 pp.
12. Gillieson, D. 1996. Caves, processes, development, and management. Blackwell Publishers, Oxford, UK., 324 pp.
13. Gontang, E.A., Fenical, W. y Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3272-3282.
14. Goodfellow, M. y Maldonado, L.A. 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. In *The Prokaryotes*, vol 3. Archaea, Bacteria, Firmicutes, Actinomycetes. Editado por Dworkin F., Falkow S., Schleifer K.H. y Stackebrandt E. Springer Nueva York 3, 843-888.
15. Gordon, R.E. y Mihm, M.J. 1962. Identification of *Nocardia caviae* (Erikson) nov. comb. *Annals of the New York Academy of Sciences* 98:628-636.
16. Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P. y Sainz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods* 36:115-122.
17. Groth, I. y Saiz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal* 16:1-8.
18. Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C. y Saiz-Jimenez, C. 2001. Geomicrobiological study of the grotto dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal* 18:241-258.
19. Hardin, S.H. 2001. DNA sequencing. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, EUA.
20. Hopwood, D. 2007. An Introduction to the *Actinobacteria*. *Microbiology today* 60-62.
21. Hunter-Cevera, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* 1:278-285.

22. Jiang, Y., Wiese, J., Tang, S.K., Xu, L.H., Imhoff, J.F. y Jiang, C.L. 2008. *Actinomycetospira chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:408–413.
23. Kim, Y., Flynn, T.R., Donoff, R.B., Wong, D.T. y Todd, R. 2002. The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 60:808-815.
24. Labeda, D.P. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology. Journal of Industrial Microbiology* 28:115–121.
25. Lazcano, S.C. 2001. Naica's Subterranean Marvels. *National Speleological Society News* 59:166-169.
26. Leonila, L., Groth, I., Schumann, P., Zezza, F., Felske, A., Hermosin, B. y Saiz-Jimenez, C. 2000. Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Basidisco, Italy. *International Microbiology* 3:25-30.
27. Logan, N.A. 1994. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 272 pp.
28. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2006. Brock, *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Pearson-Prentice Hall. 1011 pp.
29. Maldonado, L.A. 2009. Manual de "Biología Molecular y Bioinformática en Microorganismos Marinos". Proyecto DGAPA-PAPIME PE206207.
30. Maldonado, L.A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J. y Quintana, E.T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:111-120.
31. Maldonado, L.A., Stach, J.E., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. y Goodfellow, M. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:11-18.
32. Marín, H.B.R., Vogel, G.F. y Echegoyén, G.R. 2006. Las megaselenitas del distrito de Naica, Chihuahua, ocurrencia mineralogical anómala. *Boletín de Mineralogía* 139-148.

33. Metzker, M.L. y Caskey, T.C. 2001. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, Ltd. 1-9 pp.
34. Micklos, D. A. y Freyer, G.A. 1990. DNA Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1-477.
35. Mittermeier, R. y Goettsch, C. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México, 57-62 pp, en: México ante los retos de la biodiversidad. Conabio, México.
36. Newton C.R. y Graham A. 1997. PCR. 2a edición. Springer-Verlag, New York, EUA. 192 pp.
37. Okazaki, T., Serizawa, N., Enokita, R., Torikata, A. y Terahara, A. 1983. Taxonomy of actinomycetes capable of hydroxylation of ml-236B (compactin). *The Journal of Antibiotics* 36:1176-1183.
38. Olalde P. V. y Aguilera G.L.I. 1998. Microorganismos y Biodiversidad. Departamento de Biotecnología y Bioquímica IPN. Guanajuato, México, 16:289-292 pp.
39. Palmer, R.J., Siebert, J. y Hirsch, P. 1991. Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. *Microbial Ecology* 21:253-266.
40. Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana.
41. Qureshi, N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher P. y Maddox I.S. 2005. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories* 4:1-21.
42. Roselló, M.R. 2005. El concepto de especie en procariotas. *Ecosistemas. Asociación Española de Ecología Terrestre, Alicante España*, 14:11-16.
43. Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
44. Saiz-Jimenez C. 1997. Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *International Biodeterioration y Biodegradation* 40:225-232.

45. Sánchez-Moral S., Luque L., Cuezva S., Soler V., Benavente D., Laiz L., González J.M. y Saiz-Jimenez C. 2005. Deterioration of building materials in Roman catacombs: The influence of visitors. *Science of the Total Environment* 349:260-276.
46. Shirling, E.B. y Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340.
47. Sneath, P.H.A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. *Journal of General Microbiology* 17:184-200.
48. Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. y Bull, A.T. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 5:828-841.
49. Stackebrandt, E., Rainey, F.A. y Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:479-491.
50. Staneck, J.L. y Roberts, G.D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* 28:226-231.
51. Takeuchi, M., Nishii, T. y Yokota, A. 1992. Taxonomic significance of arabinose in the family *Pseudonocardiaceae*, Osaka, Japan, 6:79-90.
52. Van de Peer Y. y DeWachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications for Biological Sciences* 10:569-570.
53. Waksman A. S. y Henrici, T.A. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *Journal of Bacteriology* 46:337-341.
54. Warsheid T. y Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration y Biodegradation* 46:343-368.

55. Warwick S., Bowen T., McVeigh E. y Embley M. 1994. A phylogenetic analysis of the family Pseudonocardiaceae and the genera *Actinokinespora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:293-299.
56. White B.A. 2005. Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and Optimization of Reactions. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons. 4 pp.
57. Whitman W.B., Coleman D.C. y Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 6578-6583.
58. Zanardini E., Abbrusciano P., Ghedini N., Realini M. y Sorlini C. 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of Stone. *International Biodeterioration y Biodegradation* 45:35-42.
59. Zhi, X.Y., Li, W.J. y Stackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:589-608.

8. Anexos

8.1 Medios de cultivo

Lista de medios de cultivo empleados en el presente trabajo.

Los medios fueron esterilizados a 15 lb, 121°C por 15 minutos.

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

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

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

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

8.2 Soluciones y Búffers de trabajo

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

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

8.3 Resultados de la opción BLAST para cada uno de los aislados (sólo se indican los 10 primeros resultados)

8.3.1 Aislado Naica AE-2

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1147	1147	100%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1147	1147	100%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	1099	1099	100%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1099	1099	100%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1099	1099	100%	0.0	97%
FJ444995.1	Prauserella sp. YIM 90694 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444993.1	Prauserella sp. YIM 90630 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444992.1	Prauserella sp. YIM 90625 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444994.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1088	1088	100%	0.0	97%

8.3.2 Aislado Naica AE-4x

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1147	1147	100%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1147	1147	100%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	1099	1099	100%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1099	1099	100%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1099	1099	100%	0.0	97%
FJ444995.1	Prauserella sp. YIM 90694 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444993.1	Prauserella sp. YIM 90630 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444992.1	Prauserella sp. YIM 90625 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444994.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1088	1088	100%	0.0	97%

8.3.3 Aislado Naica AE-4y-A

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1046	1046	93%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1046	1046	93%	0.0	98%
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1046	1046	93%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	998	998	93%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	998	998	93%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	998	998	93%	0.0	97%
FJ444995.1	Prauserella sp. YIM 90694 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	992	992	93%	0.0	96%
FJ444993.1	Prauserella sp. YIM 90630 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	992	992	93%	0.0	96%
FJ444992.1	Prauserella sp. YIM 90625 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	992	992	93%	0.0	96%
FJ462363.1	Saccharomonospora sp. AI1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	990	990	93%	0.0	96%

8.3.4 Aislado Naica AE-5

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1147	1147	100%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1147	1147	100%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	1099	1099	100%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1099	1099	100%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1099	1099	100%	0.0	97%
FJ444995.1	Prauserella sp. YIM 90694 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444993.1	Prauserella sp. YIM 90630 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444992.1	Prauserella sp. YIM 90625 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444994.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1088	1088	100%	0.0	97%

8.3.5 Aislado Naica AE-7

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1192	1192	100%	0.0	100%
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1142	1142	100%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	1116	1116	100%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1116	1116	100%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1116	1116	100%	0.0	97%
FJ444994.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1105	1105	100%	0.0	97%
DQ656335.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1105	1105	100%	0.0	97%
NR_028834.1	Prauserella alba strain YIM90005 16S ribosomal RNA, partial sequer	1105	1105	100%	0.0	97%
FJ462363.1	Saccharomonospora sp. A11 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1103	1103	100%	0.0	97%

8.3.6 Aislado Naica AE-11x

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ598086.1	Pseudonocardiaceae bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1147	1147	100%	0.0	98%
FJ444996.1	Prauserella sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%
FM956091.1	Prauserella sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1147	1147	100%	0.0	98%
AB297964.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence	1099	1099	100%	0.0	97%
AB327259.1	Prauserella ruqosa gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1099	1099	100%	0.0	97%
NR_024889.1	Prauserella ruqosa strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1099	1099	100%	0.0	97%
FJ444995.1	Prauserella sp. YIM 90694 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444993.1	Prauserella sp. YIM 90630 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444992.1	Prauserella sp. YIM 90625 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1094	1094	100%	0.0	97%
FJ444994.1	Prauserella sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1088	1088	100%	0.0	97%

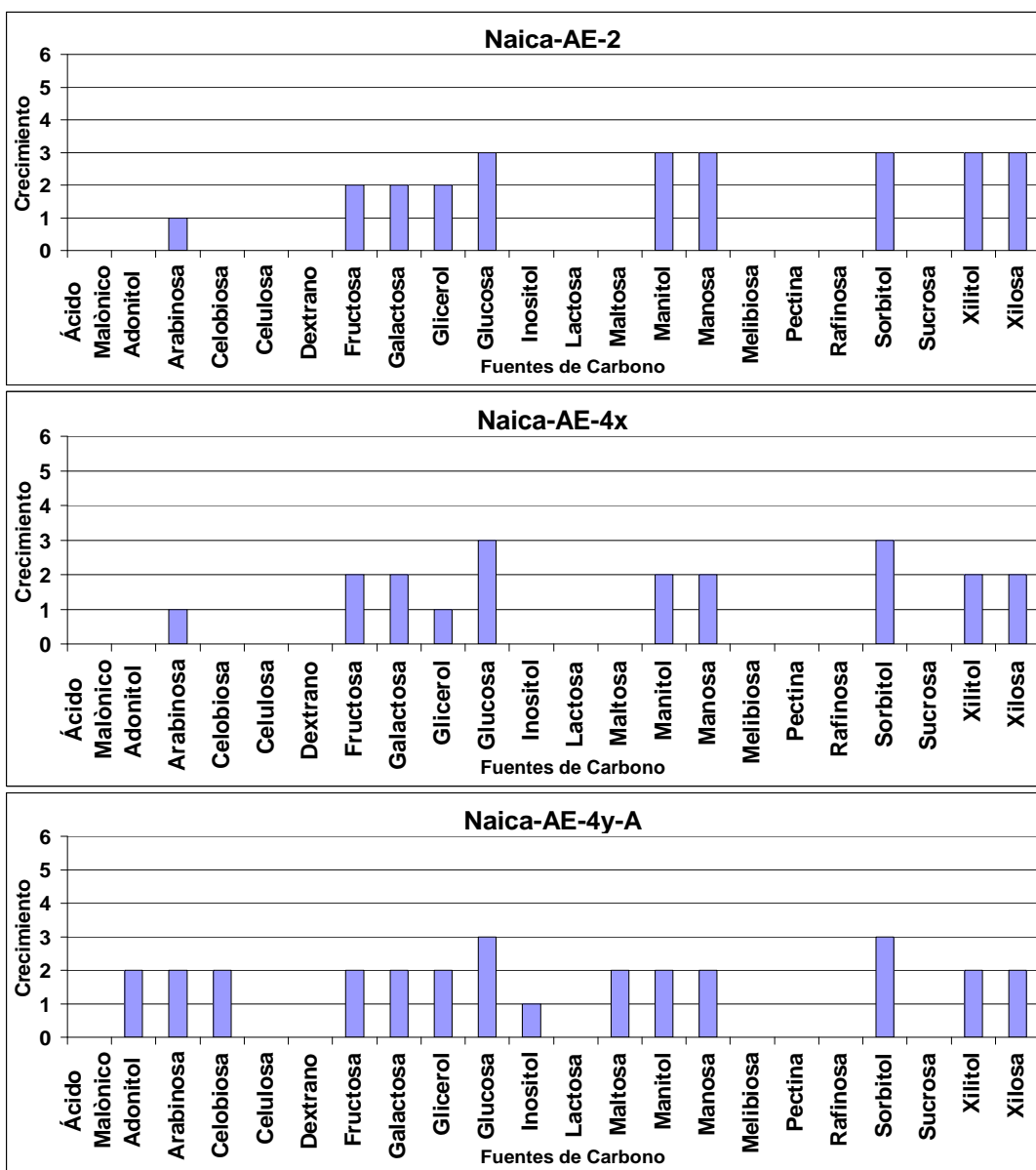
8.3.7 Aislado Naica AE-1

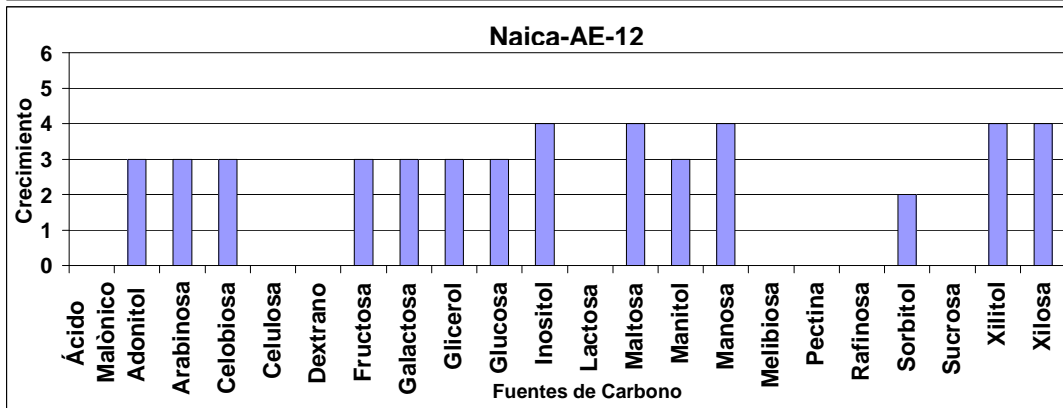
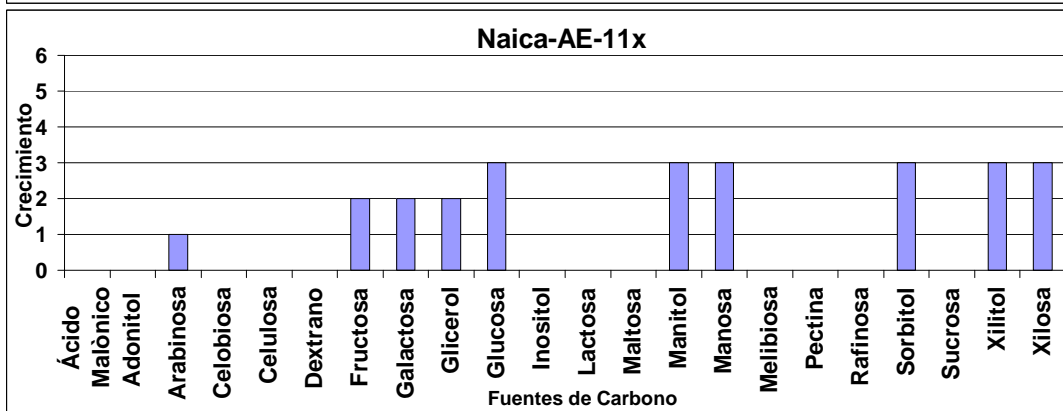
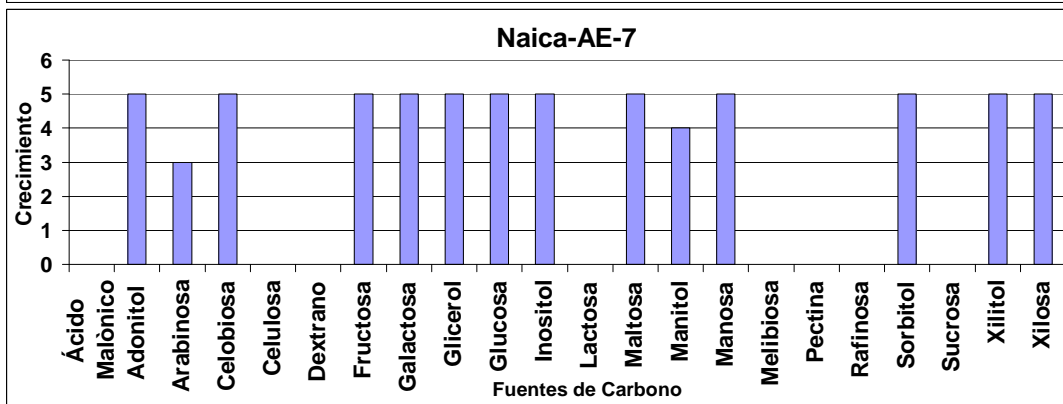
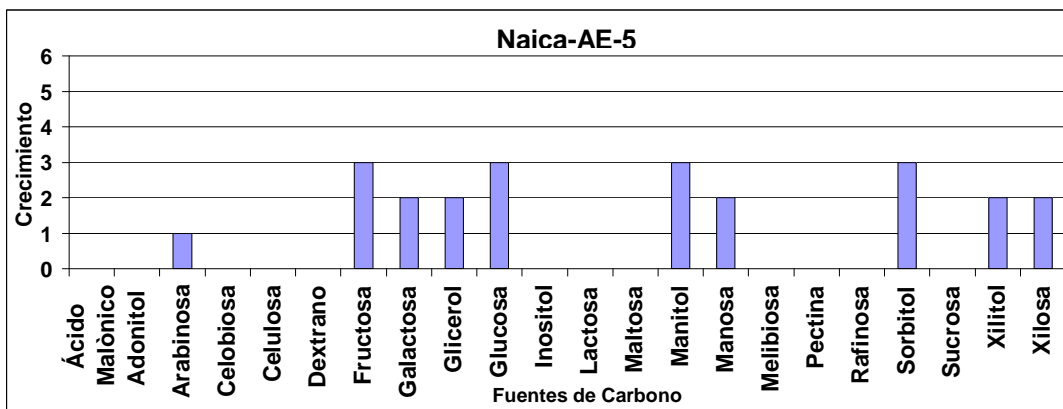
Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FM956091.1	<i>Prauserella</i> sp. 05-Be-005 partial 16S rRNA gene, type strain 05-Be	1098	1098	96%	0.0	99%
FJ598086.1	<i>Pseudonocardia</i> bacterium NH3 16S ribosomal RNA gene, parti	1059	1059	96%	0.0	98%
FJ444996.1	<i>Prauserella</i> sp. MS498 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1059	1059	96%	0.0	98%
AB297964.1	<i>Prauserella ruqosa</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	1022	1022	96%	0.0	96%
AB327259.1	<i>Prauserella ruqosa</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBI	1022	1022	96%	0.0	96%
NR_024889.1	<i>Prauserella ruqosa</i> strain DSM 43194 16S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	96%	0.0	96%
FJ444994.1	<i>Prauserella</i> sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1011	1011	96%	0.0	96%
DQ656335.1	<i>Prauserella</i> sp. YIM 90636 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1011	1011	96%	0.0	96%
NR_028834.1	<i>Prauserella alba</i> strain YIM90005 16S ribosomal RNA, partial sequer	1011	1011	96%	0.0	96%
FJ812357.1	<i>Saccharomonospora</i> sp. 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1007	1007	96%	0.0	96%

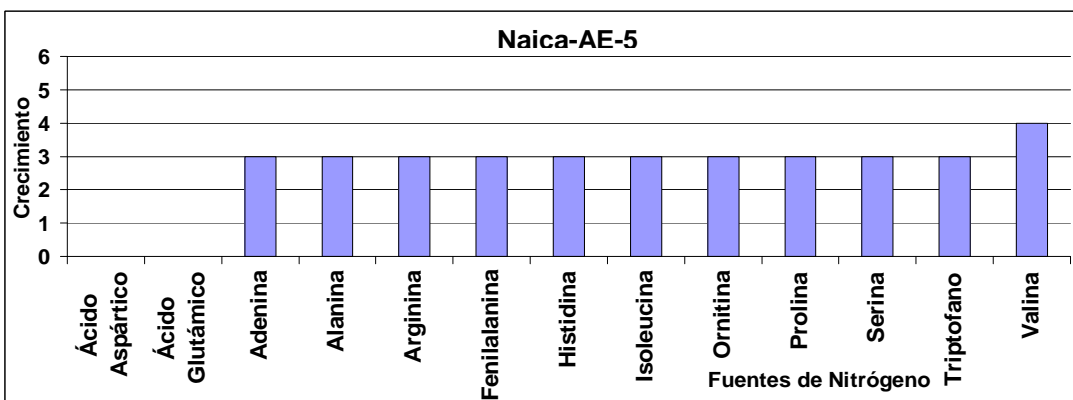
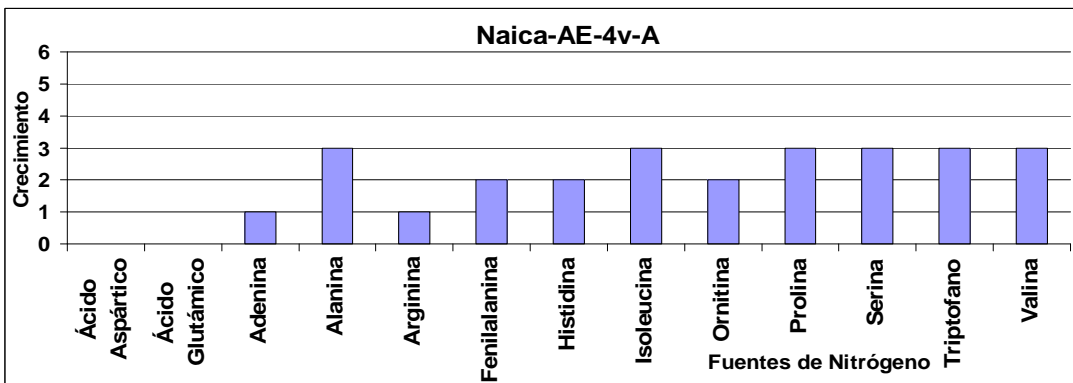
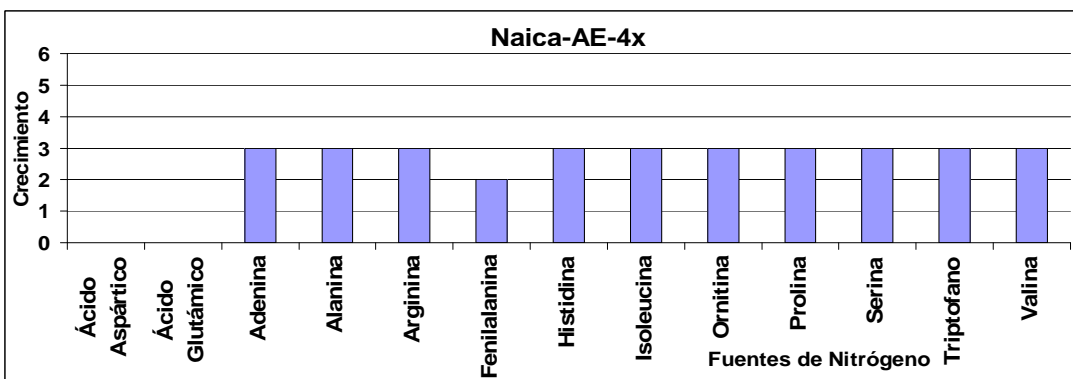
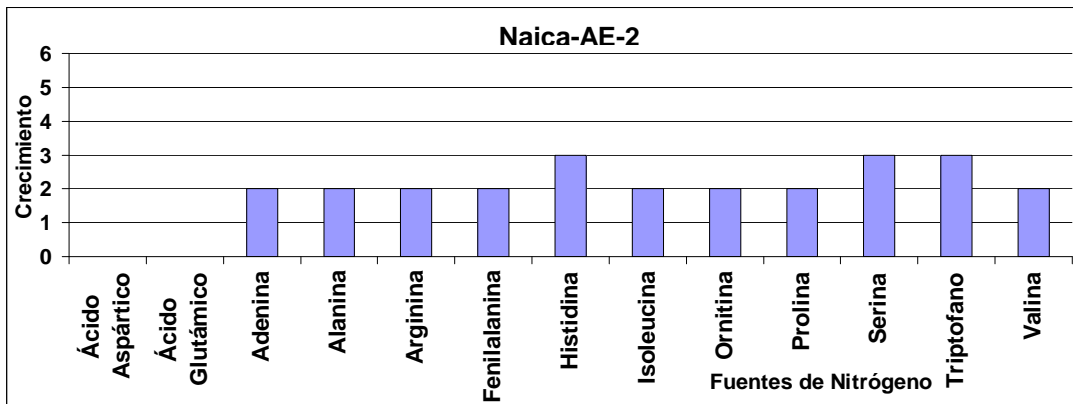
8.4 Representación gráfica de la caracterización fenotípica.

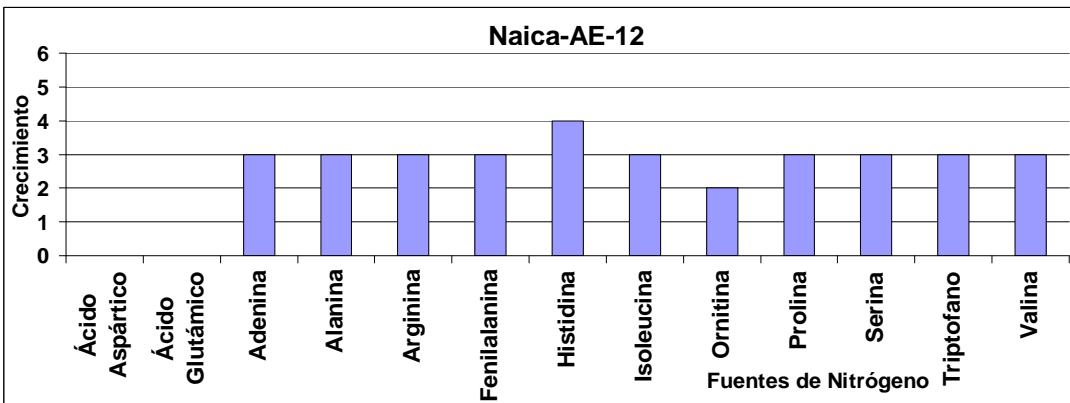
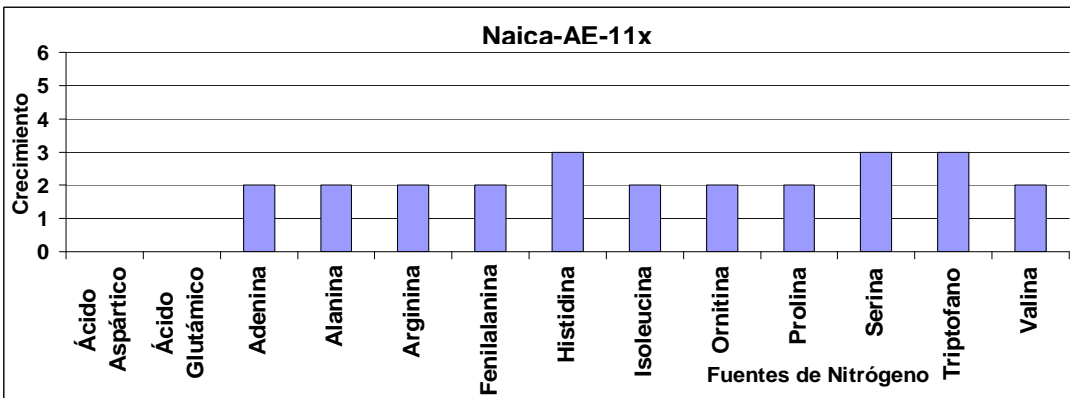
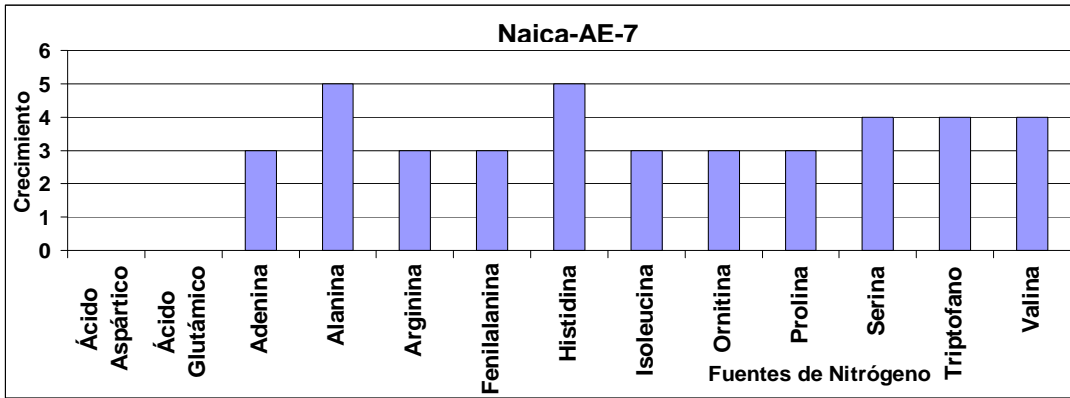
8.4.1 Utilización de fuentes de carbono



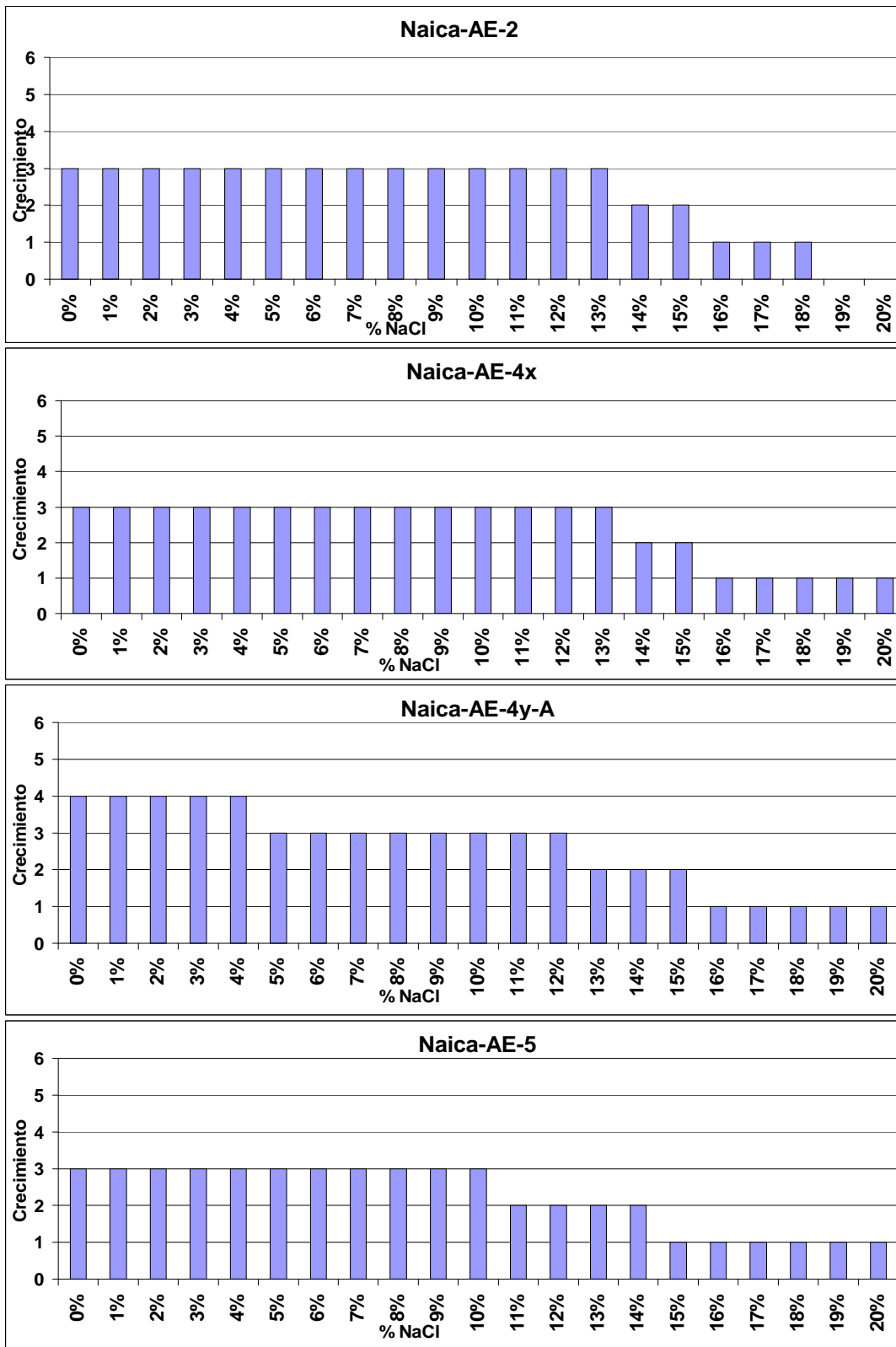


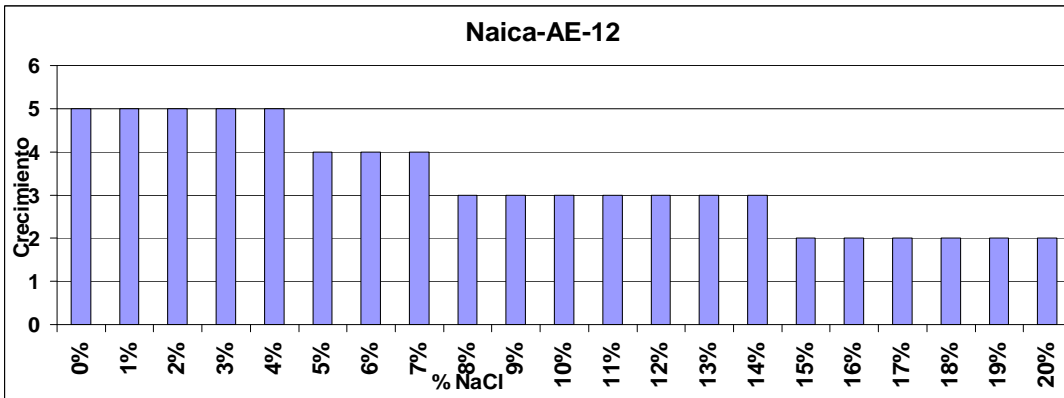
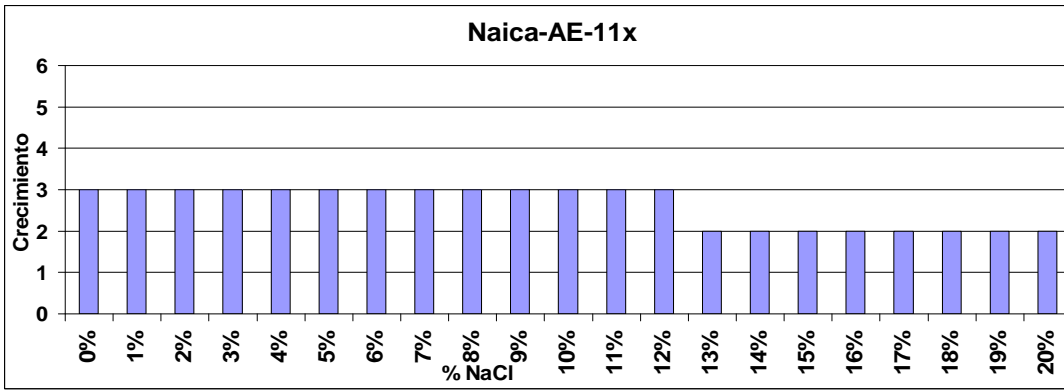
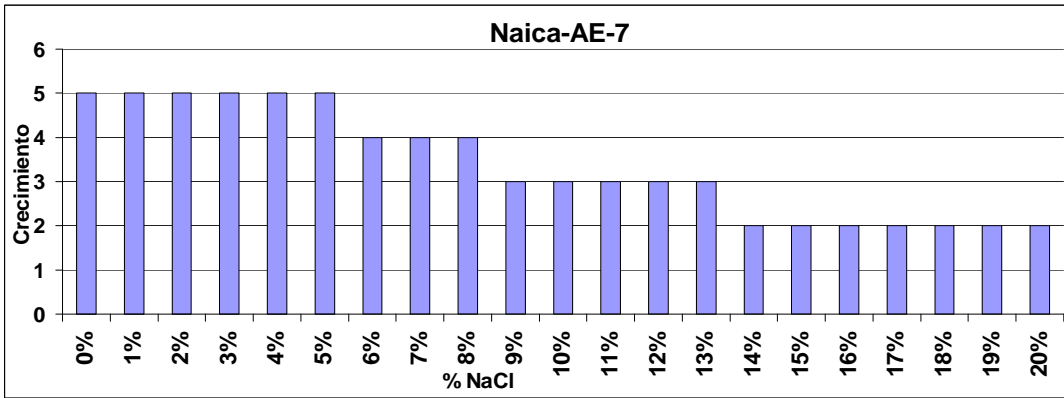
8.4.2 Utilización de fuentes de nitrógeno



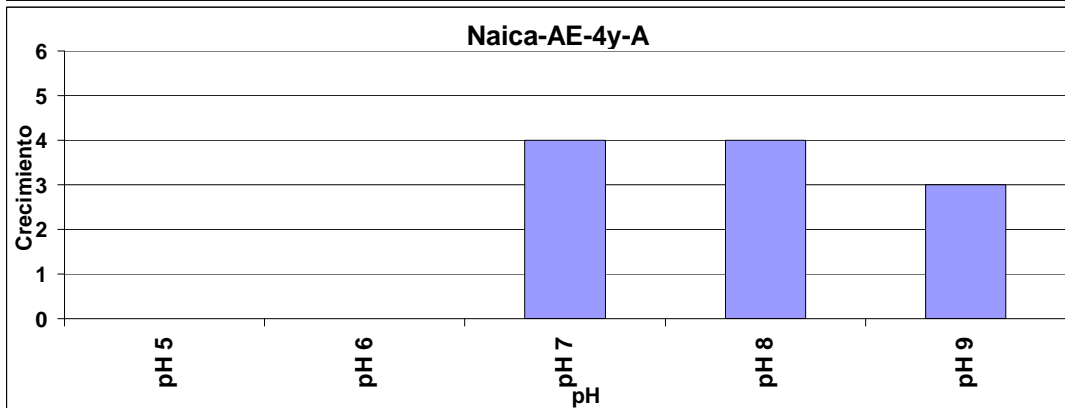
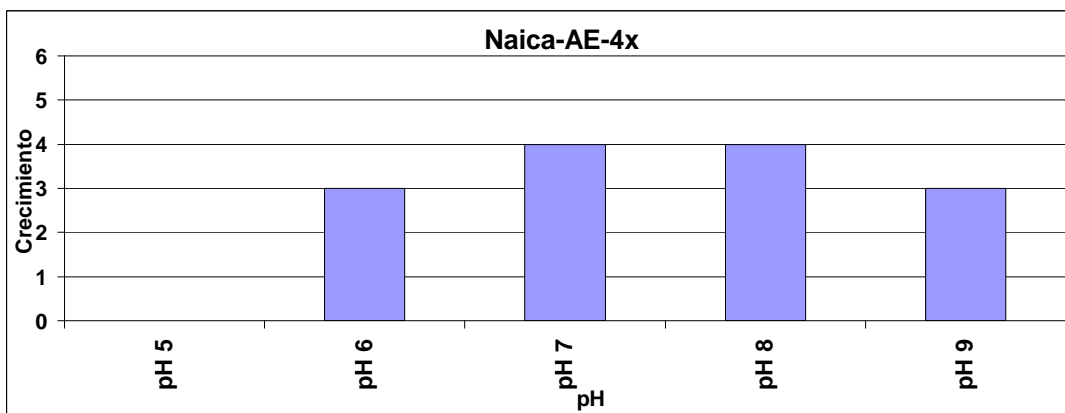
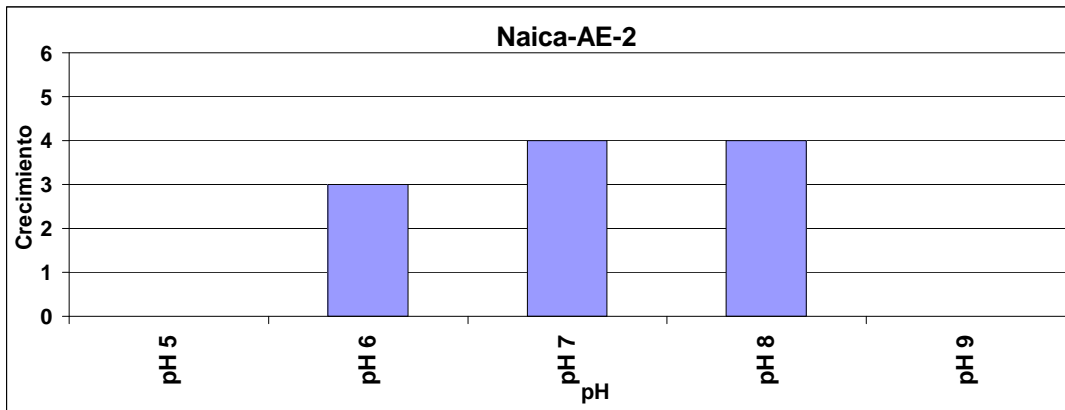


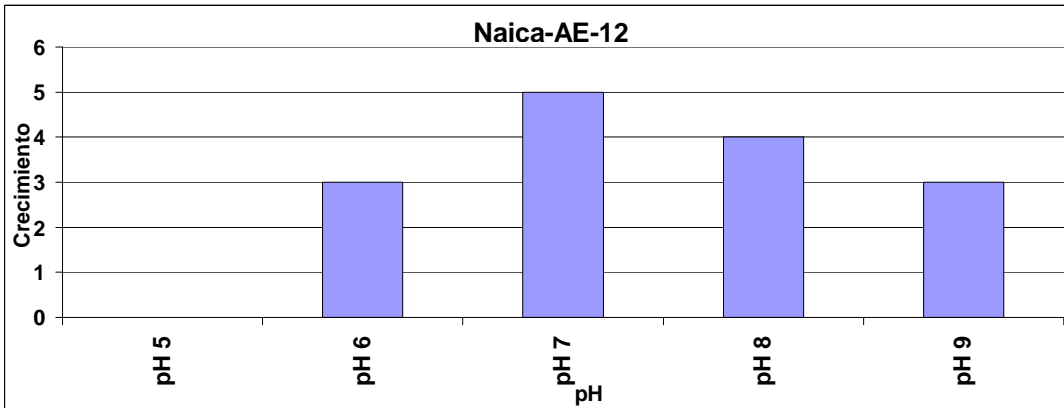
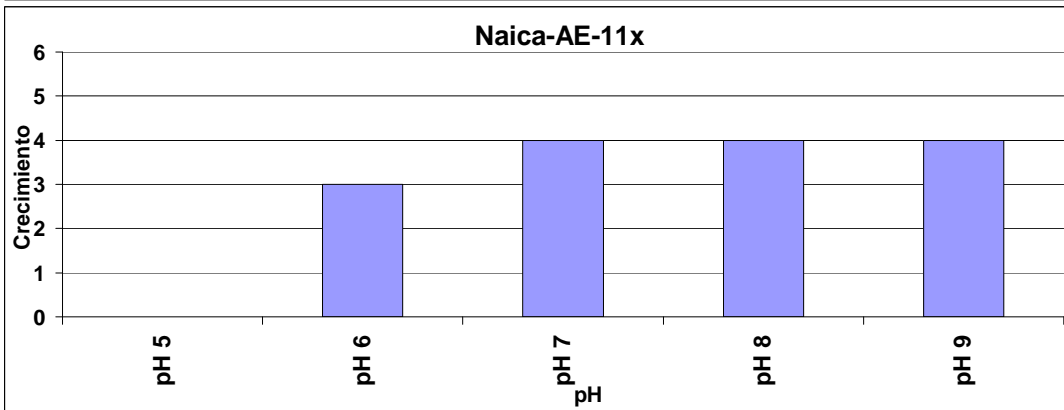
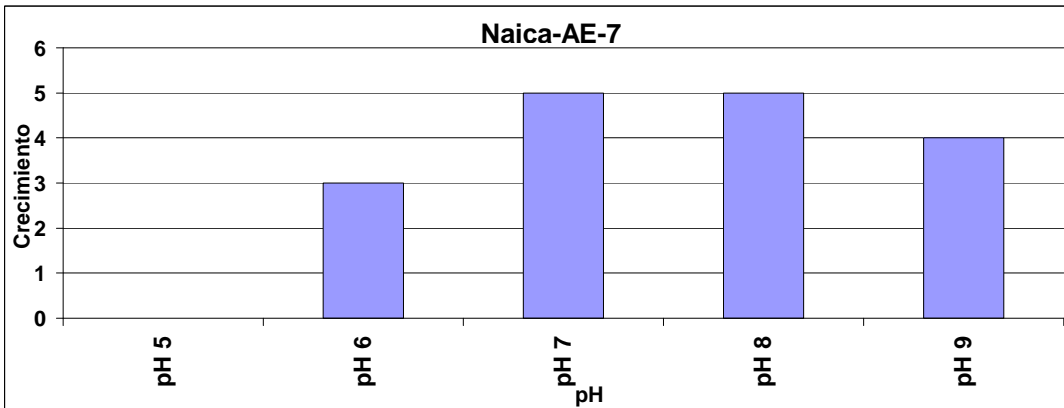
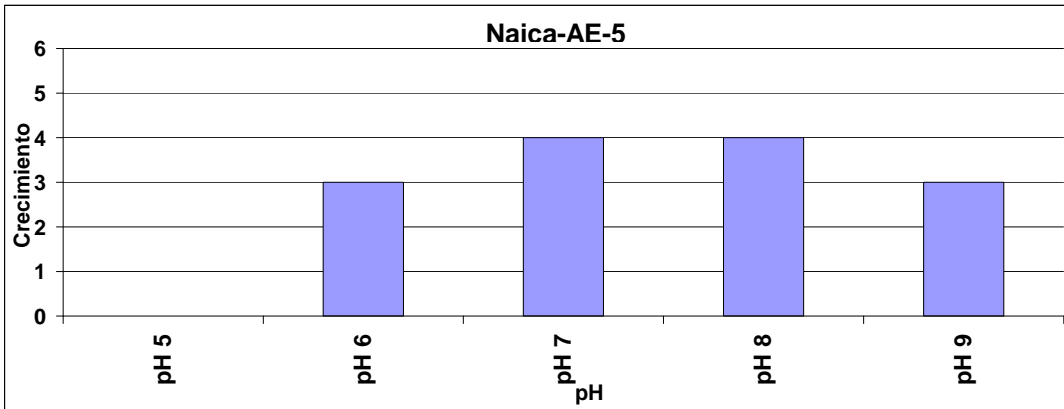
8.4.3 Tolerancia a concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)





8.4.4 Efecto del pH en el crecimiento de los aislados





8.4.5 Sensibilidad a diferentes antibióticos

